



UNESUM

Aporta a la biotecnología de plantas

UNESUM

Aporta a la biotecnología de plantas

Primera Edición

UNESUM

Aporta a la biotecnología de plantas





Publicado en diciembre - 2017 por
Compás Editorial Guayaquil -
Ecuador.

Cualquier forma de reproducción,
distribución, comunicación pública o
transformación de esta obra sólo
puede ser realizada con la
autorización de sus titulares.

Título: UNESUM Aporta a la biotecnología de plantas

Autores (docentes e investigadores de la UNESUM) en orden alfabético

Alfredo Jimenez González PhD.
Blanca Indacochea G PhD.
Carlos Castro P MSc.
Fernando Ayón V MSc
Julio Gabriel Ortega PhD.
Yhony Valverde L, MSc
Máximo Vera T MSc.
Marcos Manobanda Mgr. Duie.
Marcos Ramos Rodríguez PhD.

Autores (Técnicos e investigadores del Laboratorio de Biotecnología Vegetal UNESUM) en su orden alfabético

Bertha Azucena Zhindón G Ing.
Johann Parrales V. MSc

Autores (Docentes e Investigadores de la Universidad Pinar del Rio -UPR-Cuba) en su orden alfabético

Gretel Geada L. PhD.
Maurilio García Lopez PhD.
Raul Fernández PhD.
Rogelio Sotolongo S PhD.

Autores (Ingenieros Agropecuarios e Investigadores graduados de la UNESUM) en su orden alfabético

Cooper Marcillo I Ing
Jhonny Indacochea G Ing.
Paul Choez Indacochea Ing.
Santiago Alvarez I Ing.

Edición: primera edición

Publicación: diciembre 2017

Edición: Blanca Indacochea PhD

Docente Universidad Estatal del Sur de Manabí.

Julio Gabriel PhD Docente Universidad Estatal del Sur de Manabí.

Johann Parrales MSc Docente Universidad Estatal del Sur de Manabí.

Diseño y maquetación: Compás Editorial

Libro Sometido por pares académicos

Cámara Ecuatoriana del Libro - ISBN 978-9942-770-14-1

Manabí - Ecuador

Manera correcta de citar este libro:

Indacochea B, Gabriel J, Parrales J (Ed.) (2017). **UNESUM Aporta a la biotecnología de plantas**. Grupo COMPAS, Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), Jipijapa, Ecuador. 233 p.

UNESUM Aporta a la biotecnología de plantas**Prologo**

Este libro es un primer intento diseñado para contar con elementos didácticos que permitan una enseñanza fácilmente asimilable, y que se cuente como una fuente de consulta basada en experiencias de trabajo e investigaciones reales, y que de ellas se puedan aplicar y/o derivar mejores formas de trabajo que permitan incrementar la productividad y eficiencia de las actividades de evaluación de recursos naturales, es por ello que este libro se tratan las materias fundamentales de la biotecnología vegetal, particularmente el cultivo *in vitro* de las células y tejidos y de la biología molecular. Se dedica especial atención a la extraordinaria variabilidad de la célula vegetal y sus causas, a fin de comprenderla y dirigirla en la práctica de la biotecnología. La célula vegetal es, además de la unidad estructural y funcional de la planta, la unidad biotecnológica. La célula vegetal se puede cultivar aislada (clonar), fusionar para obtener híbridos somáticos y transformar por los métodos de la tecnología del DNA recombinante. El libro contiene capítulos sobre el estado fisiológico de las células y los tejidos utilizados en biotecnología, y otras cuestiones de importancia especulativa y aplicada como la fijación biológica del nitrógeno molecular, además tiene experiencias de investigaciones realizadas por investigadores en las especies vegetales. Es de carácter esencialmente biológico, y con este criterio trata de explicar las cuestiones esenciales de la biotecnología vegetal. Se incluyen además, a manera de guías simplificadas, tablas con formulaciones de medios nutritivos, reguladores de crecimiento, metodología básica sobre micropropagación de cultivo *in vitro*, transformación y de marcadores moleculares y bioseguridad

Por eso, la construcción de lo nuevo debe ser, simultáneamente, un destino y un camino. Volver realidad este propósito es algo que queda, ahora, en las manos y en la mente del lector

Los Autores

Acerca de este libro

El libro aspira a servir a los estudiantes que ya han definido una vocación más específica y que están considerando iniciar o ya han empezado algún curso de posgrado en las diferentes ramas de las ciencias naturales. Para ellos, más que un libro de texto, esta obra quiere ser una *invitación* a los aspectos más profundos y duraderos de las ciencias naturales. No se ofrecen aquí cifras o descripciones de programas concretos. Lo que se ofrece es una forma de pensar sobre el fascinante campo de la Biotecnología.

Por lo anterior, el libro también se dirige a estudiantes con nivel universitario en Agronomía, Agropecuaria, Biología, Forestal, Ambiental a profesionales e investigadores, quienes podrán encontrar aquí algunos principios y conceptos que les ayudarán a ubicar su trabajo cotidiano dentro de un marco de referencia amplio. Más que un conjunto de métodos específicos, el libro ofrece una *visión* para definir la identidad y la misión de la investigación, la enseñanza y la práctica de la ciencia naturales.

Organización flexible del material

Este libro de consulta fue dividido en cuatro Unidades Temáticas: En la **UNIDAD 1**, se trata de las experiencias desarrolladas en las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* y *ex vitro* en banano y plátano. En la **UNIDAD 2**, se trata sobre las aplicaciones de la micropropagación y los efectos hormonales en especies forestales. En la **UNIDAD 3**, se hace una revisión sobre la selección asistida por marcadores moleculares. Finalmente en la **UNIDAD 4**, se hace una propuesta de bioseguridad.

Cobertura de los temas

Los temas fueron organizados de manera tal que sea de fácil seguimiento, analizando las diversas temáticas y poniendo ejemplos de estudios de caso realizados a lo largo de los últimos años de investigación. En el **Tema 1**: se trata de hacer un análisis en base a experimentación de las técnicas *in vitro* y *ex vitro* de células y tejidos vegetales. En el **Tema 2**, se trata aspectos como la aplicación de las técnicas *in vitro* en cultivos como el plátano y el banano. En el **Tema 3**, se habla sobre la micropropagación de cultivos como el banano “orito”. El **Tema 4**, hace un análisis sobre la importancia del balance hormonal en la multiplicación *in vitro*. En el **Tema 5**, se hace un estudio sobre el uso de hormonas en la propagación vegetativa del plátano y el banano. En el **Tema 6**, se habla sobre la micropropagación de árboles superiores y sus potencialidades. El **Tema 7**, trata sobre las aplicaciones *ex vitro* de especies forestales, como el laurel. En el **Tema 8**, se analiza sobre los efectos hormonales en el enraizamiento del bálsamo. En el **Tema 9**, se hace una descripción de los protocolos para la propagación *in vitro* de especies forestales nativas. En el **Tema 10** se habla de un estudio de caso sobre la aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*. En el **Tema 11** se examina los protocolos de desinfección de explantes durante la micropropagación de *Cedrela odorata* L. En el **Tema 12**, se hace un breve análisis de las aplicaciones de los marcadores moleculares en la selección asistida. En el **Tema 13**, se trata de dar los lineamientos de un programa de seguridad para el laboratorio de biotecnología de la UNESUM y en el **Tema 14**, se hace una propuesta de una guía de manejo de desechos en el laboratorio de biotecnología para la determinación del impacto ambiental.

“**Hay** tres cosas que cada persona debería hacer durante su vida: plantar un árbol, tener un hijo y escribir un libro”

Jose Martí

En mi vida he plantados muchos arboles, he tenido un hijo y una hija, solo me faltaba escribir un libro. Siempre considere que escriben quienes tienen vocación y tiempo. Después de haber trabajado, estudiado, investigado y experimentado las diversas corrientes y metodologías en el ejercicio de la docencia e Investigación; hay tiempo para plasmar mi pensamientos en un libro. “La vida es la mejor escuela, el amor es el mejor remedio, el percibir y consagrar estas verdades, es nuestro inmenso reto”.

Blanca Soledad

Reconocimientos

A todos y cada uno de los 19 autores, en su mayoría Docentes e investigadores y profesionales de instituciones: Universidad Estatal del Sur de Manabi, Universidad de Pinar del Rio “Hermanos Saiz Monte de Oca”. Que han contribuido con sus aportes.

A la Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM) y a la Dirección de Investigación y posgrado (UNESUM), por auspiciar la publicación del libro.

Al Proyecto ATENEO/PROMETEO por haber facilitado la venida del segundo autor a la UNESUM, para contribuir al forlalecimiento de los talentos humanos de dicha institución.

A los revisores, colegas, familia y personal de apoyo, por sus valiosas contribuciones para concretar este proyecto.

Los Editores

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Estatal del Sur de Manabi, UNESUM y a la Dirección de Investigación y Posgrado (UNESUM) por haber auspiciado la publicación del presente libro.

A la Facultad de Ciencias Naturales y de la Agricultura, representada por la Carrera de Ingeniería Agropecuaria por su apoyo intelectual y experiencia

Al Dr. Julio Gabriel, reconocido investigador y catedrático boliviano, por sus valiosas contribuciones para concretar la edición es este libro.

A los Dres. Maurilio Garcia López, Rogelio Sotolongo Soospedra, Gretel Geada López reconocidos investigadores y catedráticos cubanos, por sus valiosas contribuciones para concretar la edición es este libro.

A mi madre, hij@s, Hij@s politicos,niet@s, herman@s, familia y amig@s por su apoyo constante e incondicional

A los colegas y personal de apoyo del laboratorio de Biotecnología Vegetal-UNESUM, por sus valiosas contribuciones para concretar este proyecto.

Blanca Soledad

DEDICATORIA

A Santiago
Confidente, Impulso y Sosiego

A Pamela
Inspiración, Paciencia y Fortaleza

A Blanca Viviana
Iluminación, Integridad y Baluarte

Índice de Unidades y Temas	Página
----------------------------	--------

UNIDAD I. Experiencias en las técnicas <i>in vitro</i> , <i>ex vitro</i> y cultivos de tejidos en banano y plátano.	1
Tema 1. Las técnicas de cultivo <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> de células y tejidos vegetales	2
Blanca Indacochea G, Johann Parrales Villacreses y Julio Gabriel O	
Tema 2. Propagación de plátano Barraganete (<i>Musa paradisiaca</i>) mediante desinfectantes y urea a diferentes profundidades de cortes.....	40
Cooper Marcillo Indacochea, Blanca Indacochea Ganchozo	
Tema 3. Micropropagación <i>in vitro</i> de banano orito (<i>Musa acuminata AA.</i>) para la producción y la seguridad alimentaria	50
Jhonny Indacochea y Blanca Indacochea Ganchozo	
Tema 4. Influencia del balance hormonal en la multiplicación <i>in vitro</i> del plátano barraganete <i>Musa paradisiaca</i> en el cantón jipijapa.....	65
Santiago Alvarez, Blanca Indacochea Ganchozo	
Tema 5. Propagación vegetativa de plátano (<i>Musa paradisiaca</i>), dominico (<i>Musa sapientum</i>) y banano (<i>Musa cavendish</i>), mediante el uso de hormonas de enraizamiento ANA y BAP, en el laboratorio de biotecnología vegetal....	79
Paul Choez Indacochea , Blanca Indacochea G, Marcos Manobanda	
UNIDAD II. Aplicaciones del la micropropagación y los efectos hormonales en especies forestales	95
Tema 6. Micropropagación de árboles superiores de <i>Cordia alliodora</i> (Ruiz & Pav) Oken, en la microrregión sur de Manabí.....	96
Blanca Indacochea Ganchozo, Maurilio Garcia L , Rogelio Sotolongo S, Gretel Geada L.	
Tema 7. Propagación <i>ex vitro</i> de laurel <i>Cordia alliodora</i> , a partir de explantes obtenidos de plántulas en vivero	109
Blanca Indacochea Ganchozo, Maurilio Garcia, Rogelio Sotolongo, Johann Parrales	
Tema 8. Influencia de niveles de concentración de hormona AIB, en la inducción de raíces en estaquillas de bálsamo (<i>Myroxylon balsamum</i>).....	119
Johann Parrales Villacreses , Blanca Indacochea Ganchozo	
Tema 9. Obtención de protocolos de desinfección para la propagación <i>in vitro</i> de tres especies forestales nativas en la zona sur de Manabi	126
Blanca Indacochea G. Johann Parrales, Carlos Castro, Maximo Vera y Fernando Ayón.	
Tema 10. Aclimatación de plantas obtenidas <i>in vitro</i> de <i>Myroxylon balsamum</i> , <i>Tabebuia crhysantha</i> y <i>Tabebuia billbergii</i>	144

Blanca Indacochea G, Johann Parrales, Carlos Castro, Máximo Vera	
Tema 11. Protocolo de desinfección de explantes durante la micropropagación de <i>Cedrela odorata</i> L.....	150
Bertha Azucena Zhindón, Alfredo Jimenez González, Blanca Indacochea Ganchozo, Marcos Ramos Rodriguez	
UNIDAD III. Selección asisitida por marcadores moleculares	169
Tema 12. Cribado de QTLs de resistencia en cultivos con marcadores moleculares: Caso papa (<i>Solanum tuberosu</i> L.).....	170
Julio Gabriel	
UNIDAD IV. Propuestas de Bioseguridad	182
Unidad 13. Diseño de un programa de bioseguridad para el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí.....	183
Johann Parrales, Raul Fernández, Blanca Indacochea Ganchozo	
Unidad 14. Propuesta de una guía de manejo de desechos en el laboratorio de biotecnología para la determinación del impacto ambiental.....	216
Carlos Castro P y Blanca Indacochea Ganchozo	

UNIDAD 1



Experiencias en las técnicas in vitro,
ex vitro y cultivos de tejidos en banano
y plátano.

Tema 1

Las técnicas de cultivo *in vitro* y *ex vitro* de células y tejidos vegetales Blanca Indacochea Ganchozo, Johann Parrales Villacreses y Julio Gabriel O

“El que aprende y aprende y no practica lo que sabe, es como el que ara y ara y no siembra”

Platón

Resumen

En este documento se analiza de manera sistematizada las principales contribuciones que podría tener la biotecnología, particularmente el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, que se resumen en los siguientes aspectos: 1) la producción de plantas de sanidad controlada, lo que permite incrementos en los rendimientos, 2) la independencia del clima, suelo, distribución geográfica y problemas socio-políticos, 3) la capacidad de establecer un sistema de producción definido, en relación a las demandas del mercado, 4) el cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de cultivar a campo, 5) la conservación del germoplasma de plantas de interés comercial o en vías de extinción, 6) la posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético, más rápidos que en los cultivos tradicionales, por técnicas biotecnológicas e ingeniería genética, 7) la producción de compuestos químicos conocidos provenientes de plantas de crecimiento lento o difíciles de obtener por extracción o por síntesis química, 8) la síntesis de nuevos productos químicos expresados únicamente en los cultivos *in vitro*, 9) la obtención de enzimas y sistemas de biotransformaciones para ser usados solos o combinados con síntesis química y 10) la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, a herbicidas o a estrés abiótico, con mejor calidad nutricional, que actúen como biorreactores en la producción de proteínas, carbohidratos o lípidos o que secuestren metales pesados de suelos contaminados, entre otras aplicaciones.

Palabras clave: biotecnología, biotransformaciones, síntesis, transgénicos.

Summary

The *in vitro* and *ex vitro* crop-growing techniques of cells and plant tissues

This document analyzes, in a systematized way, the main contributions that biotechnology could have, particularly the *in vitro* crop of cells and plant tissues, which are summarized in the following aspects: 1) the production of controlled health plants, which allows yield increases, (2) the independence of climate, soil, geographic distribution and socio-political problems, (3) the ability to establish a defined production system in relation to market demands, (4) the cultivation of undomesticated species and/or difficulties to be cropped in field, (5) the conservation of plants germplasm of commercial interest or endangered, (6) the possibility of establishing breeding programs, faster than in traditional crops, by biotechnological techniques and genetic engineering, (7) production of known chemical compounds from slow-growing plants or difficult-to-obtain by extraction or by chemical synthesis, (8) synthesis of new chemicals expressed only in *in vitro* crops, (9) obtaining enzymes and biotransformation systems to be used alone or in combination with chemical synthesis, and (10) production of transgenic plants resistant to pathogens, herbicides or to abiotic stress, with better nutritional quality, acting as bioreactors in the production of

proteins, carbohydrates or lipids or that sequester heavy metals from contaminated soils, among other applications.

Key words: biotechnology, biotransformation, synthesis, transgenics.

Introducción

Debido al incremento de la población mundial, en los últimos años se ha acentuado el interés por la biotecnología vegetal con el propósito de producir alimentos, mejorar cultivares, adaptarlos a diferentes condiciones climáticas y edafológicas y obtener metabolitos de interés comercial (Pérez-Ponce 1998).

En este contexto, el cultivo de tejidos vegetales ha merecido especial atención debido a que comprende un grupo heterogéneo de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos o células en un medio de composición química definida e incubados en condiciones ambientales controladas (Roca y Mroginski 1991, Pérez - Ponce 1998).

Las razones que determinan que el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales constituya una tecnología interesante para la producción de plantas y productos naturales de interés, son las siguientes: 1) la producción de plantas de sanidad controlada, lo que permite incrementos en los rendimientos, 2) la independencia del clima, suelo, distribución geográfica y problemas socio-políticos, 3) la capacidad de establecer un sistema de producción definido, en relación a las demandas del mercado, 4) el cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de cultivar a campo, 5) la conservación del germoplasma de plantas de interés comercial o en vías de extinción, 6) la posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético, más rápidos que en los cultivos tradicionales, por técnicas biotecnológicas e ingeniería genética, 7) la producción de compuestos químicos conocidos provenientes de plantas de crecimiento lento o difíciles de obtener por extracción o por síntesis química, 8) la síntesis de nuevos productos químicos expresados únicamente en los cultivos *in vitro*, 9) la obtención de enzimas y sistemas de biotransformaciones para ser usados solos o combinados con síntesis química y 10) la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, a herbicidas o a estrés abiótico, con mejor calidad nutricional, que actúen como biorreactores en la producción de proteínas, carbohidratos o lípidos o que secuestren metales pesados de suelos contaminados, entre otras aplicaciones.

Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales

El cultivo de tejidos en su acepción amplia puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos (células desprovistas de pared celular-células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. La imprecisión de esta definición puede generar muchas polémicas, pero es actualmente aceptada. Generalmente, es común dividir las técnicas del cultivo de tejidos en dos grandes grupos: a) cultivos en medios semisólidos y b) cultivos en medios líquidos, los que a su vez pueden ser agitados (mediante el empleo de agitadores de uso continuo) o estacionarios. También es frecuente dividir al cultivo de tejidos atendiendo a los niveles de complejidad en cultivo de órganos, cultivos celulares y cultivo de protoplastos. Para el establecimiento de los cultivos utilizando cualquiera de los sistemas es necesario tener en cuenta algunos aspectos generales comunes relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones de incubación. La discusión de estos aspectos constituye el objetivo de este documento. Adicionalmente se incluye el tema de la aclimatación de las plantas

regeneradas in vitro, que es de gran importancia en la mayoría de las aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura.

Explante

El término explante se define como un fragmento de una planta (célula, tejido u órgano; el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.), que se escinde y se prepara de forma aséptica para su cultivo en un medio nutritivo.

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada.

Objetivo del cultivo: si bien es difícil tratar de clasificar las aplicaciones que se persiguen con el cultivo de tejidos, se podría esquematizarlas en aplicaciones para:

Estudios básicos

En este caso, los explantes cultivados pueden ser diversos. Si lo único que se quiere lograr es un sistema de callos para estudiar algún proceso fisiológico, se puede cultivar cualquier órgano, tejido o célula viva. En este caso, lo único que se busca es la inducción de callos, lo ideal es cultivar explantes jóvenes, derivados de semillas en germinación, donde se obtienen respuestas rápidas y, en general, hay menores problemas de contaminación con microorganismos. A veces se hace uso del cultivo de tejidos porque representa un sistema experimental que simplifica la complejidad generada por los fenómenos de correlación entre las distintas partes que normalmente están presentes en una planta entera. El explante que se usará estará condicionado por lo que se quiere estudiar. Un buen ejemplo lo constituye el cultivo de ovarios fecundados del tomate para estudiar los requerimientos nutricionales durante el crecimiento de los frutos. Asimismo, el cultivo de óvulos ha sido muy útil para estudiar aspectos relacionados con la formación de las fibras en algodón. El cultivo de discos de tallos brindó una valiosa ayuda para estudiar la rizogénesis in vitro.

Obtención de plantas con sanidad controlada

Es muy común la utilización del cultivo de tejidos para la obtención de plantas libres de virus. El explante ideal para ello es el meristema (dependiendo de la especie, de 0.2-0.5mm de longitud) consistente del domo y de un par de primordios foliares.

Micropropagación

En este caso dependerá del sistema que se quiere utilizar. Si lo que se quiere explotar es la brotación de meristemas, los ápices terminales y los segmentos nodales de ramas jóvenes constituyen excelentes explantes. En este caso el cultivador de tejidos debe conocer perfectamente la biología de la reproducción de la planta para aprovechar aquellos explantes que en forma natural son propágulos.

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado.

El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban.

Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de novo y embriogénesis somática.

Posibilidad de contaminación con microorganismos

Edad fisiológica

De ser posible, se deben cultivar explantes de plantas donantes que crecen 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.

Tamaño

En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos. También es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados.

Época del año

Es un factor que suelen tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al grado de dormición que presentan ciertos explantes (yemas, por ejemplo) y también con la posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos.

Asepsia

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por explante-medio de cultivo-condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micropropagación se lo puede estimar en alrededor del 10%. En el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican. Es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus y fitoplasmas, por lo que en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se quiere significar que son cultivos donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias. Dos son las fuentes de contaminaciones: a) microorganismos presentes en el interior o en la superficie de los explantes y b) fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio.

La correcta detección de estas fuentes y del tipo de microorganismo son aspectos importantes para el éxito de los cultivos, pues por un lado ayuda a determinar la fuente de contaminación y por otro lado, ayuda a la planificación de los procedimientos para controlarlos. Varios géneros de bacterias (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*) y de hongos filamentosos (*Aspergillus*, *Penicillium*,

Fusarium, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Neurospora*) están frecuentemente en los cultivos. Es conveniente inspeccionar visualmente con la ayuda de un microscopio estereoscópico – los cultivos en forma periódica (por lo menos semanalmente). También se pueden realizar pruebas con medios de cultivo diferenciales y test bioquímicos específicos.

Para evitar y/o minimizar las contaminaciones de los cultivos con microorganismos es necesario:

- Conocer el material vegetal con que se trabaja y los posibles contaminantes específicos.
- Realizar una adecuada preparación de la planta donadora de explantes, cultivándola preferentemente en invernaderos tratadas con productos químicos que eliminen patógenos y eventuales microorganismos endófitos.
- Proceder a la desinfección superficial de los explantes mediante el uso de compuestos químicos con el objeto de eliminar los microorganismos con el menor daño posible para el explante. Si bien no es posible recomendar un procedimiento general, se puede señalar que el procedimiento más popularizado consiste en una doble desinfección mediante la inmersión de los explantes en etanol (70%v/v) durante 20 a 60 segundos seguido de hipoclorito de sodio 1 a 3%, contenido en el agua de lavandina comercial, durante 3 a 30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explante. Algunos procedimientos se basan en el empleo de únicamente etanol o de hipoclorito de sodio. Finalmente, es necesario eliminar los restos de estos productos mediante varios lavados con agua destilada estéril. En este último punto hay que aconsejar que se utilice agua destilada estéril de reciente preparación, dado que está demostrado que el almacenaje prolongado del agua estéril puede ser la causa de contaminaciones con bacterias. Es aconsejable realizar estas operaciones de desinfección superficial en una cámara de transferencia con aire estéril. En lugar del hipoclorito de sodio se puede utilizar hipoclorito de calcio (6 -12 %) o el cloruro de mercurio (0.1%- 1.5%). Es preciso recomendar extrema cautela con el empleo de este último compuesto, dado que es altamente tóxico y además no es removido con facilidad del explante.
- En los casos en que no se utilice etanol, la adición de agentes tensoactivos junto con el desinfectante es una práctica recomendada. Entre los más usados figuran Tween-20 (0,01 – 0.1%) o unas gotas de tritón. El lavado previo de los explantes con agua corriente y detergentes, ayuda a una mejor desinfección. La inmersión de los explantes en soluciones conteniendo sustancias antibióticas y /o antimicóticas (gentamicina, sulfato de estreptomina, ampicilina, tetraciclina, carbenicilina, sulfato de gentamicina, pentacloronitrobenzoceno, rifampicina, anfotericina B, benomil, carbendazim) puede ser de utilidad, pero deben ser utilizados en casos excepcionales. Estos productos tienen el inconveniente de que alteran la composición de los medios de cultivo y además pueden ser metabolizados por los explantes.
- Últimamente han aparecido soluciones biocidas que matan bacterias y hongos, previenen la germinación de esporas y a altas concentraciones pueden eliminar contaminaciones de microorganismos endófitos. Uno de estos compuestos es el PPM (Plant Preservative Mixture). Otro ejemplo es el denominado G-1, un compuesto derivado de los furfurales de la caña de azúcar. Este compuesto, químicamente: 1-(5-bromofur-2-il)-2- bromo-2-nitroeteno fue desarrollado en la Universidad Central de las Villas (Cuba) y tiene efecto bactericida y fungicida de amplio espectro. En los casos en que se utilicen plántulas crecidas *in vitro* como plantas donantes de

explantes, es necesario desinfectar las semillas para su cultivo y germinación y luego es aconsejable desinfectar también las plántulas resultantes.

- En algunos materiales vegetales se utiliza la preincubación de los explantes mediante lo cual éstos son desinfectados suavemente y precultivados durante 24 horas en un medio conteniendo sacarosa, y finalmente son desinfectados nuevamente y cultivados. Emplear medios e instrumentos de cultivo esterilizados, es decir, liberados completamente de cualquier microorganismo vivo o esporas. Para la esterilización, en la mayoría de los casos se hace uso del calor en sus diversas formas: llama directa, calor húmedo (en forma de vapor abierto o bajo presión), calor seco (aire caliente). Se pueden usar hornos a microondas. El agua caliente también puede ser usada. En el caso de sustancias termolábiles, la esterilización se puede hacer mediante filtración a través de filtros bacteriológicos. No es posible recomendar ningún sistema de esterilización dado que la exitosa destrucción de los microorganismos depende de múltiples factores entre los que interesan el tamaño del recipiente, el tiempo de esterilización y la naturaleza de la sustancia a esterilizar. Sin embargo, se pueden dar algunas sugerencias:
 - La esterilización en estufas mediante calor seco (aire caliente) es recomendable para esterilizar recipientes de vidrios secos (pipetas, cápsulas de Petri, tubos). En estos casos, 2 - 4 horas en estufas a 180 - 200 °C brindan excelentes resultados.
 - La esterilización con calor húmedo con vapor bajo presión (en autoclave o en una olla a presión). Es el procedimiento más empleado para la esterilización de los medios de cultivo (salvo, como se indicó más arriba, para aquellos que posean componentes termolábiles). En este caso, lo más común es usar una presión de 1.46 kg.cm⁻² durante 20 minutos, con lo que prácticamente se destruyen todas las formas de vida. Es importante que en todos los puntos de la autoclave se alcance dicha temperatura, para lo cual hay disponibles cintas detectoras colorimétricas.
 - Cultivar los explantes en una cámara de transferencia con aire estéril (gabinete de flujo laminar), localizada en un ambiente limpio y no expuesta a corrientes de aire. De no disponer este equipamiento, se pueden sustituir con cuartos esterilizados previamente con luz ultravioleta (nunca exponerse a la luz UV en forma directa). La mesada de trabajo y las paredes del gabinete deben ser desinfectadas previamente con etanol al 70%. De la misma manera deben ser desinfectados exteriormente todos los recipientes (conteniendo medios de cultivo, agua, etc.) que ingresen en el área del aire estéril. Los operarios constituyen frecuentemente una importante fuente primaria de contaminación, porque es recomendable que, antes de comenzar a trabajar laven sus manos y antebrazos con abundante agua y jabón y se desinfecten con etanol al 70 %. La utilización de guardapolvos, guantes y máscaras protectoras de la boca y de la nariz, así como los gorros protectores de los cabellos, ayudan a reducir sensiblemente los niveles de contaminación. Los instrumentos de trabajo (pinzas, pipetas, tijeras, agujas, cápsulas de Petri) deben ser esterilizados antes de su uso. Muchos de estos instrumentos pueden ser colocados en etanol al 95% y, antes de ser usados, se deben flamear cuidadosamente en la llama de un mechero. También es necesario flamear la boca de los recipientes que contienen los medios de cultivo antes y después de cultivar el explante.
 - Incubar los cultivos en cámaras o cuartos de cultivo, cerrados, libres de corrientes de aire y bien higienizados. En lo posible se debe restringir la circulación de personas, y los recipientes con cultivos contaminados deben ser rápidamente

eliminados de este sector. Es conveniente que antes del lavado, estos cultivos sean esterilizados.

Medios de cultivo

Aunque actualmente se cuenta con una literatura detallada de técnicas de cultivos vegetales *in vitro*, con los protocolos correspondientes a muchas especies vegetales (Dixon 1985, Vidalié 1986, Conger 1987, Bajaj 1988, Pollard y Walker 1990, Roca y Mroginski 1991), 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.

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. 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 (Krikorian 1991).

Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* (Heller 1953, 1954, Murashige y Skoog 1962, Gamborg 1968 y 1970, Schenk y Hildebrandt, 1972, De Fossard 1976). Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento.

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 mM. Cuando estas fuentes son suplementadas en forma individual se afectan, generalmente en forma negativa, tanto el crecimiento del cultivo como la producción de metabolitos (Ertola *et al.* 1994). Pero, dado que el uso de nitrato exige una mayor demanda energética para la asimilación del nitrógeno si se compara con el amonio, algunos explantes crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido (Krikorian 1991), recomendándose en este caso la adición de un ácido orgánico como el succinato como agente bufferante.

Muchas células vegetales son sensibles a los niveles de fosfatos en el medio. Precisamente, el mantenimiento de los niveles de fosfato por debajo del óptimo para el crecimiento estimula entre 3 y 4 veces la acumulación de cinamoil-putrescina en cultivos de suspensiones de *Nicotiana tabacum* (Schiel *et al.* 1984) e incrementa la síntesis de alcaloides en *Catharanthus roseus* (Misawa 1985). 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 (Ertola *et al.* 1994). La concentración necesaria de fosfato indicada en los diferentes medios de cultivo varía entre 0.1 y 1.5 mM.

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos.

Para dar una idea de la cantidad de formulaciones disponibles, George *et al.* (2008), luego de revisar más de 3.000 trabajos científicos describen en dos tomos (casi 1.000 páginas en total) más de 2.000 medios de cultivo. También dos empresas multinacionales ofrecen para la venta más de 60 medios cada una, listos para su utilización especialmente en la micropropagación comercial de plantas. Los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran:

- Una fuente de carbono
- Nutrientes minerales
- Sustancias vitamínicas
- Sustancias reguladoras del crecimiento
- Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos)

Preparación y manejo de soluciones stock

Las soluciones Stock: son soluciones de cada uno de los compuestos constituyentes de los medios de cultivo (nitratos, sulfatos, halógenos, etc.) a una elevada concentración, lo cual facilita el manejo y la preparación de medios de cultivo a bajas concentraciones, de dichos compuestos.

Método de las cuatro soluciones

Preparación de una solución stock de macronutrientes MS x10 (solución 1)

Para obtener un litro de dicha solución llénesse un Erlenmeyer de 1 L con 500 mL de agua destilada. A continuación añádase cada uno de sus componentes (Tabla 1), disolviéndolo totalmente antes de añadir el siguiente:

Tabla 1. Preparación de una solución stock de macronutrientes MS x10 (solución 1).

Sustancias	Peso (en gramos)
NH ₄ NO ₃	16,5
KNO ₃	19,0
CaCl ₂ •2H ₂ O	4,4
MgSO ₄ •7H ₂ O	3,7
KH ₂ PO ₄	1,7

Para finalizar, bastará con verter el contenido en una probeta de 1 L, enrasar con agua destilada, trasladar la solución a su recipiente definitivo y agitarlo. Esta solución debe guardarse a 4 °C.

Preparación de una solución stock de micronutrientes MS x 100 (solución 2)

Para obtener un litro de dicha solución llenar un Erlenmeyer de 1 L con 500 mL de agua destilada. A continuación añadir cada uno de sus componentes (Tabla 2), disolviéndolo totalmente antes de añadir el siguiente.

Tabla: Preparación de una solución stock de micronutrientes MS x 100 (solución 2)

Sustancias	Peso (en gramos)
MnSO ₄ •4H ₂ O	2.230,0
ZnSO ₄ •7H ₂ O	860,0
H ₃ BO ₃	620,0
KI	83,0
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	25,0
CuSO ₄ •5H ₂ O	2,5
CoCl ₂ •6H ₂ O	2,5

Para terminar, proceder del mismo modo que con la solución stock de macronutrientes. Esta solución también debe almacenarse a 4 °C.

Preparación de una solución stock de hierro MS x 200 (solución 3)

Para obtener 100 mL de dicha solución deben seguirse los pasos siguientes:

- Calentar unos 50 mL de agua destilada en un agitador magnético preparado para tal propósito.
- Cuando el agua esté templada, añadir 556 mg de FeSO₄•7H₂O.
- Una vez se haya disuelto el producto anterior, agregar 744 mg de Na₂EDTA•H₂O.
- A continuación, añadir 1 lenteja de NaOH.

Ya disueltos todos los elementos, verter el contenido en una probeta de 100 mL, enrasar, trasladar la solución a su envase definitivo y etiquetar debidamente.

Esta solución se almacena a 4 °C.

Preparación de una solución stock de vitaminas y inositol MS x 200 (solución 4)

Para obtener 100 ml de dicha solución llenar un Erlenmeyer con unos 50 mL de agua destilada y añadir uno a uno, hasta total disolución los siguientes componentes (Tabla 3).

Tabla 3. Solución stock de vitaminas y inositol MS x 200.

Sustancias	Peso (en gramos)
Mio-inositol	2.000
Ácido nicotínico	10
Piridoxina•HCl	10
Tiamina•HCl	2
Glicina	40

A continuación, verter el contenido en una probeta de 100 mL, enrasar, llenar el recipiente definitivo con la solución y etiquetarlo.

La solución stock de vitaminas debe almacenarse a -20 °C.

Preparación de los medios de cultivos

Existen diversos procedimientos utilizados en la preparación de medios de cultivo. A continuación se describe de forma resumida la manera de preparar un medio de cultivo MS, para 250 mL.

Como primer paso se realizan los cálculos conocer las cantidades necesarias de cada una de las soluciones Stock, de sacarosa y de Phytigel, para la preparación de los medios de cultivo, para 250 mL.

Para lo cual se necesitan 5 mL de nitratos y 2.5 mL de los demás compuestos (soluciones stock). Se pesan 7.5 g de sacarosa y 0.7 g de Phytigel.

Después se vierten cada una de las cantidades de las soluciones Stock a un vaso de precipitado utilizando una probeta de 10 mL, se mezclan con una pipeta y se afora con agua destilada hasta los 250 mL. Después se agrega la sacarosa y se disuelve.

Posteriormente se procede a medir el pH (si hay necesidad se debe corregir el pH a 5.6), luego se coloca la solución en la parrilla de calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 78°C, e irle agregando paulatinamente el phytigel para lograr una mejor disolución. Se deja en ebullición durante 2 minutos, después se retira y se coloca sobre una superficie limpia. Finalmente se vierte en partes iguales en frascos ámbar (cerrados herméticamente) para guardarlos en el refrigerador a 4 °C.

Procedimiento para la elaboración del medio nutritivo

1. En un matraz de Erlenmeyer o en un vaso volumétrico se pipetea una a una las soluciones de micro y macronutrientes.
2. Agregar el volumen correcto de quelatos y vitaminas.
3. Disolver la sacarosa en agua destilada.
4. Mezclar todos los componentes mencionados y aforar con agua destilada a la cantidad que se desea preparar del medio.
5. Añadir las fitohormonas si el medio nutritivo lo requiere.
6. Introducir el electrodo del potenciómetro en la mezcla, se debe espera a que el equipo tome la lectura y ajustar el pH a 5.7. Para bajar el pH se debe aplicar gotas de HCl y para subirlo se aplica gotas de NaOH 1N.
7. Colocar el medio en el calentador – agitador y agregar el agar, mezclar hasta diluirlo completamente, antes de ebullición.
8. Dosificar el medio en recipientes, sean estos frascos, o tubos de ensayo, esterilizar durante 20 minutos en autoclave, considerando una temperatura de 120° C y 4 libras de presión.
9. Ya esterilizados los recipientes con el medio de cultivo, se colocan en el almacén de medios.

Soluciones madres (ejemplo para especies vegetales)

4 Tratamientos

1 BAP	0,25 mL /L
2KIN	0 ,25 mL /L
3BAP X KIN	0,25 mL / L x 0,25 mL
4 MS Testigo	

Macronutrientes

- En un matraz volumétrico se mide 500 mL de agua deshionizada.
- Pesar en una balanza analítica 33 g de Nitrito de Amonio.

- Mezclar 175 mL de agua con Nitrato de Amonio, no se utiliza los 500 mL de agua porque necesito para disolver las hormonas.
- Se pesa 38 g de Nitrato de Potasio y se disuelve en 25 mL de agua mezcla.
- Se mezcla el Nitrato de Amonio con el Nitrato de Potasio.
- Se pesa 7.4 g de Sulfato de Magnesio y se le agrega en el frasco donde van todas las soluciones.
- Se pesa 3.4 g de fosfato de Potasio y se le agrega donde están todas las soluciones.

Micronutrientes

Se utilizó 200 ml de Agua.

- Pesar 0.124 mg de Ácido Borico y se disuelve en 50 mL de Agua.
- Pesar 0.446 mg de Sulfato de Magnesio y se disuelve en agua.
- Pesar 0.172 mg de Sulfato de Zinc y se disuelve en agua.
- Pesar 0.05 mg de ácido Ascórbico y se disuelve en agua.
- Pesar 0.005 mg de Sulfato Cúprico y se disuelve en agua.
- Pesar 0.005 mg de Cloruro de Cobalto y se disuelve en agua.

Una vez teniendo todas las soluciones en el frasco con su respectivo nombre se lo guarda en la refrigerador

Cloruro de Calcio

Pesar 8.8 g y se disuelve en 200 mL de agua. Hierro EDTA pesar 0.746 mg disolver en 100 mL.

Hierro EDTA

Disolver 0.556 en 100 mL

Sulfato de Hierro

Disolver 0.556 en 100 mL.

Los 200 mL de soluciones se lo coloca en el frasco Ámbar (frasco de color café oscuro para que no penetren los rayos de luz).

Potasio yodo

Disolver 0,166 mg en 200 ml de agua.

Vitaminas gamborg

Inositol	2 gr
Ácido Nicotinico	0.02 mg
Piri doxino	0.02 mg
Tiomino	0.004 mg

Se disuelven en 200 mL de agua en el frasco ámbar

Hidróxido de Sodio

Subir el PH del medio de cultivo se lo prepara de 1 normal 2 g Se disuelve en 50 mL de agua, para bajar la concentración: 1 mL de hidróxido + 9 mL de agua. El PH normal es de 5.7 o 5.8.

Cisteina

Es un antioxidante que se utiliza en los medios de cultivo para evitar que el explante se oxide 0.5 mg. Se disuelve en 200 mL de agua.

Hormonas utilizadas

Citoquinas

KIN- KINETINA: Elongación de Brotes 0.05 en 100 mL de agua desionizada. Para preparar esta hormona se disuelve en 1 mL de Hidróxido de Sodio luego se procede a diluir en agua desionizada en 99 mL.

BAP: Benzylaminoporine: 0.05 mg en 100 mL de agua. Se dissolve la hormona en 1 mL de Hidróxido de Sodio y luego se procede a disolver en agua desionizada en 99 mL.

Ácido Ascórbico: 1 g/L Enjuague con agua estéril Se sumergen los explantes con cloro en 10% y 3 gotas de Twe durante 5 minutos. Luego se enjuaga con agua estéril hasta quitar todos los residuos.

Cabina de Flujo Laminar: Sumergir los explantes en povidin una concentración de 2mL x L por espacio de 10 minutos y luego se procede a enjuagar con agua estéril hasta quitar todos los residuos de povidin y luego se deja los explantes en Acido Ascórbico.

Medio de Cultivo

Macronutrientes	25 mL	BAP	KIN
Micronutrientes	10 mL	50 mL /100	50 mL /ml
Potasio	10 mL	1 0.5	1 0.5
Vitaminas	10 mL	0.25	0,25 g
Cistina	10 mL		
Sacarosa	25 g		
PH	5.8		
Agar	7 g/ L	0.5 mL/L	0.5 mL/L
Hierro	10 mL	0.25 mL/L	0.25 mL/L

Proceso metodológico

- Se procede a pipetear todas las soluciones cada uno con su respectiva cantidad en un matraz volumétrico.
- Una vez obtenido todo se disuelve en agua en un matraz de 200 mL los 25 g en el agitador magnético hasta que no quede ninguna partícula.
- Procedemos a disolver todo en el agitador magnético.
- Colocamos el nombre de las hormonas en los matraces cada uno con 500 mL.
- Medir las hormonas con su respectiva dosificación con la respectiva pipeta cada hormona con 0.25 mL.
- Se envasa el medio de cultivo MS los 1000 mL en cada matraz se coloca 500 mL.

- Procedemos a medir el PH en 5.8 una vez mezclado la hormona con el medio de cultivo para obtener el PH correcto que es 5.8 se le coloca Hidróxido de Sodio se agita en el agitador magnético.
- Se coloca en el medio de cultivo con 200 mL de agua en otro matraz hasta que hierva.
- Se pone en el Agar 3.5 g en cada hormona se deja hervir hasta diluir el agar.
- Se llevan los cultivos a la autoclave a 1.5 de presión a 121 °C por 15 min.
- Después de un periodo de 15 min. Se procede a llenar cada frasco cada uno con 10 mL.

Procedimiento para la siembra *in vitro*

- Pesar el Ácido Ascórbico 1 g en un litro de agua estéril en 2 matraces de 500 mL y diluir.
- Pesar el Hipoclorito de Calcio 1 g en 500 mL de agua.
- Pesar un volumen de 100 mL de cloro en 500 mL de agua.
- Envasar 20 mL de Povidin en agua estéril por 1L.
- En la cabina de flujo laminar dejar listo todos los materiales que se van a utilizar para la siembra: Agua estéril 6 frascos de 500 mL, los medios de cultivo, el bisturí con su mango, ácido ascórbico, alcohol, pinzas y povidin para realizar el respectivo enjuague antes de hacer los cortes y la respectiva siembra.
- Preparar los materiales para ir a realizar los cortes de los plantes de limón: tijeras, 2 matraces con ácido ascórbico cada uno con 500 mL, 2 recipientes uno con agua estéril y otro con alcohol (esto es para ir a realizar los cortes de las plantas en el invernadero).
- Cortar la cantidad suficiente de estaquillas y dividirlos en 2 matraces en el vivero donde se encuentran.
- Una vez obtenidas las estaquillas ingresar al laboratorio.
- Vaciar el ácido Ascórbico del matraz dejando las estaquillas.
- Enjuagar con agua estéril las estaquillas en los matraces.
- Colocar en un matraz con las estaquillas el Hipoclorito de Calcio con 3 gotas de Twe 80.
- Colocar en otro matraz con las estaquillas el Hipoclorito de Sodio con 3 gotas de Twe 80.
- Agitar los 2 matraces durante un tiempo de 5 min.
- Enjuagar los matraces con las estaquillas con agua estéril hasta quitar la espuma.
- Ingresar los matraces a la cabina de flujo laminar con su respectiva norma de asepsia.
- El estudiante debe ingresar con su respectivo uniforme para realizar la siembra.
- Vaciar el agua de los matraces.
- Colocar en cada matraz 500 mL de povidin.
- Agitar los matraces durante 10 min.
- Enjuagar con agua estéril hasta que no quede ningún residuo de povidin y dejar los explantes en Ácido Ascórbico.
- Realizar los respectivos cortes de 1.5 – 2 cm respectivamente e ir cortando los explantes con el bisturí.
- Una vez realizado los cortes se procede a la siembra en los medios de cultivo con una pinza cuidadosamente.
- Almacenar el MS con el explante en el lugar adecuado a 21°C.

- De acuerdo al diseño experimental ir colocando los medios bien sellados en las repisas.
- Realizar la respectiva limpieza de la cabina de flujo laminar.
- Todos los vidrios utilizados lavarlos.
- Realizar una limpieza en todo el laboratorio con cloro para desinfectar toda el área.
- Realizar 3 estudios cada 7 días por 21 días o de acuerdo a la evaluación que se vaya a realizar a los tratamintos.

Medio nutritivo base

Existen diferentes medios de cultivo, por lo que su selección depende del objetivo que se persiga, ya sea establecimiento *in vitro* o multiplicación.

Los explantes requieren de un medio que suministre un balance nutricional adecuado, para que a corto plazo se obtenga un crecimiento óptimo y los resultados deseados.

El medio base que se utilizó para la producción de plántulas *in vitro* de especies vegetales es el de Murashige y Skoog (1962); el cual se complementa con diferentes dosis de fitohormonas, vitaminas y ajustadores osmóticos.

Componentes de los medios de cultivo para la producción de plántulas *in vitro* de especies vegetales

Macronutrientes	25 mL /L
Nitratos	½ de las concentraciones
Micronutrientes	10 mL/L
Cloruro de Calcio	10 mL/L
Yoduro de Potasio	10 mL/L
Sulfato de Hierro	10 mL/L
Vitamina Gambort	10 mL/L
Cisteína	10 mL/L
Sacarosa	30 g/L
Agar	7 g/L
PH	5.7

Procedimiento para la elaboración del medio nutritivo

1. En un matraz de Erlenmeyer o en un vaso volumétrico se pipetea una a una las soluciones de micro y macronutrientes.
2. Agregar el volumen correcto de quelatos y vitaminas.
3. Disolver la sacarosa en agua destilada.
4. Mezclar todos los componentes mencionados y aforar con agua destilada a la cantidad que se desea preparar del medio.
5. Añadir las fitohormonas si el medio nutritivo lo requiere.

6. Introducir el electrodo del potenciómetro en la mezcla, se debe esperar a que el equipo tome la lectura y ajustar el pH a 5.7. Para bajar el pH se debe aplicar gotas de HCl y para subirlo se aplica gotas de NaOH 1N.
7. Colocar el medio en el calentador – agitador y agregar el agar, mezclar hasta diluirlo completamente, antes de ebullición.
8. Dosificar el medio en recipientes, sean estos frascos, o tubos de ensayo, esterilizar durante 20 minutos en autoclave, considerando una temperatura de 120° C y 4 libras de presión.
9. Ya esterilizados los recipientes con el medio de cultivo, se colocan en el almacén de medios.

Vida en anaquel del medio de cultivo

Siempre que sea posible se debe utilizar un medio de cultivo fresco de uno o dos días de preparación, ya que la vida de anaquel del medio de cultivo disminuye conforme aumenta el tiempo de almacenamiento teniendo un efecto en el crecimiento y desarrollo de los explantes. A temperatura ambiente, el medio de cultivo puede almacenarse por un tiempo máximo de una semana. Si se quiere aumentar el tiempo de almacenamiento el medio de cultivo tiene que refrigerarse + 5°C . En todos los casos el medio debe quedar almacenados en ares asépticas.

Esterilización

La esterilización es un proceso donde se efectúa la destrucción o muerte de los microorganismos en general, desde los protozoos, hongos, bacterias y virus. Se dice que un elemento es estéril cuando está libre de cualquier tipo de vida.

Tipos de esterilización

La esterilización puede ser utilizando los siguientes métodos:

Físicos

- Radiaciones: con luz UV, rayos gamma; (para esterilizar cámaras de flujo y áreas del laboratorio).
- Filtración: mediante filtros millipore (para esterilizar fitohormonas)
- Calor seco: a 170 °C por 1 hora (para esterilizar estufas, cristalería, pinzas, bisturí, etc.).
- Fuego directo: Con calentamiento al rojo blanco con mechero (para esterilizar pinzas, mangos de bisturí, etc.).
- Calor húmedo: utilizando autoclaves (para esterilizar medios de cultivo, agua, entre otros).

Químicos

- a) Gases: Óxido de etileno, Óxido de propileno, Formaldehído, bromuro de metilo, ácido peracético, ozono, betapropiolactona, vapores de peróxido de hidrógeno
- b) Líquidos: glutaraldehído, Iodóforos, alcohol.

Factores que intervienen en el proceso de esterilización

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por explante-medio de cultivo-condiciones físicas de incubaciones altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micropropagación se lo puede estimar en alrededor del 10%.

En el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican. Es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus y fitoplasmas, por lo que en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se quiere significar que son cultivos donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias. Dos son las fuentes de contaminaciones: a) microorganismos presentes en el interior o en la superficie de los explantes y b) fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio.

Esterilización con calor húmedo

La esterilización con calor húmedo con vapor bajo presión (en autoclave o en una olla a presión). Es el procedimiento más empleado para la esterilización de los medios de cultivo (salvo, como se indicó más arriba, para aquellos que posean componentes termolábiles).

En este caso, lo más común es usar una presión de 1.46 kg.cm^{-2} durante 20 minutos, con lo que prácticamente se destruyen todas las formas de vida. Es importante que en todos los puntos de la autoclave se alcance dicha temperatura, para lo cual hay disponibles cintas detectoras colorimétricas.

Nota: para medios de cultivo de 20 - 25 mL se recomienda a $121 \text{ }^\circ\text{C}$; 15 P.S.I (1.2 kg/cm^2) por 15 minutos.

Esterilización de material de cristalería y otros materiales

La esterilización en estufas mediante calor seco (aire caliente) es recomendable para esterilizar recipientes de vidrios secos (pipetas, cápsulas de Petri, tubos). En estos casos, 2-4 horas en estufas a $180\text{-}200 \text{ }^\circ\text{C}$ brindan excelentes resultados.

La mesa de trabajo y las paredes del gabinete deben ser desinfectadas previamente con etanol al 70%. De la misma manera deben ser desinfectados exteriormente todos los recipientes (conteniendo medios de cultivo, agua, etc.) que ingresen en el área del aire estéril.

Los operarios constituyen frecuentemente una importante fuente primaria de contaminación, porque es recomendable que, antes de comenzar a trabajar laven sus manos y antebrazos con abundante agua y jabón y se desinfecten con etanol al 70 %. La utilización de guarda polvos, guantes y máscaras protectoras de la boca y de la nariz, así como los gorros protectores de los cabellos, ayudan a reducir sensiblemente los niveles de contaminación. Los instrumentos de trabajo (pinzas, pipetas, tijeras, agujas, cápsulas de Petri) deben ser esterilizados antes de su uso. Muchos de estos instrumentos pueden ser colocados en etanol al 95% y, antes de ser usados, se deben flamear cuidadosamente en la llama de un mechero. También es necesario flamear la boca de los recipientes que contienen los medios de cultivo antes y después de cultivar el explante.

Esterilización de medios de cultivo

A continuación se presenta una tabla sobre la esterilización de medios de cultivo utilizando autoclave a 121 °C:

Volumen de la solución	Tiempo requerido para la esterilización
75 mL	25 min
250 mL	30 min
500 mL	30 min
1000 mL	35 min
1500	40- 40 min
2000	45 -45 min

Propagación de plantas por cultivo *in vitro*

Micropropagación

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación.

Con finalidad puramente descriptiva se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo *in vitro*, incluyendo:

Ambiente químico

- Composición del medio de cultivo
- pH

Ambiente físico

- temperatura
- luz y fotoperiodo
- humedad

Dentro del proceso de micropropagación diferenciamos varias fases o etapas:

- 0: Selección y Preparación de la planta madre
- 1: Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas
- 2: introducción del material seleccionado *in vitro*
- 3: Multiplicación de brotes
- 4: Enraizamiento
- 5: Aclimatación

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas *in vitro*; puede ser aplicada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas, pero en términos generales son comunes al proceso de propagación *in vitro*.

FASE 0:**Preparación de la planta madre**

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 (Figura 1).



Figura 1. Planta sana y vigorosa.

Recolección de explantes (Figura 2)

Para la recolección de explantes se utilizó:

1. Frasco con ácido ascórbico
2. Tijeras de disección
3. Plantas seleccionadas
4. Frasco de acero inoxidable con alcohol
5. Frasco de acero inoxidable con agua destilada

Se inicia el corte de las ramas de la especie vegetales eliminando sus hojas, dejando yemas axilares y yemas apicales de 3 cm de largo, segmentados en la parte superior en forma recta y el corte en bisel por la parte inferior, estos explantes son sumergidos en una solución de ácido ascórbico a concentración de 1g/L para evitar la oxidación fenólica.

FASE 1:**Desinfección del material 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 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.



Figura 2. Desinfección de material Vegetal

FASE 2:

Introducción del material *in vitro* (Figura 3)

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*.



Figura 3. Introducción del material *in vitro*

Siembra *in vitro*

En este proceso se utilizan materiales esterilizados como: tubos de ensayo con medios de cultivo, frasco con alcohol, vaso de Erlenmeyer, vaso de precipitación, cajas petri, pinzas, tijeras, bisturí, papel secante, papel de aluminio, mecheros. Además el personal debe ingresar a la cámara de flujo laminar con ropa quirúrgica desinfectada utilizando guantes y mascarilla.

El proceso realizado fue el siguiente:

1. Los explantes que se reservaron en ácido ascórbico luego del proceso de desinfección, se colocaron en cajas petri para secarlos.
2. Luego con la ayuda de una pinza se coloca el explante en el medio de cultivo procediendo así a la siembra sin seccionar los explantes, es decir que los explantes ya pasaron al flujo laminar para la siembra del tamaño deseado.
3. Se rotularon los tubos de ensayo con los explantes sembrados según el número del tratamiento aplicado pasando luego al área de crecimiento.

FASE 3:

Multiplicación de los brotes (Figura 4)

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas.

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.



Figura 4. Multiplicación de los brotes.

FASE 4:**Elección de un medio de enraizamiento de los explantos (Figura 5)**

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 cm. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.



Figura 5. Elección de un medio de enraizamiento de los explantos.

FASE 5:**Aclimatación de los explantos enraizados (Figura 6)**

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta (Figura 7).



Figura 6. Aclimatación de los explantos enraizados.

Proceso de micropropagación diferenciamos varias fases o etapas



Establecimiento de la propagación de *especies leñosas, frutícola y herbácea*



Figura 7. Marcha analítica para el establecimiento de la propagación de *especies leñosas, frutícola y herbácea*

La siguiente lista presenta una comparación de las características de una planta en condiciones de laboratorio (in vitro) respecto a una planta en condiciones naturales (in vivo):

In vitro

- No realiza fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones controladas
- Crecimiento en condiciones de asepsia
- Alta humedad relativa
- Estomas no funcionales
- Ausencia de pelos radiculares
- Ausencia de cera en la cutícula

In vivo

- Realiza fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones no controladas
- Exposición a los patógenos y gérmenes del ambiente
- Humedad relativa variable • Estomas funcionales
- Presencia de pelos radiculares
- Presencia de cera en la cutícula

Los plantines enraizados, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Estos plantines se plantarán en contenedores (almacigueras) cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, elegimos un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz quemado, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido. Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que estamos trabajando.

Luego de retirar cuidadosamente el agar de las raíces para evitar dañarlas, los plantines se enjuagan y se colocan en almacigueras con la mezcla de sustratos seleccionada y cubiertos con nylon. Todos los días se debe controlar el nivel de humedad en las almacigueras. Si es necesario, se aplica un riego con una pulverizadora manual, para mantener un ambiente húmedo a nivel del sustrato. A los 15 días del trasplante, se puede comenzar a levantar la cobertura de nylon en las horas de menor calor (temprano en la mañana o en la última hora de la tarde). Al comienzo las plantas se dejan media hora por día destapadas. A la semana siguiente se dejan destapadas durante una hora. Al mes del trasplante, se dejan tapadas durante la noche y si hay crecimiento de nuevas hojas, las plantas pueden permanecer destapadas. Las condiciones del cultivo in vitro, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia.

Propagación de especies leñosas

El empleo de clones en programas de reforestación genera al menos un 10 % de incremento en ganancia genética en relación con el empleo de plantas regeneradas por semillas de árboles selectos. Sin embargo, la máxima ganancia genética puede ser obtenida mediante el empleo conjunto de propagación sexual y agámica. La reproducción sexual es importante para la introducción de genes nuevos, prevenir los efectos de la endogamia y el

mejoramiento de características controladas por efectos aditivos de genes. La reproducción asexual, por otro lado, permite la multiplicación de individuos o grupos de individuos seleccionados de una población élite, que exhiben una significativa ganancia genética debida a efectos no aditivos de genes. Tradicionalmente, las especies forestales fueron propagadas vegetativamente mediante el enraizamiento de estacas, de braquiblastos en coníferas, así como también por injertos. La propagación por estacas de *Cryptomeria japonica* (kiri), *Populus* (álamo) y *Salix* (sauce) ha sido llevada a cabo durante siglos en Asia y Europa. Sin embargo, para la mayoría de los árboles propagados por estacas se observa una rápida pérdida de capacidad de rizogénesis al aumentar la edad de la planta donante de las estacas. En este sentido, una de las principales ventajas de la micropropagación es la capacidad potencial de desarrollar protocolos de multiplicación optimizados para multiplicar árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores.

Métodos de micropropagación

Los trabajos pioneros en el cultivo de tejidos cambiales de especies forestales condujeron, en el año 1940, a la formación de yemas adventicias en *Ulmus campestris*. Durante la década del 40 se publicaron logros adicionales en la producción separada de vástagos y raíces en especies latifoliadas. En 1950 se publicó por primera vez la obtención de organogénesis en coníferas, con la formación de vástagos a partir de callos de *Sequoia sempervirens*. En la década 1970-80 se obtuvieron las primeras plantas de álamo (*Populus tremuloides*) y *Pinus palustris*. En ambos casos la formación de plántulas se logró vía organogénesis. Luego del año 1975 la micropropagación de especies latifoliadas se realizó a través de la regeneración indirecta, pasando por una etapa de callo. Actualmente, la multiplicación in vitro de coníferas y latifoliadas se logra a través de tres vías, 1) brotación de yemas adventicias, 2) producción de yemas adventicias y 3) embriogénesis somática. La brotación de yemas adventicias emplea ápices de vástagos, yemas laterales y microestacas. Es el principal método utilizado para especies latifoliadas. En las coníferas, la elongación de las yemas axilares a partir de braquiblastos de plantas adultas no ha sido muy exitosa. En latifoliadas de clima templado los mejores explantos los constituyen las yemas y vástagos en activo crecimiento más que las yemas en estado de dormición. Los vástagos se colectan en primavera y a principios del verano a fin de obtener material con reducido nivel de contaminación. Alternativamente, las yemas en dormición pueden ser colectadas y brotadas en condiciones ambientales controladas. Para la inducción de vástagos, tanto en gimnospermas como en angiospermas, se requiere el empleo de citocininas. Las más usadas son la N6-benciladenina (BA) y el tidiazurón (TDZ).

Los medios basales más usados para angiospermas son el MS (Murashige y Skoog, 1962) o el WPM (Lloyd y Mccown 1980). Para el caso de gimnospermas, el empleo de medios reducidos en sales minerales y baja cantidad de nitrógeno resulta mucho mejor que el empleo de un medio altamente salino y nitrogenado como el MS. La inducción de yemas adventicias es el método más empleado para gimnospermas y angiospermas. En este caso, las yemas se inducen directamente sobre el explanto en general sin previo pasaje por una etapa de callo.

En general, cuanto más joven es el tejido, tanto mayor es la respuesta a los tratamientos que conducen a la organogénesis de novo. Los explantos más frecuentes son embriones cigóticos maduros, seguidos de cotiledones y epicótilos de plántulas. Generalmente se utiliza BA a concentraciones mayores o iguales a 5 ppm como única fuente de inducción o en combinación con otras citocininas. La adición de auxinas puede ser beneficiosa, aunque en coníferas se ha encontrado que promueve la formación de callo y reduce el proceso de organogénesis. En algunos casos, como en *Populus* spp., la formación de yemas

adventicias se logra a partir de un callo originado a partir de tejido cambial. El método llamado multiplicación mediante nódulos meristemáticos es un método también utilizado para pino radiata y álamo. En este caso se obtiene básicamente un tejido meristemático (no un verdadero callo) usando relaciones altas de auxina/citocinina para luego inducir la producción de vástagos. La disponibilidad de protocolos vía embriogénesis somática para especies forestales es aún limitada. En las angiospermas los primeros embriones somáticos se obtuvieron de *Santalum album*, donde sin embargo, no fue posible la obtención de plantas completas. Veinte años después pudieron lograrse plantas completas de abeto (*Picea abies*), una gimnosperma.

En las gimnospermas los mayores éxitos se lograron empleando como explantos embriones cigóticos maduros e inmaduros. En la mayoría de los casos los embriones se originan en forma indirecta a partir de callos embriogénicos o bien, directamente, desde el explanto. En las coníferas puede ocurrir un proceso de poliembrionía, previa formación de callo que conduce a una alta tasa de multiplicación inicial. En general, los medios de cultivo más efectivos para estos fines contienen elevados niveles de sales y suministran nitrógeno tanto como NH_4^+ y NO_3^- . Las auxinas más comúnmente empleadas en el medio de inducción son el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y el ANA (ácido naftalenacético), en concentraciones mayores de 2 μM . En algunos casos es necesario además el empleo de alguna citocinina, generalmente en concentraciones mayores a 1M si se trata de BA y entre 0.1-1 M en el caso del TDZ.

Condiciones de cultivo

Los explantos jóvenes de especies leñosas, particularmente angiospermas, a menudo secretan al medio de cultivo polifenoles oxidados, visibles como pigmentos marrones y/o negros. Se observa también que en los explantos de árboles adultos el problema se acentúa. Por ello se recomienda el empleo de explantos primarios juveniles. Los tipos de explantos más utilizados para el establecimiento *in vitro* son los segmentos nodales de explantos juveniles, las yemas axilares obtenidas por rejuvenecimiento de plantas adultas, y los embriones cigóticos y plántulas obtenidas de semillas de origen sexual. La desinfección de los mismos se logra mediante inmersión en etanol al 70 % (1 a 2 minutos) seguido de una solución de lavandina comercial conteniendo de 0.8 a 2.4 % de hipoclorito de sodio durante 5-30 minutos. En la mayoría de los casos se emplean agentes tensos activos, tales como Tritón X-100 y Tween20, adicionados en la solución de lavandina. En todos los casos los explantos son lavados finalmente varias veces con agua destilada estéril. Los medios basales más empleados son el MS, formulado por Murashige y Skoog (1962), diluido a la mitad o a un cuarto de su formulación original o el WPM, formulado por Lloyd y McCown (1981). Como medios de multiplicación se emplean además el BTM (broadleaved tree medium, Chalupa 1983) y el medio de Périnet y Lalonde (1983). Los reguladores de crecimiento más utilizados son el ácido naftalenacético (ANA) y la benciladenina (BA). También han sido efectivas auxinas como el ácido indol-butírico (IBA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y citocininas como la 2-isopentil amino purina (2iP), cinetina (CIN), zeatina (Z) y tidiazurón (TDZ). En general, los cultivos se incuban a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ con 14 horas de fotoperíodo e intensidades lumínicas moderadas. En la Figura 8 se muestran las etapas de la micropropagación de plantas de paraíso gigante, *Melia azedarach* var. *gigantea* L. (Olmos *et al.* 2002).

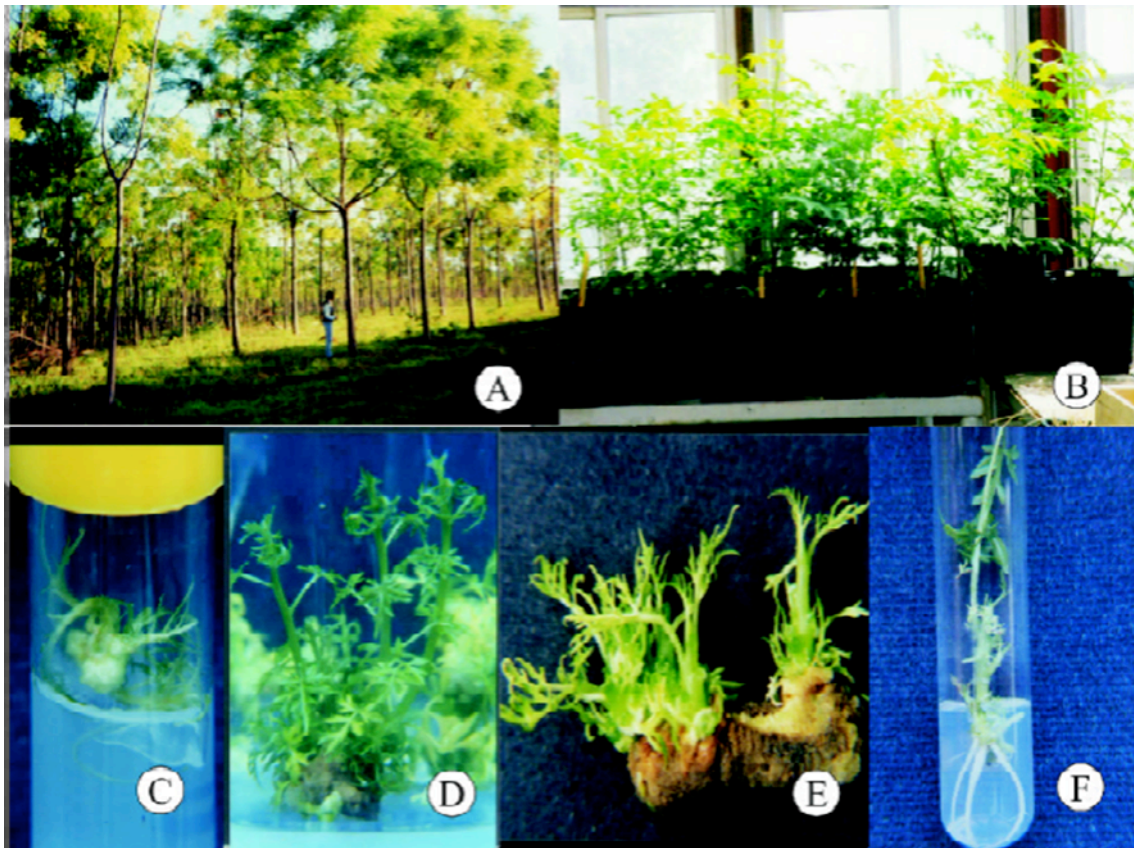


Figura 8. Etapas de la micropropagación en plantas de paraíso gigante, *Melia azedarach* var. *gigantea* L. (Olmos *et al.* 2002): **A)** Huerto semillero de paraíso gigante con ejemplares de seis años de edad, provincia de Misiones, Danzer Forestación S.A. Las semillas de los genotipos seleccionados fueron empleadas para generar una población de plantas donantes de explantos. **B)** Etapa 0, Preparación del material vegetal: plantas de origen sexual de 6 meses de edad crecidas en condiciones de invernadero y utilizadas como donantes de meristemas. **C)** Etapa 1: Establecimiento del cultivo: vástagos desarrollados a partir de meristemas luego de 30 días sobre medio de establecimiento (Medio basal de Murashige y Skoog, 1962 (MS) suplementado con 2,22 M 6-bencil amino-purina (BAP) + 0,29 M ácido giberélico (GA) + 0,25 M ácido 3-indolbutírico (IBA). **D)** Etapa de Multiplicación: vástagos luego de 30 días sobre medio de multiplicación (medio MS suplementado con 2,22 M BAP, estos vástagos fueron empleados como explantos para los subcultivos siguientes o para pasar a la etapa de enraizamiento. **E)** Explantos provenientes de la etapa de multiplicación con problemas de vitrificación y presencia de callo. En estos casos, el medio de multiplicación para los cultivos subsiguientes fue modificado reduciendo la concentración de BAP a 0,44 M. **F)** Vástago enraizado en medio de MS con la concentración salina reducida a la mitad, suplementado con 9,89 M IBA durante 2 días, seguido por el subcultivo en medio basal durante 30 días hasta estar listo para pasar a la etapa de aclimatación.

Problemas asociados a la micropropagación de especies leñosas

Es mucho más difícil propagar material adulto que juvenil ya que los primeros son recalcitrantes, es decir, difíciles de regenerar. Sin embargo, aún en estos casos es posible extraer explantos de mayor capacidad regenerativa mediante dos formas: 1) seleccionando los tejidos más juveniles dentro de un árbol o 2) induciendo el rejuvenecimiento del árbol donante antes de aislar los explantos. Para seleccionar el

material más juvenil en una planta adulta hay que considerar el fenómeno de topófisis. Este es un proceso por el cual el tipo de crecimiento de un nuevo individuo está determinado por la posición que ocupaba en la planta adulta. Esto es ocasionado por efecto del envejecimiento fisiológico e implica que los explantos más reactivos *in vitro* se encuentran en las yemas de las áreas basales del tronco y raíces. A su vez, el rejuvenecimiento es un proceso de reversión temporaria de las características adultas que permite lograr material vegetal en estado de juvenilidad. En general, a fin de contrarrestar los efectos debidos a la topófisis, se recomienda emplear tejidos juveniles y un tamaño de explanto muy pequeño. La juvenilidad puede lograrse por dos métodos. En primer lugar, mediante el empleo de órganos juveniles separados de plantas adultas, la utilización de estacas enraizadas o bien de brotes epicórmicos. En segundo lugar, mediante el rejuvenecimiento de partes adultas, la iniciación de yemas adventicias y embriones (en este caso se logra un rejuvenecimiento total por el inicio de un nuevo ciclo ontogénico), del injerto de yemas adultas sobre pies juveniles, de tratamientos con reguladores de crecimiento (como citocininas como el BA), por la poda severa (recepado de árboles adultos) y a través del cultivo *in vitro* de meristemas.

Tanto los atributos de supervivencia a campo, como la tasa de crecimiento, el plagiotropismo y la susceptibilidad a enfermedades de las plantas, tienen una correlación directa con la calidad de los vástagos durante el cultivo *in vitro*. Un problema crucial a resolver en cada sistema de propagación es la calidad diferencial de las raíces de las plantas regeneradas en relación con aquellas obtenidas por semillas. Por ejemplo, las plantas regeneradas de *Pinus elliotti* suelen tener una raíz principal no ramificada y gruesa. En cambio, las plantas obtenidas a través de semillas tienen raíces más delgadas y de mayor crecimiento lateral que permiten comparativamente un mejor anclaje y una mayor resistencia a los vientos.

Propagación de especies herbáceas

La micropropagación de especies herbáceas está orientada a proveer material libre de patógenos, propagar material seleccionado por su mayor rendimiento o por su mayor resistencia a enfermedades y estreses ambientales, conservar la diversidad específica en bancos de germoplasma, obtener material para estudios fisiológicos y genéticos y sentar las bases para la aplicación de técnicas de ingeniería genética.

Existe una gran variedad de protocolos, desarrollados en función de la especie y de los objetivos de la propagación. Existen protocolos generales para monocotiledóneas como en el caso ciertos cereales (trigo, maíz, cebada, avena, arroz), pasturas (pasto bermuda, festuca alta, raigrás, pasto llorón) y hortícolas (cebolla, ajo, puerro); protocolos generales para dicotiledóneas que incluyen especies hortícolas (tomate, papa, pimiento y zanahoria) y leguminosas forrajeras (alfalfa, maní, trébol blanco) y protocolos para especies modelo como *Arabidopsis* y tabaco. En todos los casos, las formas de propagación son las mismas. Se emplean vías de regeneración por formación de yemas axilares, yemas adventicias y embriogénesis somática. En los dos primeros casos, el sistema de propagación a través de la organogénesis directa asegura la estabilidad genética de las plantas regeneradas y se emplean cuando el objetivo es la propagación clonal a gran escala. La embriogénesis u organogénesis indirecta, con formación de callo, se emplea en cambio para generar variabilidad en programas de mejoramiento.

En el caso de ajo y cebolla, por ejemplo, las etapas de la micropropagación incluyen tanto la multiplicación de yemas axilares por el cultivo de meristemas, la formación directa de yemas adventicias en explantos obtenidos a partir de placas basales o umbelas inmaduras y la formación indirecta de yemas adventicias y/o embriones

somáticos obtenidos a partir de callos que provienen de distintos tipos de explantos (meristemas, brotes, placa basal ó raíces). En el caso de alfalfa y otras leguminosas como soja y maní, la micropropagación es llevada a cabo por la vía de la embriogénesis somática, donde los embriones se obtienen utilizando tejidos juveniles (embriones, cotiledones y pecíolos) como explantos. En algunos casos como pasto llorón (*Eragrostis curvula*) es posible la regeneración de plantas mediante embriogénesis, organogénesis y regeneración directa a partir de los explantos

Manejo del material trasplantado

Para el trasplante se debe lavar y desinfectar la raíz de la planta para evitar que se propaguen hongos por residuos del medio de cultivo.

A veces se recomienda en algunas plantas realizar el corte de raíces y que sean estas trasplantadas utilizando enraizador (hormonas de crecimiento radicular).

Se recomienda la seguir el siguiente manejo:

Factor de manejo	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Luz	80% sombra	60% sombra	30% sombra	30% sombra
H. R. Alta	uso de nebulizadores	cámara húmeda	Disminuir paulatinamente la nebulización	Evitar la nebulización, Se eliminan las bolsas.
Riego (agua)	Agregar solución MS al 50% en el riego	Evitar la solución MS.	Evitar la solución MS	Evitar la solución MS.
Sustrato	Peat-mos	aireación	drenaje, etc.	

Trasplante y adaptación bajo condiciones de invernadero

Después de la fase de aclimatación las plantitas son trasplantadas en bolsas de polietileno con sustrato adecuado que permite el buen desarrollo de las plantas. Este proceso dura de 7 a 9 meses, después de este período está listas para ser sembradas en campo definitivo.

Metodos de propagacion vegetal (*ex vitro*)

La **propagación vegetativa** constituye un conjunto de técnicas agronómicas utilizadas desde hace mucho tiempo y se considera un método de reproducción asexual en vegetales.

Tipos de Propagación

Se indican dos tipos de propagación de plantas que se observan en la naturaleza: sexual o gámica y asexual o agámica, en las cuales se puede lograr una diversidad de técnicas de siembra dependiendo del tipo de especie que se vaya a propagar.

Propagación Asexual

También conocida como propagación indirecta o agámica. Se efectúa con partes de una planta, provista de yemas y con capacidad de enraizamiento para originar nuevos

individuos o insertando dichas yemas a otras plantas afin y capaces de soldar sus tejidos para proseguir su desarrollo normal. De esta manera puede asegurarse la plena transmisión de los caracteres fijos de una variedad vegetal (Saenz y Sánchez 1993).

Este tipo de propagación consiste en la reproducción de individuos a partir de porciones vegetativas de las plantas cuyos órganos vegetales tienen la capacidad de regenerarse (Chamba 2002). La propagación asexual o vegetativa es la reproducción de las plantas sin intervención de las semillas; y la procedencia de las plantas no es otra cosa que la propagación de esta (Cuculiza 1985).

La propagación vegetativa o clonación se define como la reproducción de una planta a partir de una célula, un tejido, un órgano (raíces, tallos, ramas, hojas). En teoría, cualquier parte de una planta puede dar origen a otra de iguales características, según sean las condiciones de crecimiento como luz, temperatura, nutrientes, sanidad, etc. (Rojas *et al.* 2004)

Propagación Sexual

Algunos autores afirman que la reproducción sexual de los árboles, donde la semilla es el medio principal, constituye el método más importante por cuanto se producen plantas más vigorosas, adaptables y sanas. El método según estos autores, presenta una serie de eventos de tipo biológico cuya comprensión y entendimiento permiten establecer los procedimientos a seguirse en el campo silvicultural, sobre todo en el manejo de semillas.

La reproducción sexual en los árboles aporta diversidad genética a la población, que favorece a los individuos forestales para su adaptación futura a condiciones ambientales cambiantes.

El uso de semillas es la forma más común de propagación forestal. Generalmente la propagación de plantas por medio de semillas se caracteriza por: a) permite almacenar el material reproductivo para tener disponibilidad en época apropiada, b) permite producir grandes cantidades de material plantable, c) o se requiere de personal especializado para la producción.

La propagación vegetativa se justifica en casos de:

1. Establecer huertos semilleros.
2. Establecer bancos clonales, donde se efectúan trabajos de polinización dirigida, por la facilidad de tener flores a poca altura.
3. Propagar especies amenazadas de extinción, que no tienen capacidad de producir semillas.
4. Conservación del germoplasma amenazado a desaparecer.

Propagar plantas seleccionadas a gran escala. Su utilidad depende entre otros factores de:

- *Facilidad de manipulación de las especies:* muchas son difíciles de propagar vegetativamente, mientras que otras son muy fáciles.
- *Control del desarrollo de las partes propagadas:* En algunos casos se presenta el fenómeno de la TOPOFISIS, es decir el desarrollo de la parte propagada, es influenciada por la parte del árbol de donde proviene.

A través de la propagación de estacas se pueden iniciar muchas plantas en un espacio limitado, partiendo de unas pocas plantas madres, este es un método poco costoso,

rápido y sencillo; puesto que no necesita de técnicas especiales a emplear.

Además, lo importante de este tipo de propagación es la homogeneidad de las nuevas plantas obtenidas, no se presentan problemas de incompatibilidades en la propagación, y se conservan las características genéticas .

Fases del ciclo asexual

El ciclo asexual se inicia desde que se separa una porción de la planta y se regenera de ella una nueva planta. Cualquier parte de una planta, en cualquier fase de su ciclo, puede escogerse como material inicial.

- **Fase vegetativa:** Comprende el crecimiento de la planta por alargamiento de raíces, tallos, ramas y hojas. Las plantas de este tipo, cuando llegan a su fase adulta, responden con facilidad a los estímulos de floración.
- **Fase reproductiva:** Finaliza el crecimiento de los tallos y raíces y los puntos de crecimiento se diferencian en yemas florales, que finalmente producen flores, frutos y semillas

Propagación por estacas

En la propagación por estacas, una parte del tallo, de la raíz o de la hoja se separa de la planta madre, se coloca bajo condiciones ambientales favorables y se le induce a formar raíces y tallos, produciendo así una nueva planta independiente, que en la mayoría de los casos es idéntica a la planta de la cual procede.

La propagación por estacas consiste en cortar brotes, ramas o raíces de la planta, las cuales se colocan en una cama enraizadora, con el fin de lograr la emisión de raíces y brotación de la parte aérea, hasta obtener una nueva planta (Rojas *et al.* 2004) .

Selección del material de propagación

Condición fisiológica de la planta madre:

El vigor de la planta madre, ejerce una gran influencia en el desarrollo radicular de las estacas hijas, porque estas plantas contienen abundante carbohidratos.

Plantas pobres en carbohidratos, son suaves y flexibles, mientras que las ricas son firmes y rígidas. El contenido de carbohidratos se puede determinar mediante la prueba de yodo, sumergiendo el extremo de las estacas por un tiempo de 2 min en una solución de 0.2% de yoduro de potasio. En especies difíciles de enraizar, se puede emplear diversos tratamientos para alterar las condiciones fisiológicas y/o nutricionales de la planta madre.

La planta donante debe ser fertilizada con regularidad y mantener por lo menos una rama con hojas que pueda continuar fotosintetizando y que de esta manera sirva como brote alimentador para la planta donante. En lo posible la planta donante debe mantenerse en la sombra, al menos por unas semanas, evitando el estrés hídrico, lo cual favorecerá el futuro enraizamiento de las estacas.

Edad de la planta madre

Las estacas tomadas de plantas jóvenes (Fase de crecimiento juvenil), enraízan con mayor facilidad que aquellas tomadas de plantas viejas (Fase de crecimiento adulto). Los tratamientos para mantener la fase juvenil, será de mucho valor para evitar la declinación del potencial de enraizamiento de la planta madre.

La relación entre el estado juvenil y el enraizamiento puede explicarse a que la

producción de inhibidores se incrementa a medida que la planta aumenta en edad. Las estacas de tallos jóvenes de varias especies de eucaliptos enraízan con facilidad, pero a medida que las plantas madres envejecen el enraizamiento disminuye considerablemente.

En especies difíciles de enraizar, resulta útil inducir el rejuvenecimiento en plantas adultas, podando las plantas madres, injertando formas adultas sobre formas juveniles, aplicaciones de giberelinas.

Propagación vegetativa

La propagación vegetativa con la utilización de hormona enraizante es una de las técnicas que ha demostrado gran utilidad, en la propagación agámica de plantas leñosas, por la uniformidad que presentan sus plantas. Además como ventajas de la propagación clonal se cita que se puede propagar en periodos de tiempos relativamente cortos en comparación con el método mágico y además no se necesitan grandes cantidades de individuos para tomar las yemas puesto que se parte de árboles seleccionados (Montequis 1998, Ramos 2000). Esta vía puede ser una alternativa válida para reproducir genotipos en peligro de extinción.

La propagación vegetativa de árboles forestales es ventajosa puesto que captura en su totalidad lo genético y produce rápidos resultados con mejoramiento en los rasgos, aditivos y no aditivos. Es una forma de multiplicar fuentes seleccionadas de semillas.

En la multiplicación por estacas solo es necesario que un sistema de raíces adventicias se desarrolle, ya que la estaca posee yemas latentes, con aptitud potencial para desarrollar nuevos vástagos.

Reguladores de Crecimiento

Went y Timan citado por (Bidwell 1979), definieron a las hormonas de crecimiento como sustancias que siendo parte de un organismo son transferidos a otro y en esta influyen un proceso fisiológico específico. Así pues, en las plantas se desarrollo en un alto grado el principio de la regulación hormonal. La integración de las actividades de unos órganos con las de otros se realiza en gran parte gracias a la síntesis, transporte y utilización de mensajeros químicos particulares y específicos que son las hormonas del crecimiento.

Fitohormonas

Llamadas también hormonas vegetales, son sustancias naturales que se forman en diversos tejidos u órganos de las plantas y luego son transportadas por la sabia a otros tejidos u órganos del propio vegetal, donde en pequeñas cantidades cumplen una función importante, ya sea acelerando o retardando el efecto de algún estímulo físico - químico. Hay hormonas vegetales que promueven o favorecen el desarrollo básico de los cultivos, tales como las auxinas, giberelinas, citoquininas y también el etileno, igualmente se encuentran otras que retrasan o inhiben ciertas funciones, como la abscisina y los inhibidores fenólicos terpénicos.

Auxinas

Las auxinas son un grupo de fitohormonas que funcionan como reguladoras del crecimiento vegetal. Esencialmente provocan la elongación de las células. Se sintetizan en las regiones meristemáticas del ápice de los tallos y se desplazan desde allí hacia otras zonas de la planta, principalmente hacia la base, estableciéndose así un gradiente de concentración. Este movimiento se realiza a través del parénquima que rodea a los haces vasculares.

Las auxinas en efecto intervienen en el control de crecimiento del tallo y de la raíz, en la inhibición de las yemas laterales, en la abscisión de las hojas y de los frutos, en el crecimiento de estos y en una veintena de actividades fisiológicas vegetales. Las sustancias más utilizadas para estimular el crecimiento radicular de brotes son el Ácido Indol Butírico AIB y el Ácido Naftalen Acético ANA, según Valarezo (1984), citado por (García 2008).

Se conoce que la mayor parte o la totalidad de la actividad fisiológica de las plantas está determinada por los reguladores de crecimiento vegetal, las auxinas (del griego auxein, crecer). Estas auxinas se encuentran en muchísimas especies vegetales, principalmente en las plantas superiores de forma natural. Las concentraciones más altas de auxinas se encuentran en los ápices de crecimiento, sin embargo, se pueden encontrar ampliamente distribuidas por toda la planta.

Las pruebas que se han realizado indican que las auxinas son transportadas dentro de las raíces, desde la base hasta el ápice radical, esto es en dirección basípetala, hecho confirmado en raíces de muchas especies forestales (Torrey 1976). La hormona es transportada hacia abajo por un mecanismo especial denominado sistema de transporte polar. El ácido indolbutírico se mueve a través de los tejidos estrictamente en dirección basal, sin importar orientación, influencia externa de luz y gravedad.

Por otra parte, es conocido que de acuerdo a las reservas alimenticias que tiene la raíz y la acumulación de AIB, se dispondrá en mayor o menor grado la brotación de raíces y el crecimiento de planta. Cuando se elabora la pseudoestaca se realiza una poda de raíces y hojas que permiten el trasplante de estas al lugar definitivo. De allí que es importante conocer el efecto del AIB en la producción de raíces que definirá el éxito en el crecimiento de las unidades experimentales.

El efecto de las auxinas en las raíces ha resultado ser de gran valor hortícola en la propagación de plantas por estacas. El tratamiento de estas en la época de su preparación con auxinas del tipo AIB (Ácido Indolbutírico), es ahora una práctica generalizada, con ella se aumenta tanto el número de raíces formadas, así como el porcentaje de brotes. Se incrementa así mismo el vigor y el rendimiento total de la descendencia obtenida por métodos vegetativos.

Existen varias auxinas llamadas naturales, que incluyen ácido indol acético, indol-3-acetonitrilo, carboxialdehído, acetaldehído, entre otros grupos hormonales. De esta la más empleada es el AIA (ácido indol acético), pero existen otras hormonas sintéticas que cumplen con los mismos propósitos y son de más fácil obtención.

También se utiliza ampliamente en un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente; son las llamadas auxinas sintéticas, entre las cuales el 2,4 D, el ANA (ácido indol acético) y el AIB (ácido indolbutírico), se encuentra ampliamente disponible y se utiliza normalmente.

En la práctica, el uso de las auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de las auxinas que se debe utilizar en un solo caso. Sin embargo, en particular se utiliza el ANA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg por litro, con un punto óptimo que va desde 1 a 5 mg/L. El AIB generalmente se utiliza en concentraciones levemente mayores de 1 a 10 mg/L (Roca y Mroginski 1991). El papel central de las auxinas es el desencadenamiento hormonal de la rizogénesis, que viene sugerido a la vez por las aplicaciones de auxinas exógenas y por las dosificaciones de la hormona.

Citoquininas

Las citoquininas son el grupo de hormonas vegetales menos conocidas, la falta de éxitos en este campo se debe principalmente a la imposibilidad de realizar estudios genéticos ya que por el momento no se han obtenido mutantes con defectos en la biosíntesis de citoquininas.

Las citoquininas son sustancias que promueven la división celular y ejercen otras funciones reguladoras del desarrollo de las plantas de forma similar a las quininas. En las plantas, la citoquininas se encuentra como bases libres. Por el momento se desconoce el mecanismo de acción de la citoquininas, aunque se asume que la unión a un receptor específico, aún no está totalmente caracterizado (Joaquín y Bieto 1982).

Enraizamiento

Wise y Calwell (1992), fueron los primeros en concluir que la capacidad para formar raíces y las estacas de tallo, declina rápidamente después de los tres años de edad de la planta. Ellos probaron 21 especies, entre éstas siete coníferas incluyendo cuatro de pinos; los cuales incluso en aquel tiempo fueron considerados muy difíciles de propagar por estacas. Con un año de edad estos pinos enraizaron razonablemente bien (46 – 98%), y muy pobremente dos años después (0 - 12%). Los mismos autores afirman que el enraizamiento está más relacionado con la fase de estaca lignificada que con la edad de la planta donante, por tanto la capacidad de enraizamiento varía con la posición de la estaca en el árbol. El medio de enraizamiento se obtiene con arena gruesa, grava fina o tierra de sembrado, debe estar desinfectado, húmedo y bien aireado. Su capacidad de retención es baja y puede mejorar adicionando aserrín.

Los esquejes de diversas especies de plantas enraízan con facilidad en gran variedad de medios, pero en las plantas de difícil enraizamiento el sustrato influye en el porcentaje de enraizamiento y en la calidad de las raíces (Hartmann y Kester 2002).

Se manifiesta que el mejor sustrato lo constituye la arena, y la edad óptima de los brotes para el proceso de propagación vegetativa es de 45 días. Recomiendan utilizar arena como sustrato en la propagación de especies forestales, que facilita el drenaje, ya que el exceso de agua alrededor de la base de las estacas o brotes obstruyen el paso del oxígeno para el desarrollo de las raíces iniciales (Pettao 2007).

Preparación de las concentraciones hormonales de AIB

Se utilizan los siguientes materiales:

- Hormona ácido indol 3 butírico (AIB).
- Talco industrial.
- Balanza de precisión.
- Alcohol potable.
- Matraz Erlenmeyer de 100 y 250 ml.
- Estufa.
- Espátula, agitador de cristal, colador y frascos de 100 ml con tapa rosca

Antes de iniciar la preparación de las distintas concentraciones hormonales de AIB, se debe calcular los pesos exactos de cada concentración hormonal a preparar mediante una regla de tres simple (Figura 9).

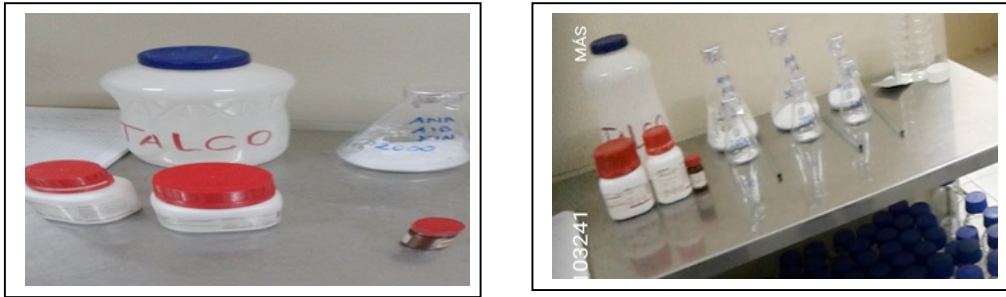


Figura 9. Hormonas para preparación.

Una vez que obtenidos los pesos exactos, se continúa con el proceso de la preparación:

1. En una balanza de precisión se pesa el talco industrial, el cual se utiliza unos 25g. El talco se tamiza utilizando un colador pequeño y se lo deja reposando en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, para su posterior uso.
2. Se realiza el pesado de cada concentración hormonal y se la diluye en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, utilizando 3 mL de alcohol, quedando lista para ser utilizada.
3. Luego se procede a verter la hormona al talco que estaba en reposo en el matraz de 250 mL, agregando 15 mL de alcohol y agitando constantemente por varios minutos hasta revolver bien, consiguiendo así una pasta uniforme y quedando lista para ser secadas.
4. Las distintas concentraciones hormonales fueron llevadas en su respectivo matraz a la estufa y permanecen dentro de ella por un espacio de 6 horas a una temperatura de 40°C.
5. Luego de las 6 horas se procede a sacar los matraces de la estufa, a los cuales ya se le había evaporado el alcohol quedando nuevamente el talco en su estado natural pero con la diferencia de que en cada matraz tiene una concentración de hormona preparada.
6. Se procede a retirar la hormona de los matraces y se las deja reposando en un frasco con tapa rosca de 100 mL, quedando así lista parara su utilización.

Conclusiones

La biotecnología vegetal permite la transferencia selectiva de una mayor variedad de información genética de una forma precisa y controlada mediante la utilización de técnicas que permiten desarrollar variedades con caracteres específicos deseables y sin incorporar los que no lo son.

Las características desarrolladas en las nuevas variedades protegen a las plantas de insectos, enfermedades, malas hierbas, etc.; e incorporar mejoras en la calidad, aumento del valor nutritivo, lo que conlleva a producir en abundancia, saludable y proteger el medio ambiente. En el cultivo de tejidos las separaciones de explante y las operaciones relacionadas con su incubación in vitro, depende en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo empleada; por lo cual las técnicas que se empleen, no son exactamente

las mismas para meristemas. Los cultivos *in vitro* requieren técnicas heterogéneas donde los explante requieren condiciones controladas y asépticas.

Las técnicas de la manipulación genética son importantes en el contexto general de la agricultura moderna; donde la biotecnología agrícola conecta aéreas como: Biología Molecular y Celular con prácticas agrícolas tradicionales produciendo nuevas variedades de plantas y técnicas de multiplicación que se utilizaran a futuro.

Laboratorio de cultivo de tejidos del centro de biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM)

Desde el año 2011, el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del centro de Biotecnología de la UNESUM, localizado en el Campus los Ángeles, ha estado trabajando en el ajuste de sistemas de multiplicación *in vitro* para diversas especies. El objetivo de estos trabajos de investigación es incorporar la micropropagación, como herramienta a los programas de mejora genética de UNESUM, en diferentes especies para acelerar y optimizar los procesos de evaluación a campo. Las especies vegetales estudiadas han sido: cítricos, especies aromáticas, especies de plátano, banano, café, especies forestales y otras

A través de la propagación *in vitro* se ha podido disponer de material vegetal en diversas especies para su evaluación rápida. En especie como *Cordia alliodora*, esta técnica está incorporada al esquema de selección y propagación del programa nacional forestal, La multiplicación *in vitro*, permite la obtención de material con condiciones de sanidad superiores a los obtenidos por vía convencional. Las especies leñosas como los frutales de hoja caduca y especies forestales, en general necesitan medios de cultivo más complejos, la respuesta a las condiciones de cultivo resulta más lenta que en las especies herbáceas.

Desde el año 2012 se están llevando a cabo diversas investigaciones que agrupan a estudiantes de grado, y posgrado obteniéndose resultados experimentales, a escala piloto de producción, muy importantes tanto para el avance de los proyectos de investigación como para el desarrollo de nuevas capacidades productivas, utilizando biotecnologías.

Como respuesta tecnológica se ha evaluado diferentes alternativas para aumentar la disponibilidad de plantas a muy corto plazo, lo que es imposible de obtener en nuestro medio con métodos convencionales (propagación por estacas), pero sí es posible mediante el cultivo "*in vitro*, cuyo objetivo es contribuir a difundir una herramienta aplicable en forma eficiente a la propagación de variedades de plátano, y otras especies en apoyo al desarrollo de la tecnología de micropropagación *in vitro*. La tecnología de cultivo *in vitro* permite mejorar el acceso a una gran cantidad de plantas a partir de cantidades mínimas de material vegetal, y su desarrollo productivo representa una oportunidad de crecimiento y diversificación a nivel del sector hortifrutícola del país.

En la actualidad la biotecnología tiene aplicaciones que van desde las más sencillas como la fabricación de compostaje para incrementar la fertilidad y la protección del suelo, a partir de la implementación de la agricultura orgánica, hasta otras mucho más complejas como la producción de vacunas destinadas a prevenir enfermedades en humanos y animales. Otros usos de la biotecnología están dirigidos a las investigaciones en biología celular y molecular, las cuales pueden ser implementadas en cualquier proceso productivo que utilice microorganismos o células vegetales y animales. Los principales sectores donde se aplica de forma amplia y exitosa la biotecnología como procesos productivos son: la agricultura, la industria energética, en la producción de productos químicos y farmacéuticos y en el manejo de residuos o desechos.

Elementos para una reflexión de futuro

El uso de lo que podemos llamar Biotecnología Vegetal en sentido amplio está en la base de la transformación de las plantas que hemos llevado a cabo para desarrollar lo que conocemos como agricultura. Estos desarrollos se aceleraron con la aplicación sistemática de la Genética y de la Biología Molecular que ha dado lugar a la Biotecnología Vegetal moderna con sus nuevas aplicaciones y sus debates intensos. En 2014 estos debates mantienen su intensidad sobretodo en Europa, lo no quiere decir que no haya conflictos en otros países. En Estados Unidos hay una fuerte batalla política en diferentes estados entorno al etiquetado de los alimentos que contienen GMOs, en África o la India la discusión sobre el tema sigue siendo activa, en Rusia se legisla en contra, en Brasil se apuesta a favor y en China hay una cierta vacilación.

La situación en Europa viene dictada por factores distintos que tienen un impacto diferente en los distintos países miembros. Se trata de factores económicos, sociológicos, económicos o incluso ideológicos. En la literatura científica van apareciendo estudios sobre los efectos de las modificaciones genéticas y de forma periódica aparece algún estudio que crea una cierta alarma.

Analizar la importancia de los resultados es trabajo de las comisiones de bioseguridad de los diferentes países o del panel de GMOs de la EFSA. Sin embargo, el impacto de los costes regulatorios va a seguir siendo decisivo para el desarrollo de nuevas GMPs. Se ha propuesto que en algunos casos, como cuando se usan secuencias de la misma especie o de una especie cercana, lo que se ha llamado cisgénesis o intragénesis, podría ser necesario un menor número de datos para su aprobación. Lo mismo se ha dicho en el caso de que se usen metodologías que permiten una modificación genética de forma más dirigida.

Todo ello implicaría un coste inferior, pero la presión de algunos estados miembros puede hacer difícil que esto ocurra. En cualquier caso, la presión de los grupos opositores a estas metodologías y la ejercida por algunos países miembros hace que el análisis científico, base de los sistemas regulatorios, se vuelva cada vez más complejo y que se aleje de criterios objetivos por la necesidad de responder a preguntas muy hipotéticas o carentes de toda base.

La realidad es que las compañías de semillas, incluso las europeas, están trasladando sus laboratorios de investigación a países como Estados Unidos, donde la investigación no tiene las barreras existentes en Europa, sobre todo para la experimentación en el campo. También algunas compañías han desistido en sus intentos por conseguir la aprobación del cultivo de sus semillas modificadas en Europa, mientras que sí la tienen para su importación para alimentación humana o animal. En este sentido, Europa sigue importando millones de toneladas de grano de GMPs cuyo etiquetado no plantea problemas insolubles, sobre todo para piensos y usos industriales, y que además necesita, como es el caso de la soja en la alimentación de animales de granja por su alto aporte proteico. Junto a estos temas se están planteando también otros ligados a los procedimientos de protección de la propiedad intelectual. En plantas ha existido desde mediados del siglo pasado un sistema de protección de las variedades agrícolas basadas en el convenio UPOV. Sin embargo, en los tiempos recientes algunas compañías han utilizado el sistema de protección mediante patentes tanto en genes como en plantas con características específicas que han creado una discusión intensa incluso en las mismas compañías de semillas.

Por otra parte, todo el interés que puedan tener las GMPs, que en un contexto global puede considerarse un éxito extraordinario, no hay que olvidar que la Biotecnología Vegetal ofrece unas perspectivas muy amplias. Cualquier aplicación nueva de la Mejora de Plantas requiere disponer de una variabilidad genética lo más amplia posible y de herramientas

para aprovecharse de ella. Las técnicas moleculares están permitiendo las dos cosas de forma creciente. El espectacular incremento en el conocimiento de los genomas vegetales (Michael y Jackson 2013) está permitiendo acumular una información sobre las bases genómicas de las plantas cultivadas en una cantidad enorme y de un interés que irá extrayéndose en los próximos años. Se desarrollan al mismo tiempo metodologías que permiten correlacionar estos datos con datos de análisis masivo de metabolismo o fenotipado y metodologías para la identificación de caracteres genéticos complejos. Con estos datos se han desarrollado aproximaciones de mejora asistida por marcadores moleculares cada vez más precisos y por selección genómica. Ésta se está ya usando en la mejora animal y puede ir desarrollándose también en plantas. Si juntamos las aproximaciones de secuenciación masiva de conjuntos de variedades de plantas con la creación de nueva variabilidad por ejemplo por mutagénesis al azar o dirigida, tenemos un conjunto de perspectivas que evitan el uso de las técnicas de modificación genética con sus polémicas y sus costes. Es probable que estas alternativas sean las más empleadas para cultivos como los hortícolas o frutícolas en los que no tiene sentido hacer las inversiones que sí son factibles en los grandes cultivos.

El conjunto de metodologías que dan lugar a la moderna Biotecnología Vegetal ya está respondiendo a la demanda de innovación de sector agroalimentario. Lo está haciendo utilizando aproximaciones de modificación genética, que probablemente seguirán siendo importantes para los grandes cultivos, y las basadas en genómica y marcadores moleculares, que irán siendo utilizadas en la mayoría de cultivos. Con ello las nuevas aproximaciones moleculares ayudarán a responder a los retos que se presentan en el próximo futuro. La demanda de alimentos para una población creciente y con una demanda cualitativamente más exigente, el cambio climático y la necesidad de desarrollar una agricultura lo menos agresiva posible con el medio ambiente implican la necesidad de aplicar cualquier aproximación eficaz para responder a estos retos.

Las distintas aproximaciones de la Biotecnología Vegetal estarán sin duda presentes en las respuestas que deben y vayan a darse.

Todas estas cuestiones han sido objeto de reflexiones a diferentes niveles en los últimos años. Algunas instituciones, como la Royal Society de Londres (2009), el Comité Asesor de las Academias de Ciencias Europeas (EASAC) (2013) o el Grupo Europeo de Ética de las Ciencias y las Nuevas Tecnologías (2008), han formulado reflexiones sobre las condiciones en que se puede utilizar el conjunto de tecnologías que se derivan del enorme progreso en el conocimiento que estamos adquiriendo sobre los procesos biológicos, en particular de los que tienen relación con las especies vegetales y animales en las que basamos nuestra alimentación. El debate va a continuar estando presente por razones económicas o ideológicas entre otras. La función del científico es estar presente en ellos y proporcionar a los ciudadanos y a quienes los representan los datos y los análisis que pueden permitir a todos tomar las decisiones que definirán la agricultura del próximo futuro.

Referencias

George EF.; Hall MA. De Klerk, G. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3ra Ed. Springer, The Netherlands. 501 p.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

Navarro L (1979) Microinjerto de ápices caulinares in vitro para la obtención de plantas de ágrios libres de virus. Bol Serv.Plagas 5: 127-148.

Serrano García, Manuel. Madrid Síntesis D.L. Cultivo in Vitro de la planta superiores. Pierik, R.L.M. Madrid MP

Rey HY, Mroginski LA, Scocchi AM (1995) Embriogénesis somática en especies cítricas por cultivo de nucelas. Hort. Arg., 14 (36): 54-64.

Windhol JM (1972) The use of fluorescei diacetate and phea safranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Technol 47: 189-194

Reproducción sexual y ciclos de vida. Hipertextos del área de la biología. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. Incluye ilustraciones y animaciones del ciclo de las plantas. <http://fai.unne.edu.ar/biologia/reproduccion/sexual.htm#INDICE>

Curtis H y Barnes NS (2000) Biología. 6º Ed. en español.

Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L (eds.) (2004) Biotecnología y mejoramiento vegetal. INTA, Buenos Aires, Argentina.

Extensión de la Universidad de Illinois (2017) “El gran escape de la planta” Sitio con recursos para enseñar a niños pequeños acerca de las plantas, su estructura y ciclo de vida. Disponible en: http://www.urbanext.uiuc.edu/gpe_sp/index.html

Muñoz de Malajovich MA (2007) Biotecnología. Editorial Universidad Nacional de Quilmas.

European Initiative for Biotechnology Education (2017) Plantas transgénicas. Disponible en: <http://www.ipn.uni-kiel.de/eibe/UNIT09ES.PDF>.

European Initiative for Biotechnology Education (2017) Microbios y moléculas; Apéndice 2. Técnicas microbiológicas. Incubación de cultivos. Tratamiento y esterilización del material utilizado. Disponible en: <http://www.ipn.uni-kiel.de/eibe/UNIT01ES.PDF>.

Barthelemy R, Dawson J, Lee A (1999) Técnicas para el laboratorio de biología. Compañía Editorial Continental.

Devlin R (2009) Fisiología vegetal. Editorial Omega, Madrid, España.

Pierik RLM (2007) In vitro culture of higher plants. Editorial Martinus Nijhoff Publishers.

Strasburger E (2007) Tratado de Botánica. Editorial OMEGA, Barcelona, España.

Tema 2

Propagación de plátano barraganete (*Musa paradisiaca*) mediante desinfectantes y urea a diferentes profundidades de cortes

Cooper Marcillo I, Blanca Indacochea G y Yhony Valverde L

La explicación de los hechos, ahora reducidos a sus términos reales, consiste en el establecimiento de una relación entre varios fenómenos particulares y unos cuantos hechos generales, que disminuyen en número con el progreso de la ciencia”

Auguste Comte

Resumen

La tesis de Propagación Vegetativa de Plátano Barraganete (*Musa paradisiaca*) mediante la aplicación de varias concentraciones de desinfectantes y urea a diferentes profundidades de cortes, tuvo como objetivos determinar la mejor concentración de desinfectante a emplearse en la fase de establecimiento en la propagación vegetativa de plátano barraganete (*Musa paradisiaca*); definir las mejores concentraciones del regulador de crecimiento en la fase de establecimiento de los cormos e Identificar las mejores concentraciones y mejor profundidad de cortes cruzados a los cormos y determinar el costo unitario de las plantas de plátano en la fase de multiplicación vegetativa. El Diseño metodológico estuvo basado en un diseño experimental de bloques completos ala zar en arreglo factorial 4 x 4 x 3, dando un total de 48 tratamientos cada uno con cuatro repeticiones. El factor A estaba constituido por los Protocolos de desinfección, el factor B por la Dosis de Urea (nitrógeno 46%) utilizada y el factor C por la Profundidad de corte en el cormo. Los resultados indican que la mejor concentración de desinfectante utilizada en la fase de establecimiento de la propagación vegetativa de plátano barraganete (*Musa paradisiaca*), es donde se utilizó Cobre Nordox en dosis de 2g/L de agua, con 20 minutos de tiempo de inmersión y Benlate en dosis de 1 g/Litro de agua por un tiempo de inmersión de 45 minutos. Las mejores concentraciones y mejor profundidad de cortes cruzados a los cormos se presentó como mejores tratamientos donde se utilizó 10. Gramos de urea por litro de agua sumergidos en un tiempo de 3 horas a los cormos. La profundidad de corte que dio mejor resultado fue donde se realizó a 1.5 cm.

Palabras clave: Cobre Nordox, plátano, cormos, urea, agua

Summary

Propagation of Banana Barraganete (*Musa paradisiaca*) by disinfectants and urea with different cutting depths

The Vegetative Propagation of Banana Barraganete (*Musa paradisiaca*) thesis, by means of the application of several concentrations of disinfectants and urea with different cutting depths, aimed to determine the best concentration of disinfectant to be used in the establishment phase of the vegetative propagation of Barraganete banana (*Musa paradisiaca*); to define the best concentrations of the growth regulator during the corms establishment phase; to identify the best concentration and best cross-cutting depth to the corms and, to determine the unit cost of the banana plants in the vegetative multiplication phase. The methodological design was based on an experimental design of complete

random blocks in a 4 x 4 x 3 factorial arrangement, giving a total of 48 treatments each with four replicates. Factor A, was made up by disinfection protocols, factor B by Urea Dose (46% nitrogen) and factor C by cutting depth in the corm. Results indicate that the best concentration of disinfectant used in the vegetative propagation establishment phase of Barraganete banana (*Musa paradisiaca*) is where Copper Nordox was used in doses of 2 g/L of water, with 20 minutes of immersion time and Benlate in doses of 1 g/Liter of water for a time of 45 minutes of immersion. The best concentrations and best cross-cuttings depth to the corms were presented as the best treatments, where 10 grams of urea per liter of water submerged in a time of 3 hours to the corms was used. The cutting depth giving the best result was the one performed at 1.5 cm.

Key words: Copper Nordox, banana, corms, urea, water.

Introducción

El cultivo de plátano (*Musa AAB*), representa un importante sostén para la socio-economía y seguridad alimentaria del país. Desde el punto de vista socioeconómico, el plátano genera fuentes estables y transitorias de trabajo, además de proveer permanentemente alimentos ricos en energía a la mayoría de la población campesina. Actualmente se reportan en el país un total de 144981 ha de plátano, de las cuales 86712 ha están bajo el sistema de monocultivo y 58269 ha se encuentran asociadas con otros cultivos (INEC 2011).

La mayor zona de producción de esta musácea es la conocida como el triángulo platanero, la cual abarca las provincias de Manabí, Santo Domingo y los Ríos con 52612, 14249 y 13376 ha, respectivamente. Las principales variedades explotadas en estas zonas son el “Dominico”, que se le destina principalmente para el auto-consumo y el “Barraganete” que se lo destina en su mayor parte a la exportación, estimándose que anualmente se exportan alrededor de 90000 TM de este cultivo (Sotomayor 2013).

El rendimiento promedio de plátano reportado en el país es de 5 t/ha/año (MAGAP 2011), lo cual es relativamente bajo comparado con los rendimientos obtenidos en Colombia, donde oscilan alrededor de 10 t/ha/año en sistemas tradicionales y más de 20 t/ha/año en sistemas tecnificados. La baja productividad registrada en el país es consecuencia de problemas bióticos (Sigatoka negra, Nematodos, Picudo negro, Virosis, etc.), abióticos (sequía) y tecnológicos (bajas densidades, riego, nutrición, control de plagas, etc.), pues de la superficie total sembrada, solo el 14%, 33% y 34%, reciben riego, fertilización y control de plagas, respectivamente. Es decir que, más del 60% de la superficie nacional no tiene acceso a la tecnología, de ahí que es fácil deducir el porque de los bajos rendimientos obtenidos (INEC 2011).

El plátano se propaga a partir del rizoma de una planta adulta o de brotes laterales (hijuelos). De manera tradicional, las familias productoras implementan sus nuevos cultivos de plátano utilizando rizomas o hijuelos. Lamentablemente este sistema no asegura una plantación de buena calidad y libre de enfermedades o plagas. El picudo negro es la plaga de mayor impacto en plantaciones de plátano y, fácilmente, podrá ser diseminada en los rizomas utilizados durante la implementación de la nueva plantación (Zonta *et al.* 2013).

La regeneración natural también limita la cantidad de material de siembra, debido a bajas tasas de multiplicación, puesto que la dominancia apical que ejerce la planta madre sobre los hijuelos, inhibe la activación y brotación de las yemas laterales (Singh *et al.* 2011). Sin embargo con las diversas técnicas de macropropagación utilizadas en musáceas es posible

obtener gran cantidad de plántulas a partir de poco material de siembra inicial, en un corto periodo de tiempo (Dzomeku *et al.* 2014).

Por lo anterior y considerando que en la actualidad no se dispone de información relacionada con desinfectantes y urea a diferentes profundidades de cortes de plántulas de plátano barraganete propagadas con desinfectantes y ureas, se planteó como objetivo del presente trabajo, determinar la eficiencia de la propagación vegetativa de plátano Barraganete (*Musa Paradisiaca*) mediante la aplicación de varias concentraciones de desinfectantes y Urea (nitrógeno al 46%) a diferentes profundidades de cortes

Materiales y métodos

Localización

El experimento se realizó en el cantón Jipijapa en el vivero del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Estatal del Sur de Manabí ubicado en el campus los Ángeles en el km 1,5, parroquia Jipijapa, provincia de Manabí, Ecuador. El área experimental se localizó a 300 msnm, ubicada geográficamente en las coordenadas: 1° 17' 40" S y 80° 37' 00" O.

Material vegetal

Se utilizaron cepas o cormos de plátano variedad Barraganete (*Musa paradisiaca*)

Reactivos

Dosis de Urea (nitrógeno 46%), Cobre Nordox, Benlate, procediendo a suministrar una cantidad por cada cepa de la concentración inicial de cada tratamiento.

Diseño experimental, Factores estudiados y tratamientos

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con cuarenta y ocho tratamientos y cuatro repeticiones, (48 X 4).

Protocolo de desinfección

- A1.- Cobre Nordox 2g/L; 45 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 20 min de tiempo de inmersión.
- A2.- Cobre Nordox 2g/L; 60 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión.
- A3.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 60 min de tiempo de inmersión.
- A4.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión.

Dosis de Urea (nitrógeno 46%)

- B1. 8. g/L. Urea/3 hora
- B2. 10. g/L Urea/3 hora
- B3. 12. g/L. Urea/3hora
- B4. 14. g/L. Urea/3hora

Profundidad de corte

- C1.- 1.5 cm
- C2.- 3.0 cm
- C3.- 4.5 cm.

Datos registrados y método de evaluación

A los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra se registraron las siguientes variables: Número de brotes por cepa, Longitud de brotes (cm), Diámetro de brotes (cm).

Manejo del experimento

Construcción de vivero: El área total del vivero tenía una dimensión de 18.72m², constituido por cuatro camas 1.30m de ancho y 3.60m de longitud, y el riego se aplicó diariamente con intervalos de 1 en 24 horas.

Fase de Campo: Se seleccionaron los mejores hijos de plátano, por lo que las plantas madres presentaban óptimas características morfológicas, fitosanitarias; tales como el porte característico del cultivar, la calidad, el tamaño y la producción de dedos en la racima. Se extrajo de las fincas de los agricultores ubicados en Cañita, Mis Baque de la parroquia El Anegado perteneciente al cantón Jipijapa.

Fase de limpieza y desinfección de los colinos: Se eliminaron las raíces y partes de necróticas que poseía el colino con ayuda de un cuchillo y un machete, y así se fue eliminando capa por capa las vainas del pseudotallo, luego de haber realizado las prácticas culturales de la limpieza se procedió a preparar los desinfectantes en sus respectivos recipientes y así fueron adecuados los cormos para dejarlo por los tiempos establecidos en procedimiento de cada tratamiento.

Tiempo de reposo: Una vez desinfectados los cormos se dejaron en reposo bajo sombra por el lapso de un día, para que los desinfectantes actuaran adecuadamente en los tratamientos y evitar la aparición de infecciones.

Aplicación de los tratamientos: Se preparó cada tratamiento en recipientes de 200 L por lo que cada uno tuvo dosis distintas, según los tratamientos, la urea comercial al 46%, el primero de 8 g/L de agua, el segundo de 10g /L de agua, el tercero 12g /L de agua, y el último 14g /L. Se dejaron en los recipientes sumergidos por 3 horas para que se adhiriera el compuesto en cada cormo y reaccionara adecuadamente.

Eliminación de la dominancia apical: Se realizó a través de la eliminación de la yema apical, a un centímetro bajo la corona que une el colino bajo el pseudotallo, esto se realizó para romper la dominancia apical, a continuación se realizaron los cortes que indica cada tratamiento, con cuchillo y machete sobre el corte apical.

Siembra: Se colocaron los colinos enteros en los orificios que contenía cada platabanda de cada tratamiento. El sustrato se había preparado previamente para que facilitara la brotación de las yemas axilares.

Análisis estadístico

Análisis de varianza (ADEVA)

El experimento se condujo a través de un diseño experimental al Azar (DCA), con 48 tratamientos y cuatro repeticiones (48 x 4). Cada unidad experimental estaba constituida por 1 cormo. Para determinar diferencias entre medias de los tratamientos se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey al 0.05% de probabilidad.

Resultados

Promedios de número de brotes de cepas registrados en la propagación vegetativa de plátano a los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra

la (Tabla 1), se presenta el análisis de varianza que se realizó para la variable número de brotes realizada a los 15, 30, 45 y 60 días después de la siembra, en este se puede observar que las fuentes de variación Factor A: Protocolo de desinfección; Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%); Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%); Factor C: Profundidad de corte; Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor C: Profundidad de corte; Interacción Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte y la Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte no presentan diferencia estadística. El Coeficiente de Variación es 21.16 % y el promedio general 1.16 brotes en los primeros 15 días.

Tabla 1. Promedios de número de brotes de cepas registrados en la propagación vegetativa de Plátano a los 15, 30,45 y 60 días después de la siembra.

T	Números de brotes a los 15 días	Números de brotes a los 30 días	Números de brotes a los 45 días	Números de brotes a los 60 días
1	1.3718ns	0.6390ns	1.2661ns	3.9980**
2	0.6882ns	2.0862ns	2.0209ns	1.3234ns
3	1.0124ns	0.6185ns	0.8270ns	2.6761ns
4	2.6406ns	1.2164ns	1.0439ns	4.0258**
5	0.5205ns	1.3165ns	3.339**	6.8661**
6	1.2742ns	0.6284ns	1.8106ns	3.5385**
7	1.4256ns	0.4328ns	1.1720ns	3.5846**

Fuente: Laboratorio de Biotecnología de la UNESUM

** = Diferencias estadísticas altamente significativas

* = Diferencias estadísticas significativas

ns = no significativo

Para la variable número de brotes realizado a los 30 días después de la siembra, se puede observar que no existe diferencia estadística alguna para las fuentes de variación estudiadas. El coeficiente de variación establecido fue 26,17% y el promedio general estuvo en 1.52 brotes en promedio.

Para el análisis de varianza realizado para el número de brotes de datos tomados a los 45 días después de la siembra, se puede observar que existen diferencias estadísticas altamente significativas para la Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor C: Profundidad de corte, las otras fuentes de variación que corresponde a Factor A: Protocolo de desinfección, Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%), Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%), Factor C: Profundidad de corte, Interacción Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte y la Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte, no presentaron diferencia estadística alguna.

El coeficiente de variación es 26.04 % y el promedio general 1.63. Los valores promedios y la prueba de Tukey realizada, se puede indicar que la Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor C: Profundidad de corte presenta cuatro rangos de significación estadística, el mayor corresponde al tratamiento A4.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo

de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión x C3.- 4.5 cm, con 2.039; y el rango más bajo se presentó en los tratamientos A1.- Cobre Nordox 2g/L; 45 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 20 min de tiempo de inmersión x C3.- 4.5 cm, con 1.402; A3.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 60 min de tiempo de inmersión x C2.- 3.0 cm con 1.481; A3.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 60 min de tiempo de inmersión x C3.- 4.5 cm con 1.559 y A4.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión x C2.- 3.0 cm con 1.484.

Para el análisis de varianza de la evaluación de número de brotes efectuada a los 60 días después de la siembra, en este se puede ver que las fuentes de variación Factor A: Protocolo de desinfección; Factor C: Profundidad de corte; Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor C: Profundidad de corte; Interacción Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte y Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte presentan diferencias estadísticas altamente significativas y el Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) y la Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%), no presentan diferencia estadística alguna.

El Coeficiente de variación es 24.95% y el promedio general 1.71. Los valores promedios y la prueba de Tukey efectuada, aquí se puede observar que el Factor A: Protocolo de desinfección presenta cuatro rangos de significación estadística, el mayor corresponde a A4.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión con 1.887 a y el rango más bajo se presentó en el tratamiento A3.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 60 min de tiempo de inmersión con 1.625 en promedio. El Factor C: Profundidad de corte presenta tres rangos de significación estadística el mayor corresponde a C3.- 4.5 cm con 1.823 y el rango más bajo se presentó en el tratamiento C2.- 3.0 cm con 1.613 de profundidad de corte.

La Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor C: Profundidad de corte, presenta tres rangos de significación estadística el mayor corresponde al tratamiento A4.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión x C3.- 4.5 cm con 2.442 y el rango más bajo se presentó en los tratamientos A1.- Cobre Nordox 2g/L; 45 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 20 min de tiempo de inmersión x C1.- 1.5 cm con 1.732; A1.- Cobre Nordox 2g/L; 45 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 20 min de tiempo de inmersión x C2.- 3.0 cm con 1.739; A1.- Cobre Nordox 2g/L; 45 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 20 min de tiempo de inmersión x C3.- 4.5 cm con 1.427; A2.- Cobre Nordox 2g/L; 60 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión x C1.- 1.5 cm con 1.645; A2.- Cobre Nordox 2g/L; 60 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión x C2.- 3.0 cm con 1.629; A3.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 60 min de tiempo de inmersión x C1.- 1.5 cm con 1.698; A3.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 60 min de tiempo de inmersión x C2.- 3.0 cm con 1.527; A3.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 60 min de tiempo de inmersión x C3.- 4.5 cm con 1.651; A4.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión x C1.- 1.5 cm con 1.662 y A4.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión x C2.- 3.0 cm con 1.558.

La Interacción Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte, presenta tres rangos de significación estadística, el mayor corresponde al tratamiento B4. 14. g/L. Urea/3hora x C3.- 4.5 cm con 2.124 y el rango más bajo se presentó en el tratamiento B4. 14. g/L. Urea/3hora x C2.- 3.0 cm con 1.362. La Interacción Factor A:

Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte, presenta tres rangos de significación estadística, el mayor rango corresponde al tratamiento A4.- Plátano barraganete (*Musa paradisiaca*) 2g/L /20 min.+ 2g/L /45 min. Utilizando 14 g/L. Urea/3hora con corte de 4.5 cm y que tiene un promedio de 4.140; el rango más bajo corresponde al resto de los tratamientos objetos del presente estudio.

Tabla. 2: Promedios de longitud de brotes de cepas registrados en la propagación vegetativa de Plátano a los 30, 45 y 60 días después de la siembra y diámetros de brotes a los 60 días.

T	Longitud de brotes a los 30 días	Longitud de brotes a los 45 días	Longitud de brotes a los 60 días	Diámetros de brotes a los 60 días
1	0.5003ns	0.9458ns	0.7599ns	1.5272ns
2	1.2241ns	3.1964*	2.5237ns	4.0454**
3	2.0401ns	1.4629ns	1.7453ns	2.7787*
4	0.8604ns	1.4667ns	1.3343ns	0.7362ns
5	0.8347ns	1.1876ns	1.2306ns	0.6255ns
6	0.4488ns	0.9885ns	0.9032ns	0.8414ns
7	0.5460ns	0.6032ns	0.4725ns	0.6809ns

Fuente: Laboratorio de Biotecnología de la UNESUM

** = Diferencias estadísticas altamente significativas

* = Diferencias estadísticas significativas

ns = no significativo

En la (Tabla 2) el análisis de varianza realizado para longitud de brote a los 30 días después de la siembra, se puede apreciar que las fuentes de variación estudiadas que a continuación se detallan Factor A: Protocolo de desinfección; Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%); Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%); Factor C: Profundidad de corte; Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor C: Profundidad de corte; Interacción Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte y la Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte, no presentaron diferencia estadística alguna. El Coeficiente de variación es 57.16% y el promedio general 2.33.

El análisis de varianza realizado para la variable longitud de brotes realizada a los 45 días después de la siembra, se puede apreciar que el Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) presenta diferencias estadísticas significativas, las otras fuentes de variación que se mencionan continuación Factor A: Protocolo de desinfección, Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%), Factor C: Profundidad de corte, Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor C: Profundidad de corte, Interacción Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte e Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte, no presentaron diferencia estadística alguna. El Coeficiente de Variación es 36.78 % y el promedio general 3.84. Los valores promedios y prueba de Tukey realizada, se puede ver que el Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) presenta tres rangos de significación estadística, el mayor corresponde a B2 10 g/L Urea/3 hora, con 4.187 y el rango más bajo se presentó en el tratamiento B4 14. g/L. Urea/3hora con 3.337.

El análisis de varianza realizado para la longitud de brotes a los 60 días después de la siembra, se observa que las fuentes de variación Factor A: Protocolo de desinfección; Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%); Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%); Factor C:

Profundidad de corte; Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor C: Profundidad de corte; Interacción Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte y la Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte, no presentan diferencia estadística alguna. El Coeficiente de Variación es 34.92% y el promedio general 5.35 cm.

El análisis de varianza efectuado para el diámetro de colino efectuado a los 60 días después de la siembra, se puede apreciar que las fuentes de variación presentan diferencias estadísticas altamente significativas para Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) y diferencias estadísticas significativas para Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%), las otras fuentes de variación como son Factor A: Protocolo de desinfección, Factor C: Profundidad de corte, Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor C: Profundidad de corte, Interacción Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte e Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte no presentan diferencia estadística alguna. El Coeficiente de Variación es 32.77% y el promedio general 5,49 cm. Los valores promedios y la prueba de Tukey efectuada, en este se puede ver que el Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) presenta tres rangos de significación estadística, el mayor corresponde al tratamiento B2 10 g/L Urea/3 hora con 6.021 cm y el rango más bajo se presentó en el tratamiento B4 14 g/L. Urea/3hora con 4.769 cm.

La Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) presenta tres rangos de significación estadística, el mayor corresponde a A1.- Cobre Nordox 2g/L; 45 min tiempo de inmersión; Benlate 1g/L; 20 min de tiempo de inmersión x B1. 8. g/L. Urea/3 hora con 6.905 cm y el rango más bajo se presentó en el tratamiento A3.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 60 min de tiempo de inmersión x B1. 8. g/L. Urea/3 horas con 4.550.

Discusión y Conclusiones

En la variable número de brotes se observó que el Factor A: Protocolo de desinfección, el tratamiento A4.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión con 1.887.

El Factor C: Profundidad de corte, C3.- 4.5 cm con 1.823 de profundidad de corte; La Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor C: Profundidad de corte tratamiento A4.- Cobre Nordox 2g/L; 20 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 45 min de tiempo de inmersión x C3.- 4.5 cm con 2.442.

La Interacción Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte al tratamiento B4. 14. g/L. Urea/3hora x C3.- 4.5 cm con 2.124.

La Interacción Factor A: Protocolo de desinfección x Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%) x Factor C: Profundidad de corte, tratamiento A4.- Plátano barraganete (*Musa paradisiaca*) 2g/L /20 min.+ 2g/L /45 min. Utilizando 14 g/L. Urea/3hora con corte de 4.5 cm y que tiene un promedio de 4.140 mostraron los mayores promedios superando a las otras concentraciones, (CONAM, 2005) indica que en la población de una especie vegetal no existen individuos que tengan la misma información genética (ADN), lo que es conocido como variabilidad genética, lo que influye a la variación de las concentraciones

hormonales en la regeneración de brotes, coincidiendo con Bidweell (1993), quien expresa que las hormonas provocan una gran variedad de efectos en las plantas, siendo uno de estos, estimular la emisión de brotes.

En la variable Longitud de brote se logró que el Factor B: Dosis de Urea (nitrógeno 46%), B2. 10. g/L Urea/3 hora con 4.187cm, alcanzara el mayor promedio, esto se debe a la producción de un brote, favoreciendo a su desarrollo, debido a la alta disponibilidad de nutrientes, coincidiendo con Ramos (2000), que obtuvo resultados similares al usar esas concentraciones en teca, donde los explantes tratados con el polvo enraizador de 1000 mgkg⁻¹ de ANA + 1000 mgkg⁻¹ de AIB fueron los que presentaron el mayor porcentaje de enraizamiento (92.5%) en el comportamiento del enraizamiento in vitro de teca en sustrato de zeolita a los 30 días.

El diámetro de brote, en lo que concierne a Dosis de Urea (nitrógeno 46%), el mayor tratamiento B2. 10. g/L Urea/3 hora con 6.021 cm. En cuanto al protocolo de desinfección el mayor tratamiento A1.- Cobre Nordox 2g/L; 45 min tiempo de inmersión; Benlate 1 g/L; 20 min de tiempo de inmersión x B1. 8. g/L. Urea/3 hora con 6.905 cm, esto se relaciona con lo indicado por Álvarez y Varona (1988), quienes expresan que existen especies que necesitan ser estimuladas con sustancias auxínicas.

Conclusiones

La concentración de desinfección del tratamiento A2; Cobre Nordox en dosis de 2g/L de agua, con 20 minutos de tiempo de inmersión; Benlate en dosis de 1 g/Litro de agua por un tiempo de inmersión de 45 minutos influyeron positivamente en el protocolo de desinfección. Las mejores concentraciones y mejores profundidad de cortes cruzados a los cormos se presentaron en el tratamiento B2; 10 gramos de urea por litro de agua sumergidos en un tiempo de 3 horas a los cormos con promedio de 6.021 cm. La profundidad de corte donde se obtuvieron los mejores resultados fue a 1,5 cm en el cormo.

Referencias

- Álvarez P y Varona JC (1998) Silvicultura. La Habana. Cuba. Editorial y Educación. 22 p.
- Armelinda Z , Gonçalvez A, Angola F (2013) Implementación y manejo de sistemas agroforestales.
- Bidwell RGS (1993) Fisiología Vegetal. (Acción de las hormonas y Reguladores del crecimiento). Ontario, CA. A.G.T editor S. A. Primera edición. c.23. p. 598 – 619.
- CONAM (2005) Variabilidad Genética (en línea). Lima, PE. Consultado el 24 Oct. 2015. Disponible en: http://portalagrario.gov.pe/rnng_gene.shtml.
- Dzomeku D, Darkey S, Wünsche J, Bam R (2014). Response of selected local plantain cultivars to PIBS (Plants issus de bourgeons secondaires) technique. *Journal Plant Development* 21: 117 – 123.
- Evans E (2003) Aerenchyma formation. *New Phytologist* 16: 35–49.
- INEC (2011) Estadísticas del sector Agropecuario.
- Jackson M (2002) Long-distance signaling from roots to shoots assessed: the flooding story. *Journal of Experimental Botany* 53: 175– 181.
- Latsague M y Lara J (2003). Fenoles solubles totales y su relación con la inhibición de la rizogénesis en estacas de *Nothofagus pumilio* (Poepp. Et Endl.) Krasser. *Guyana Botánica* 60(2): 90-93.

MAGAP (2011) Instituto Nacional de investigaciones, Estación Experimental Tropical Pichilingue <http://www.iniap.gob.ec/web/banano-platano-y-otras-Musaceas/> 29/12/2016.

Marcillo C (2014) Propagación de plátano Barraganete (*Musa paradisiaca*) mediante desinfectantes y urea a diferentes profundidades de Cortes. tesis de grado. UNESUM

McNamara S and Mitchell C (1991) Roles of auxin and ethylene in adventitious root formation by a flood-resistant tomato genotype. *HortScience* 26(1):57-58.

Ramos I (2000) Algunos avances en la morfogénesis de la teca (*Tectona grandis*). Tesis para optar por el grado de Master en Ciencias. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. 55 p.

Salisbury y Roos C (2000) Fisiología de las plantas. Paraninfo S. A. Thomson Editores. Madrid, ES. c. 17. p. 581 – 585; c. 18. p. 610 – 616; c. 22. p. 758 - 760.

Singh H, Selvarajan R, Uma S, Karihaloo J (2011) Micropropagation for production of quality banana planting material in Asia Pacific. New Delhi, India: Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB),

Sotomayor Herrera I (2015) Banano, Plátano y otras Musáceas. Programa Nacional del Banano y Plátano. Estación Experimental Tropical Pichilingue. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones agropecuarias NIAP. Disponible en: 2013 http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com_content&view=article&id=29:banano&catid=6:programas.

Vidoz M, Loreti E, Mensuali A, Alpi A, Perata P (2010) Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. *The Plant Journal* 63: 551–562.

Tema 3

Micropropagación *in vitro* de banano orito (*Musa acuminata* AA.) para la producción y la seguridad alimentaria

Jhonny Indacochea G y Blanca Indacochea Ganchozo

“La oportunidad es el instante preciso en que debemos recibir o hacer una cosa.”

Platón

Resumen

El presente trabajo titulado micropropagación *in vitro* de banano orito (*Musa acuminata* aa.) para la producción y la seguridad alimentaria se llevo a cabo en el laboratorio de biotecnología vegetal de la universidad estatal del sur de manabi durante el año 2012. Se lo realizo con el objetivo de Mejorar la eficiencia de producción en las diferentes fases de la micropropagación del cultivo de banano orito. Los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes; Determinar la mejor concentración de desinfectante a emplearse en la fase de establecimiento *in vitro* de banano orito (*Musa acuminata* AA.); Determinar la concentración o balance hormonal óptimos para el establecimiento *in vitro* de banano orito (*Musa acuminata*); Determinar el costo unitario de las plantas en la fase de introducción El trabajo se realizó con un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cinco tratamientos y ocho repeticiones en base a la combinación de los factores en estudio resultaron 40 unidades experimentales. Para la desinfección se utilizó cloro y bicloruro de mercurio en diferentes concentraciones y para la etapa de inducción se utilizo las fitohormonas Ácido indol acético (AIA) y Bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones. Las variables que se evaluaron fueron: frascos Contaminados, Aparición de callos Aparición de brotes. porcentaje de sobrevivencia. Los resultados obtenidos determinaron que la especie probada presentó buen compartimiento en el desarrollo del proceso de desinfección, sobrevivencia, aparecimiento de callos y brotes, lo que determina que es factible producir plantas *in vitro* de esta especie para programas de seguridad alimentaria. En base a los resultados obtenidos y para futuras investigaciones relacionadas con el cultivo *in vitro* de *Musa acuminata*, banano orito y para aumentar las probabilidades de éxito en la Fase de Introducción, se recomienda: utilizar dosis de 8mg/l de 6-Bencilaminopurina (BAP) y 0,30mg/l de Ácido indo acético (AIA) para la reproducción de otras especies de Musas.

Palabras clave: Callos, brotes, desinfección, fitohormonas

Summary

***In vitro* micropropagation of banana orito (*Musa acuminata* AA.) for production and food security**

During the year 2012, the present work titled “*In vitro* micropropagation of banana orito (*Musa acuminata* AA.) for production and food security” was carried out in the Plant Biotechnology Laboratory of the State University of Southern Manabi. It was carried out with the aim to improve the production efficiency in different phases of the micropropagation of banana orito crop. The objectives of the present study were as follows: To determine the best concentration of disinfectant to be used in the *in vitro* establishment stage of banana orito (*Musa acuminata* AA.); to determine the optimum concentration or hormonal balance for the *in vitro* establishment of banana orito (*Musa acuminata*); to determine the unit cost of the plants in the introduction phase. The work was performed with a Completely Randomized Design (CRD), with five treatments and eight replications. Based on the combination of the factors under study, it resulted in 40 experimental units. For disinfection, chlorine and mercury bichloride were used in different concentrations and for the induction stage, phytohormones Indole Acetic Acid (IAA) and Bencilaminopurine (BAP) were used in different concentrations. The evaluated variables were: contaminated vials, appearance of calluses, sprouts appearance and percentage of survival. The results obtained determined that tested species showed good behavior in the development of the disinfection process, survival, appearance of calluses and sprouts, determining that it is feasible to produce *in vitro* plants of this species for food security programs. Based on the results obtained and for future researches related to the *in vitro* crop of *Musa acuminata*, banana orito and for increasing the chances of success in the Introduction Phase, it is recommended to use doses of 8mg/l of 6-Benzylaminopurine (BAP) and 0.30mg / l of indole acetic acid (IAA) for the reproduction of other *Musa* species.

Key words: Callus, sprouts, disinfection, phytohormones.

Introducción

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

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

El banano es el cultivo de mayor importancia económica del país, teniendo el 30% de mercado a nivel mundial. Este cultivo sufre considerables perjuicios debido a la incidencia de una enfermedad que ataca a nivel foliar provocando alteraciones en la fotosíntesis de la planta conocida como Sigatoka negra (AEBE 2011).

Los cambios climáticos severos experimentados en las últimas décadas y los ataques de numerosas plagas y enfermedades, han afectado los rendimientos del banano en el Ecuador. El uso de pesticidas químicos para contrarrestar sus efectos, conduce a disminuir la rentabilidad de la producción y elevan la contaminación ambiental con riesgos sobre la biodiversidad y la salud humana (AEBE 2011).

La mejor solución al problema sería obtener nuevas variedades resistentes a los ataques de numerosas plagas y enfermedades mediante la transformación genética, para mejorar o introducir nuevas características. (AEBE 2011).

La carencia de material de alta calidad es uno de los factores que limitan el buen desarrollo de las plantaciones de banano. La propagación vegetativa consiste en la estimulación y proliferación de brotes mediante la aplicación de reguladores de crecimiento en *in vitro*.

La propagación vegetativa es un método utilizado para multiplicar partes vegetativas, utilizándose tejidos vegetales que conserven las características hereditarias de planta donadora y así generar nuevos individuos. La investigación permitirá proporcionar una alternativa que facilite la disponibilidad de un material de siembra en óptimas condiciones (características deseables, excelente calidad genética y aspecto fitosanitario, entre otros) que simplifique la instalación de un sistema de producción, obteniendo plantas uniformes y permite realizar labores de cosecha de la manera más eficiente (Méndez 2003).

Materiales y métodos

Material vegetal

El material vegetal utilizado para el desarrollo de la investigación, fueron obtenidas de la hacienda Basurto ubicado en el Cantón Valencia Provincia de los Ríos. Se eligieron las plantas que demostraron las mejores características

Manejo específico del experimento

La parte inicial del trabajo fue encontrar el protocolo de desinfección apropiado para los segmentos de yemas apicales. El trabajo tuvo una permanencia de tres meses comprendido entre Abril y junio del 2012, en el que se experimentaron con varios compuestos químicos con propiedades desinfectantes, que cumplieron con la condición de ser fácilmente disponibles y económicamente viables.

La segunda parte del trabajo se ejecutó en Junio 2012. Consistió en experimentar las diferentes dosis de las hormonas auxina y citoquinina, que tuvo una duración de noventa días. Pasado ese tiempo, los segmentos de yemas apicales fueron trasladados a un medio fresco, para evitar su deterioro por la decadencia de nutrientes.

Resultados

Los resultados alcanzados en los pre-ensayos (Primera Parte) y en los ensayos concluyentes (Segunda Parte) fueron los siguientes:

Primera parte

Determinar la mejor concentración de desinfectante a emplearse en la fase de establecimiento *in vitro* de banano orito (*Musa acuminata* AA.)

Los resultados se indicaron en número de frascos contaminados y presentan la eficiencia de desinfección durante los pre-ensayos realizados hasta encontrar el protocolo de desinfección más adecuado para los segmentos de yema de ápice de *Musa acuminata*

Eficiencia de los protocolos de desinfección

Los resultados alcanzados en las distintas pruebas para cada uno de los protocolos de desinfección se los detallan:

Tabla 1. Número de frascos contaminados en la Etapa Preparatoria

Tratamiento de desinfección	Frascos contaminados	Eficiencia de Desinfección (%)
PROTOCOLO I	1	99
PROTOCOLO II	2	98
PROTOCOLO III	-	100
PROTOCOLO IV	-	100
PROTOCOLO V	1	99

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 2. Número de frascos necrosis en la Etapa Preparatoria

Tratamiento de Desinfección	frascos con necrosis	Eficiencia de desinfección (%)
PROTOCOLO I	1	99
PROTOCOLO II	4	96
PROTOCOLO III	2	98
PROTOCOLO IV	1	99
PROTOCOLO V	-	10

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 3. Número de tubos fenolizado en la Etapa Preparatoria.

Tratamiento de desinfección	Frascos con fenolización	Eficiencia de desinfección (%)
PROTOCOLO I	-	10
PROTOCOLO II	-	10
PROTOCOLO III	-	10
PROTOCOLO IV	-	10
PROTOCOLO V	-	10

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

En la tabla 1, se puede observar que el Protocolo III y IV, lograron una eficiencia del 100%, no hubo contaminación en ninguno de los frascos de ensayo

En la tabla 2 se puede verificar que los frascos con necrosis se mostraron en los protocolo I, II, III y IV con el 1-4-2-1% y el protocolos V logro una eficiencia de desinfección del 100%.

En la tabla 3, se puede ver que en ninguno de los protocolos hubo fenolización en el cual se manifiesta que los protocolos alcanzaron una eficiencia del 100%

El material vegetal se lo obtuvo de la empresa bananera “Bazurto”, el cual no contaba, con medidas sanitarias de acceso, tenía una estructura abierta en los extremos, lo que daba lugar al ingreso de agentes contaminantes, e insectos.

Los explantes contaminados por hongos, bacterias, fueron retirados y separados; sin embargo, según Ortega (2011), estos pueden ser utilizados nuevamente efectuando una desinfección con fungicidas comerciales

La contaminación puede reducirse aun mas, incrementando las medidas de asepsia dentro y cerca de la sala de traspaso, también garantizando una esterilización minuciosa de instrumentos, medios de cultivo, envases y la desinfección del área de transferencia y del operario.

La fenolización o necrosis (oscurecimiento de las paredes del cormo) de los explantes, se observó claramente este fenómeno, pero las pérdidas de explantes no fueron de mayor magnitud, ya que solamente hubo un porcentaje 2- 4%

El Protocolo III y IV cumplieron con las condiciones adecuadas de desinfección para este trabajo experimental, por lo que fueron estos los utilizados en el ensayo definitivo.

Segunda parte

Definir las mejores concentraciones de reguladores de crecimiento ácido naftalenacético (ANA) y bencil amino purina (BAP) en la fase de establecimiento de ápices.

Número de frascos contaminados.

En las siguientes tablas se detallan los valores relacionados al número de frascos contaminados y los porcentajes calculados a los 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 días durante la fase de Introducción.

Tabla 4. Porcentaje de contaminación de yemas apicales de *Musa acuminata*.

Tratamientos	Dias							
	7	14	21	28	35	42	49	56
B1	-	-	-	-	-	-	-	-
O4	-	-	12.5	12.5	37.5	63	63	63
O5	-	-	25	37.5	50	37.5	63	63
O6	-	-	37.5	50	75	75	75	75
O7	-	-	37.5	50	25	75	75	75
O8	-	-	37.5	50	50	50	50	63

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 4b: Número de frascos contaminados por tratamiento.

Tratamientos	Dias							
	7	14	21	28	35	42	49	56
B1	-	-	-	-	-	-	-	-
O4	-	-	1	1	3	3	5	5
O5	-	-	2	3	4	4	5	5
O6	-	-	3	4	6	2	6	6
O7	-	-	3	4	6	2	6	6
O8	-	-	3	4	4	4	4	5

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 5. Prueba de rango múltiple de tukey de los promedios de la variable frascos de ensayo contaminados.

Valor	ValorMedio
4	10.870
5	10.870
6	10.460
7	10.050
8	9.230

La prueba de tukey al 5% para tratamientos (Tabla 5), mostro la presencia de cuatro promedio. En el primer promedio se ubicó el valor encontrado en el tratamiento 4, en el segundo el tratamiento 5 el tercero en el tratamiento 6 y el cuarto en el tratamiento 8 que fueron evaluados el número de frascos contaminados.

Los resultados alcanzados, indican que a medida que transcurre el tiempo, se incrementa el número de frascos contaminados.

Hasta el momento se puede decir que la contaminación fue causada por hongos, hubo la presencia de micelio. La contaminación esta en que el material vegetal empieza a tener necrosis en la cicatriz de corte, en el cual se observó la contaminación.

Tabla 6. Frascos de ensayos libres de contaminación a los 7 días de la Fase.

Trat	1	2	3	4	5	6	7	8	Σ	X	% Desinfección	% Contaminación
O4	4	5	8	7	5	7	5	5	8	1	100	-
O5	5	8	6	6	4	8	4	4	8	1	100	-
O6	6	7	7	8	8	4	8	7	8	1	100	-
O7	7	6	5	4	7	6	7	6	8	1	100	-
O8	8	4	4	5	6	5	6	8	8	1	100	-
									4	5		
									0			

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 7. Prueba de rango múltiple de tukey de los promedios de la variable frascos de ensayos libres de contaminación a los 7 días de la Fase de Introducción.

Valor	Valor Medio
4	11.280
5	11.280
6	11.280
7	11.280
8	11.280

La prueba de tukey al 0.05% para las variables de frascos de ensayos libres de contaminación (Tabla 6), hubo la presencia de 1 solo promedio. En el primer promedio se ubicó el valor encontrado en los T4, T5, T 6 T 7, T 8 que fueron evaluados el número de frascos de ensayo libres de contaminación. De los resultados alcanzados, se establece 1 solo promedio, siendo el T4, T5, T 6, T 7, T 8 como los mejores tratamientos libres de contaminación

Tabla 8. Frascos de ensayos libres de contaminación a los 14 días de la Fase de introducción.

Trat	1	2	3	4	5	6	7	8	Σ	X	% Desinfección	% Contaminación
04	4	5	8	7	5	7	5	5	8	1	100	-
05	5	8	6	6	4	8	4	4	8	1	100	-
06	6	7	7	8	8	4	8	7	8	1	100	-
07	7	6	5	4	7	6	7	6	8	1	100	-
08	8	4	4	5	6	5	6	8	8	1	100	-
									40	5		

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 9. Prueba de rango múltiple de tukey de los promedios de la variable frascos de ensayos libres de contaminación a los 14 días de la Fase de Introducción

Valor 2 -	Valor Medio
4	11.280
5	11.280
6	11.280
7	11.280
8	11.280

La prueba de tukey al 0.05% para las variables de frascos de ensayos libres de contaminación (Tabla 11), hubo la presencia de 1 solo promedio. En el primer promedio se ubicó el valor encontrado en los T4, T5, T 6 T 7, T 8 que fueron

evaluados el número de tubos de ensayo libres de contaminación. De los resultados alcanzados, se establece 1 solo promedio, siendo el T4, T5, T 6, T 7, T 8 como los mejores tratamientos libres de contaminación.

Tabla 10. Frascos de ensayos libres de contaminación a los 21 días de la Fase de introducción

Trat	1	2	3	4	5	6	7	8	Σ	X	% Desinfección	% Contaminación
O4	4	5	0	7	5	7	5	5	7	0.87	87.5	12.5
O5	5	8	0	0	4	8	4	4	6	0.75	75	25
O6	6	7	7	0	0	4	8	0	5	0.62	62.5	37.5
O7	0	6	0	0	7	6	7	6	5	0.62	62.5	37.5
O8	8	4	4	0	0	5	6	0	5	0.62	62.5	37.5
									28	3.48		

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 11. Prueba de rango múltiple de tukey de los promedios de la variable frascos de ensayos libres de contaminación a los 21 días de la Fase de Introducción

Valor	Valor medio
4	10.870
5	10.460
6	10.050
7	10.050
8	10.050

La prueba de tukey al 0.05% para las variables de frascos de ensayos libres de contaminación (Tabla 11), hubo la presencia de 3 promedios que fueron evaluados el número de frascos de ensayo libres de contaminación. De los resultados alcanzados, se establece 3 promedio, siendo el T4 y T5 como los mejores tratamientos libres de contaminación

Tabla 12. Frascos de ensayos libres de contaminación a los 28 días de la fase de introducción

Trat	1	2	3	4	5	6	7	8	Σ	X	% Desinfección	% Contaminación
04	4	5	0	7	5	7	5	5	7	0.87	87.5	12.5
05	5	8	0	0	4	0	4	4	5	0.62	62.5	37.5
06	6	7	7	0	0	0	8	0	4	0.50	50	50
07	0	0	0	0	7	6	7	6	4	0.50	50	50
08	8	4	0	0	0	5	6	0	4	0.50	50	50
									24	2.99		

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 13. Prueba de rango múltiple de tukey de los promedios de la variable frascos de ensayos libres de contaminación a los 28 días de la Fase de Introducción

Valor	Valor medio
4	10.870
5	10.050
6	9.640
7	9.640
8	9.640

La prueba tukey al 0.05% para las variables de frascos de ensayos libres de contaminación (Tabla 13), hubo la presencia de 3 promedios que fueron evaluados el número de frascos de ensayo libres de contaminación. De los resultados alcanzados, se establece 3 promedio, siendo el T4 y T5 como los mejores tratamientos libres de contaminación

Tabla 14. Frascos de ensayos libres de contaminación a los 35 días de la Fase de introducción.

Trat	1	2	3	4	5	6	7	8	Σ	X	% Desinfección	% Contaminación
04	4	5	0	7	5	0	5	0	5	0.62	62.5	37.5
05	0	8	0	0	4	0	4	4	4	0.50	50	50
06	0	7	7	0	0	0	0	0	2	0.25	25	75
07	0	0	0	0	0	6	0	6	2	0.25	25	25
08	8	4	0	0	0	5	6	0	4	0.50	50	50
									17	2.29		

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 15. Prueba de rango múltiple de tukey de los promedios de la variable frascos de ensayos, libres de contaminación a los 35 días de la Fase de Introducción

Valor	Valor medio
4	10.050
5	9.640
6	9.640
7	8.820
8	8.820

La prueba de tukey al 0.05% para las variables de frascos de ensayos libres de contaminación (Tabla 15), hubo la presencia de 3 promedio que fueron evaluados el número de frascos de ensayo libres de contaminación. En los resultados adquiridos, se establece 3 promedio, siendo el T4, T5 y T8 como los mejores tratamientos libres de contaminación.

Tabla 16. Frascos de ensayos libres de contaminación a los 42 días de la Fase de Introducción.

Trat	1	2	3	4	5	6	7	8	Σ	X	% Desinfección	% Contaminación
O4	0	5	0	7	0	0	5	0	3	0.37	37	63
O5	0	8	0	0	4	0	4	4	4	0.50	62.5	37.5
O6	0	7	7	0	0	0	0	0	2	0.25	25	75
O7	0	0	0	0	0	6	0	6	2	0.25	25	75
O8	8	4	0	0	0	5	6	0	4	0.50	50	50
									15	1.87		

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 17. Prueba de rango múltiple de tukey de los promedios de la variable frascos de ensayos libres de contaminación a los 42 días de la Fase de Introducción

Valor	Valor medio
8	10.460
5	10.050
6	9.640
7	9.640
4	9.230

La prueba de tukey al 0.05% para las variables de frascos de ensayos libres de contaminación (Tabla 17), hubo la presencia de 3 promedio que fueron evaluados el número de frascos de ensayo libres de contaminación. De los resultados alcanzados, se establece 3 promedio, siendo el T5 y T8 como los mejores tratamientos libres de contaminación

Tabla 18. Frascos de ensayos libres de contaminación a los 49 días de la Fase de Introducción.

Trat	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	Σ	X	% Desinfección	% Contaminación
04	0	5	0	7	0	0	5	0	3	0.37	37	63
05	0	8	0	0	0	0	4	4	3	0.37	37	63
06	0	0	7	0	8	0	0	0	2	0.25	25	75
07	0	0	0	0	0	6	0	6	2	0.25	25	75
08	8	4	0	0	0	5	6	0	4	0.50	50	50
									14	1.74		

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 19. Prueba de rango múltiple de tukey de los promedios de la variable frascos de ensayos libres de contaminación a los 49 días de la Fase de Introducción.

Valor	Valor medio
8	10.460
5	10.050
7	9.640
6	9.640
4	9.230

La prueba tukey al 0.05% para las variables de frascos de ensayos libres de contaminación (Tabla 19), hubo la presencia de 4 promedio, que fueron evaluados el número de frascos de ensayo libres de contaminación.

De los resultados alcanzados, se establece 3 promedio, siendo el T8 como los mejor tratamientos libres de contaminación.

Tabla 20. Frascos de ensayos libres de contaminación a los 56 días de la Fase de Introducción.

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	Σ	X	% Desinfección	% Contaminación
O4	0	5	0	7	0	0	5	0	3	0.37	37	63
O5	0	8	0	0	0	0	4	4	3	0.37	37	63
O6	6	0	7	0	8	0	0	0	2	0.25	25	75
O7	0	0	0	0	0	6	0	6	2	0.25	25	75
O8	8	4	0	0	0	5	6	0	3	0.37	37	63
									13	1.61		

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 21. Prueba de rango múltiple de tukey de los promedios de la variable frascos de ensayos libres de contaminación a los 56 días de la Fase de Introducción.

Valor	Valor medio
5	10.870
4	9.230
6	9.230
7	8.820
8	8.410

La prueba de tukey al 0.05% para las variables de fracos de ensayos libres de contaminación (Tabla 21), hubo la presencia de 4 rangos que fueron evaluados el número de frascos de ensayo libres de contaminación. De los resultados alcanzados, se establece 4 promedios, siendo el T5, T4 y T8 como los mejores tratamientos libres de contaminación.

Tabla 22. Supervivencia.

Tratamientos	1	2	3	4	5	6	7	8	Σ	Explantos vivos (%)
O4	0	5	0	7	0	0	5	0	3	37
O5	0	8	0	0	0	0	4	4	3	37
O6	6	0	7	0	8	0	0	0	3	37
O7	0	0	0	0	0	6	0	6	2	25
O8	8	4	0	0	0	5	0	0	3	37
									15	

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 23. Prueba de rango múltiple de tukey de los promedios de la variable supervivencia

Valor	Valor medio
5	10.870
4	9.230
6	9.230
7	8.820
8	8.230

El porcentaje de supervivencia en los tratamientos de la variedad en estudio presentaron los siguientes promedios de supervivencia en el (Tabla 23), para T4, T5, T6, T8 fue de 37% de supervivencia. Es significativo notar que a pesar de que el tratamiento O6, fue el que se le observó con mayor porcentaje de contaminación, logró el 25% de supervivencia. Con esto se puede afirmar que la contaminación, al estar presente en tejido necrosado de la cicatriz de corte, ubicada fuera del medio basal, no afectó a la yema en crecimiento ubicada en la parte central del segmento.

Por el contrario, en trabajos realizados por Pierick (1960), la contaminación del medio y la mala desinfección, provocó la muerte de los explantes, debido a su deficiente capacidad de absorción de nutrientes

Tabla 24. Aparición de callos.

Tratamientos	1	2	3	4	5	6	7	8	Σ	X
O4	0	5	0	7	0	0	5	0	3	0.37
O5	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0.12
O6	6	0	7	0	8	0	0	0	3	0.37
O7	0	0	0	0	0	0	7	0	1	0.12
O8	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0.12
									9	1.1

Fuente: Laboratorio de Biotecnología vegetal UNESUM

Tabla 25. Prueba de rango múltiple de tukey de los promedios de la variable aparición de callos.

Valor	Variable media
4	9.230
6	9.230
5	8.410
7	8.410
8	8.410

La prueba de tukey al 0.05% para las variables de frascos de ensayos libres de contaminación (Tabla 25), hubo la presencia de dos promedio. En el primer promedio se ubicó el valor encontrado en los T4 y T6, en el segundo el T5, T7 T8 y el que fueron evaluados el número de frascos de ensayo libres de contaminación. El resultados alcanzado, se establece dos promedio, siendo los T4y T6 como los mejores tratamientos en aparecimiento de callos.

Discusión

El desarrollo de los resultados estadísticos solo pudo hacerse mediante la influencia que el medio ejerce entre la especie y la hormona. Para llegar a obtener conclusiones válidas y reflexivas se debe mencionar que en la micropropagacion in vitro de banano orito (*musa acuminata*) no existe mayor investigación lo que determinó realizar esta investigación.

En este ensayo, la especie investigada demostró buen comportamiento en el desarrollo del proceso de desinfección, sobrevivencia, aparecimiento de callos y brotes, lo que determino que si factible producir plantas invitro de esta especie para la propagación de plantas resistentes a enfermedades.

Para obtener resultados positivos en la fase de desinfección en la especie *Musa acuminata*, es necesario que se seleccionen protocolos de desinfección adecuado así lo demuestran los resultados obtenidos en el proceso de establecimiento.

En lo que respecta al número de frascos contaminados el T4 , T5 y T8 obtuvo el menor porcentaje de contaminación en comparación con los otros tratamientos, debido a que no existió necrosis en la cicatriz de corte, sitio donde se presentó la contaminación causadas por hongos propios del material vegetal muerto.

Es significativo notar que a pesar de que el tratamiento O6, fue el que se le observo con mayor porcentaje de contaminación, logró el 25% de sobrevivencia. Con esto se puede afirmar que la contaminación, al estar presente en tejido necrosado de la cicatriz de corte, ubicada fuera del medio basal, no afectó a la yema en crecimiento ubicada en la parte central del segmento Por el contrario, en trabajos realizados por Pierick (1960), la contaminación del medio y la mala desinfección, provocó la muerte de los explantes , debido a su deficiente capacidad de absorción de nutrientes.

Para garantizar una mejor desinfección inicial de los cormos de banano orito, se concuerda con (Cassells, 1991). Que recomienda utilizar cloro al 40% en vez de hipoclorito de sodio al 5%, así mismo aumentar de 15 a 20 minutos, el tiempo de inmersión de los explantes en el desinfectante.

El mayor apareamiento de brote se lo alcanzo con 8mg/l de 6- Benzilaminopurina (BAP) y 0.30mg/l de Ácido indolacético (AIA), correspondientes a T8 a siendo este tratamiento el que presento el 87% de contaminación, lo que concluye que la contaminación de los segmentos apicales no interviene en su desarrollo, cuando esta no sea proveniente del medio o por una mala desinfección de los segmentos apicales. El tratamiento de mayor apareamiento de callo se obtuvo con los tratamientos T4 y T5, consiguiendo la formación de una vitroplanta, en lo que concuerda. (Pierik, 1990). Que las auxinas y citoquininas utilizadas en dosis bajas generalmente producen: elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, formando así una nueva planta.

Conclusiones

Las dos hormonas utilizadas las citoquinina y las auxinas en la fase de introducción del banano orito. *Musa acuminata*, bajo condiciones in vitro promovieron el crecimiento de las yemas trayendo consigo la formación de una vitroplanta.

En los pre ensayos el protocolo de desinfección que dio mejor resultado perteneció a la segunda desinfección, en la que se procedio a eliminar las hojas al explante. Los segmentos de yemas fueron sumergidos por un minuto en alcohol de 70, se agitó y se enjuagó por tres veces con agua estéril. Los segmentos de tallo de meristemo se colocaron en bicloruro de mercurio 0.8% durante 7 minuto se agitó y se enjuagó tres veces con agua estéril durante dos minutos, luego se le empleo cloro 40% durante 15 minuto, Se realizó un corte transversal utilizando la yema apical, para obtener un segmento con su respectiva yema, con una longitud 1.5 cm, para evitar su deterioro como fue evidenciado en los pre-ensayos anteriores.

Se logró la mayor apareamiento de brote con 8mg/l de 6- Benzilaminopurina (BAP) y 0.30mg/l de Ácido indolacético (AIA), correspondientes a T8 a pesar que fue el tratamiento que presentó el 87% de contaminación, con esto se concluye que la contaminación de los segmentos apicales no influye en su desarrollo, cuando esta no sea proveniente del medio o por una mala desinfección de los segmentos apicales.

Referencias

AEBE (2011) Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador. Base de datos estadísticos.

Alonso M (2002) Biotecnología aplicada a la mejora de *Pelargonium*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.

Castillo A (2004) Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Bioagro

Castro X (2009) Valoración del potencial de frutos de tres musáceas para la producción de alcohol a nivel de laboratorio” cassells, 1991. Principales problemas en el cultivo in vitro

Canchignia F (2010) Propagación Vegetativa de Plátano y Banano con la Aplicación de

Benzilaminopurina (6-BAP) y Acido Indolacetico (AIA)

FAO (2011) Food and Agriculture Organization of the United Nation. Agricultura data base.

Gonzalos C (2008) Micropropagación vegetativa "in vitro" de aliso (*Ainus acuminata*).

González O (2006) biotecnológicas aplicada al cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam) y su relación con la conservación de la biodiversidad.

Hartmann HT y Kester DE (1987) Propagación de plantas: principios y prácticas. 3ª ed. México (MX): Continental, 960 p. ISBN 968-26-0789-2.

Indacochea G (2012) Micropropagación *in vitro* de banano orito (*Musa acuminata aa.*) para la producción y la seguridad alimentaria.

Jiménez G (1998) Generalidades del cultivo invitro. Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología.

Mendez F (2003) Multiplicación Vegetativa y Cultivo in vitro, 89

Osorio M (2011) Técnicas para la manipulación, modificación y transferencia de materiales genéticos (ingeniería genética).

Ortega N (2010) Obtención de Multimeristemas y Callos de diferentes variedades de Banano y Plátano (*Musa* spp.) a partir de Meristemas Apicales y Scalps.

Pérez E, Ramírez R, Nuñez H, Ochoa N (1999) Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales.

Pierik RLM (1990) Cultivo in vitro de las plantas superiores. Traducido por Luis Eyerbe Mateo-Sagasta. 3ª ed. Madrid (ES): Mundi-Prensa, 326 p. ISBN 84-7114-267-8.

Recalde C (2007) Establecimiento del cultivo IN VITRO y aclimatación en invernadero de nepeta hederacea variegata.

Segretín E (2006) Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales).

Stover RH, Simmonds NW (1987) *Musa* x *Paradisiaca*. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Musa_x_paradisiaca, 1987)

Trujillo R (2004) Micropropagación: Fundamentos del cultivo de tejidos. Centro de Biopl.

Tema 4

Influencia del balance hormonal en la multiplicación *in vitro* del plátano barraganete *Musa paradisiaca* en el cantón jipijapa

Santiago Alvarez, Blanca Indacochea, Marcos Manobanda, Carlos Castro

La ciencia y la tecnología, en la sociedad evolucionaria, deben estar al servicio de la liberación permanente de la humanización del hombre.

Paulo Freire

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo para el cultivo inicial del plátano barraganete., mismo que consiste en obtener la desinfección adecuada, para los segmentos de meristemas y observar la respuesta de estos sometidos a diferentes dosis de fitohormonas para realizar la micropropagación *in vitro*. La investigación se desarrolló durante el año 2012, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Estatal del Sur de Manabí. El trabajo comprendió dos partes. En la primera se determinó el protocolo de desinfección para segmentos de yema de ápices o meristemas. En la segunda parte, se probaron 6 tratamientos en dosis combinadas de la auxina ácido indolacético (AIA) y la citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) en diferentes concentraciones incluyendo el testigo sin fitohormonas. Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) para evaluar las variables: Aparecimiento de callos. Aparecimiento de brotes y porcentaje de sobrevivencia y el Diseño Bloque Completo al Azar (DBCA) para la variable número de frascos contaminados. Se realizaron ocho repeticiones y cinco frascos de ensayo por unidad experimental. Cuando se encontraron diferencias significativas se utilizó la prueba de Tukey al 5%. Se recomienda utilizar el Protocolo de desinfección desarrollado, para estudios de multiplicación *in vitro* de *Musa paradisiaca* y otras Musas; probar el aparecimiento raíces de los segmentos de yemas apicales para el proceso de incubación; evaluar el comportamiento de la vitroplanta en las fases de micropropagación y acondicionamiento *ex vitro*.

Palabras clave: Callos, incubación, tratamiento, auxina, ápice.

Summary

Influence of hormonal balance on *in vitro* multiplication of Barraganete banana *Musa paradisiaca* in the Canton Jipijapa

The objective of the present work was to establish a protocol for the initial crop of the Barraganete banana, which consists in obtaining adequate disinfection for the meristem segments and to observe the response of these which are subjected to different doses of phytohormones for performing the *in vitro* micropropagation. The research was developed during the year 2012, in the Plant Biotechnology Laboratory of the State University of Southern Manabí. The work was divided into two parts. In the first one, the disinfection protocol was determined for apex bud segments or meristems. In the second part, 6 treatments were tested in combined doses of auxin Indoleacetic Acid (AIA) and cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) in different concentrations including the witness without phytohormones. The Completely Randomized Design (DRA) was used to evaluate the variables: Appearance of callus, appearance of sprouts and survival percentage and the Completely Randomized Block Design (CRBD) for the variable number of contaminated

vials. Eight replicates and five test vials, per experimental unit, were performed. When significant differences were found, the Tukey test at 5% was used. It is recommended to use the developed disinfection protocol for *in vitro* multiplication surveys of *Musa paradisiaca* and other Musaceae; to test the appearance of roots of apical bud segments for incubation process; to evaluate the vitroplant behavior in micropropagation phases and *in vitro* conditioning.

Key words: Callus, incubation, treatment, auxin, apex.

Introducción

El plátano es un producto de gran importancia económica a nivel nacional, debido a que es uno de los principales productos en la canasta familiar, su explotación y comercialización genera ingresos y empleo. La calidad externa del plátano es uno de los factores que motiva la compra y entre ellos la presentación de los frutos puede ser afectada por el látex que segregan éstos después del corte y que se adhiere a la cáscara, dándoles un mal aspecto (manchado del fruto). La adecuación del plátano para su comercialización en fresco incluye procesos de cosecha, selección, desmanes, lavado, secado, rotulado y empaque (Díaz *et al.* 2004), El proceso de lavado de frutos de Banano y Plátano en zonas de exportación ha obedecido al tratamiento de los gajos o dedos, por inmersión en una solución de agua más alumbre al 1% durante 15 min. (Rodríguez *et al.* 1998). Al alumbre se le atribuye la propiedad de flocular o precipitar el látex, evitando el manchado y el posterior deterioro de la condición física de los frutos (Rodríguez 1999).

En las zonas de exportación se dispone de infraestructura eficiente para la adecuación del plátano, la cual, incluye tanques de lavado donde es depositado el alumbre y el agua fluye de manera permanente; situación contraria al sistema de adecuación del plátano en la zona cafetera que por las condiciones fisiográficas se recurre a la utilización de tanques móviles de plástico sin que haya renovación del agua durante el lavado en cada cosecha; de allí que el uso de alumbre sea poco efectivo, creando la necesidad de usar productos alternos como: detergentes (Fab), jabón x 20 (base alcalina); lonlife + merteck y steol (shampoo Alemán) (AGROTROP 2002).

La propagación vegetativa para (Díaz *et al.* 2000), es un método utilizado para multiplicar partes vegetativas, utilizándose tejidos vegetales que conserven las características hereditarias de planta donadora y así generar nuevos individuos. La investigación permitirá proporcionar una alternativa que facilite la disponibilidad de un material de siembra en óptimas condiciones (características deseables, excelente calidad genética y aspecto fitosanitario, entre otros) que simplifique la instalación de un sistema de producción, obteniendo plantas uniformes y permite realizar labores de cosecha de la manera más eficiente.

La carencia de material de alta calidad es uno de los factores que limitan el buen desarrollo de las plantaciones de plátano. La propagación vegetativa *in vitro* consiste en la estimulación y proliferación de brotes mediante la aplicación de reguladores de crecimiento.

Materiales y métodos

El presente trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Estatal del Sur de Manabí. Ubicada en el Km. 1 vía a los Ángeles - Noboa. La duración del ensayo abarcó el periodo comprendido entre Mayo a Agosto del 2012.

Material experimental

Segmentos de yemas de ápices plátano barraganete (*Musa paradisiaca*.)

Medio de cultivo Murashige - Skoog (MS) más diferentes dosis de 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indoacético (AIA)

Métodos

El método que se utilizó en esta investigación es el experimental Bloque completamente al azar de 5 x 8, se analizaron los resultados obtenidos en el diseño de la especie utilizada con los distintos niveles de dosis de hormona comparándolos con sus testigos. Se complementó el trabajo con la utilización de otros métodos como el hermenéutico el método inductivo y deductivo.

En la Investigación todos los instrumentos empleados fueron esterilizados en la autoclave a 121 °C y 15 libras de presión.

La investigación comprendió dos partes:

Primera parte: Protocolo de desinfección.

Segunda parte: Iniciación o introducción

Manejo específico del experimento

La primera parte del trabajo consistió en encontrar un protocolo de desinfección apropiado para los segmentos de yemas apicales. El trabajo demandó un período de tres meses comprendido entre Abril 2012 y Junio 2012, en el que se probaron diferentes compuestos químicos con propiedades desinfectantes, que cumplieron con la condición de ser fácilmente disponibles y económicamente accesibles.

La segunda parte del trabajo se realizó en Junio - Agosto 2012. Consistió en probar las diferentes dosis de fitohormonas, tomando un tiempo de noventa días.

Transcurrido ese tiempo, los segmentos de yemas apicales fueron transferidos a un medio fresco, para evitar su deterioro por el desgaste de nutrientes

Preparación del material vegetal

Las plantas utilizadas para el desarrollo de la investigación, fueron obtenidas de la hacienda Bazurto ubicado en el Cantón Valencia Provincia de los Ríos. Se eligieron las plantas que demostraron las características fenológicas tipo. Se ejecutó el protocolo que resultó ser el más apropiado para este trabajo de conformidad con los resultados obtenidos en los pre-ensayos.

El proceso continuo fue el siguiente:

- Se prepararon segmentos de meristemo, se hizo la primera reducción de meristemo entre 2.5 - 5 cm, provenientes de las plantas madre.
- Se procedió a eliminar las hojas al kolino.
- Los segmentos de tallo fueron lavados y sumergidos con agua corriente y detergentes hasta que salga el detergente, se coloca en una solución de 3% NaOCI mL/L + Tween 80 durante 20 minutos, se realizo 3 enjuagues.
- Los segmentos de tallo fueron sumergidos con Biclورو de mercurio 0.05% durante 5 minutos, se realizo 5 enjuagues. Luego se realizo

la segunda reducción de meristemo de 1.5 cm de base y 3 cm total, se dejó en cisteína y se trasladó al área de siembra.

- Se colocaron los segmentos de tallo en Tween80, en la dosis de 15ml/litro, durante 20 minutos y se agitó ocasionalmente.
- Se sumergieron los segmentos de tallo en solución Captan 80%, DF a una concentración de 1 g/L, durante 15 minutos.
- Los segmentos de tallo fueron lavados tres veces, por dos minutos, con agua estéril.

Preparación de los medios de cultivo para la Investigación.

- Se preparó los Stocks I, II, III, IV, y vitaminas
- Se preparó el medio Murashige Skoog (MS), 200ml para cada tratamiento utilizando los siete stocks, sacarosa y agar.
- Se adicionaron las fitohormonas; ácido indolacético (AIA) y 6- Bencilaminopurina (BAP) en dosis diferentes excepto el testigo
- Se reguló el pH a 5.5 con ácido sulfúrico (H₂SO₄) en una concentración de 0.0001ppm, e hidróxido de sodio (NaOH) en la misma concentración.
- El medio de cultivo fue calentado para luego adicionar el agar a una concentración de 7.5g/l.
- El medio de cultivo se repartió en 40 frascos de ensayo 5mL/frasco.
- Los frascos de ensayo se sellaron con tapa tipo rosca y se esterilizaron en el autoclave a 15 libras de presión durante quince minutos.
- Los frascos fueron llevados al almacén de medio de cultivo y permanecieron en él durante 24 horas previo a su utilización.
- Los segmentos de yemas de ápice se colocaron en el medio de cultivo.
- Los frascos de ensayo se sellaron con tapa tipo rosca, con el fin de evitar contaminación y deshidratación de los segmento de yema de ápices.
- Los frascos así preparados fueron trasladados al cuarto de incubación o crecimiento con una humedad relativa del 60% y una temperatura de 24°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos tanto en los pre-ensayos (Primera Parte) como en los ensayos definitivos (Segunda Parte) fueron los siguientes:

Tabla 1. Número de frascos contaminados en la Etapa Preparatoria.

Desinfección	Frascos contaminados	Eficiencia de desinfección (%)
PROTOCOLO I	3	62.5
PROTOCOLO II	1	87.5
PROTOCOLO III	1	87.5
PROTOCOLO IV	2	75.0
PROTOCOLO V	5	37.5

Tabla 2. Número de frascos fenolizado en la Etapa Preparatoria.

Tratamiento de desinfección	de Frascos fenolizados	Frascos no fenolizado (%)
PROTOCOLO I	3	62.5
PROTOCOLO II	1	87.5
PROTOCOLO III	-	100
PROTOCOLO IV	-	100
PROTOCOLO V	4	50.0

En la tabla 1, se puede apreciar que el Protocolo III y IV alcanzó una eficiencia del 100% de no fenolización. En la tabla 2, se puede apreciar que los frascos fenolizados se presentaron en los protocolos I, II y V, con la presencia de 8 frascos de ensayos fenolizados de los 40 utilizados del ensayo.

A pesar de que se partió de explantes obtenidos de la empresa bananera “Bazurto”, el cual no contaba, por un lado, con medidas sanitarias de acceso, tenía una estructura abierta en los flancos, lo que daba lugar al ingreso de agentes contaminantes, incluso de insectos; y, por otro lado, el riego por aspersión, provocaba salpicaduras y dispersión de potenciales agentes patógenos. Sin embargo, el porcentaje de contaminación apenas fue 12,5 -37,5%, incluyendo la causada por hongos y bacterias, con lo que reafirma el éxito obtenido en esta etapa del presente estudio.

Los explantes contaminados tanto por hongos, bacterias o por ambos, fueron retirados y descartados, sin embargo, según Vuylsteke (1989), Estos pueden ser utilizados nuevamente efectuando una desinfección con antibióticos comerciales del tipo Cefotaximun (Cefaloxporina) y Carbenicillin (Sal sódica de A-arboxibencil penicilina) a concentraciones de 150mg/L y 1000mg/respectivamente.

La contaminación puede disminuirse aún más, aumentando las medidas de asepsia dentro y cerca de la sala de transferencia, así como garantizando una esterilización más cuidadosa de instrumentos, medios de cultivo, envases y la desinfección del área de transferencia y del operario (técnico que realiza la siembra); también es aconsejable emplear explante de menor tamaño para la siembra inicial.

Para garantizar una mejor desinfección inicial de los cormos Fitchet & Winnaar (1988), recomiendan utilizar hipoclorito al 10% en vez de hipoclorito de sodio al 5%, así mismo aumentar de 10 a 20 minutos, el tiempo de inmersión de los explantes en el desinfectante.

En cuanto a la fenolización o necrosis (oscurecimiento de las paredes del corno) de los explantes, a pesar de que se observó claramente este fenómeno, las pérdidas de material (explantes) no fueron considerables, puesto que solamente hubo un porcentaje en tres tratamientos que presentaron porcentaje de contaminación de 12.5- 37.5% y fueron descartados por esta causa.

Un aspecto que se debe considerar es que el Tween 80, por ser un bactericida eficaz y por lograr la mejor adherencia de los productos químicos de desinfección (Gutiérrez y Chen-Han 1994), fue utilizado en todos los tratamientos de esta fase. Su dosis y tiempo de aplicación fueron incrementados gradualmente y sus resultados fueron más promisorios. La desinfección se complementó con los fungicidas protectante Captan 80 DF, Cobre Nordox, Cymoxopac, Amistar.

Se encontró que el Protocolo III y IV cumplieron con las condiciones apropiadas de desinfección en este trabajo experimental, por lo tanto fue el utilizado en el ensayo definitivo.

Tabla 3. Porcentaje de contaminación de yemas de apicales *Musa paradisiaca*

Tratamientos	Días							
	7	14	21	28	35	42	49	56
T1	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	25	25	37.5	37.5	50	50	50	50
T3	12.5	12.5	12.5	12.5	25	25	25	25
T4	12.5	12.5	12.5	12.5	50	50	50	50
T5	N.C	25	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5
T6	N.C	25	37.5	37.5	25	37.5	37.5	37.5

Tabla 4. Prueba múltiple de Tukey de los promedios de la variable frascos de ensayo contaminados.

Valor 2	Valor 12 Medio
2	1.307
4	1.256
6	1.205
3	1.205
5	1.051

La prueba Tukey al 5% para tratamientos (Tabla 4), detectó la presencia de tres variables. En el primer promedio T2, en el segundo los T 4, 6 y 3 y en el tercero el T5 en que fueron evaluados el número de frascos contaminados. De los resultados obtenidos, se puede señalar que a medida que transcurre el tiempo, también se incrementa el número de frascos contaminados.

Básicamente, hasta el momento se puede afirmar que la contaminación fue causada por hongos, pues se evidenció la presencia de micelio. Esta contaminación estaría atribuida a que el material vegetal empieza a necrosarse en la cicatriz de corte, sitio en el cual se observó la contaminación. El tratamiento con menor contaminación corresponde al T3 con un valor de 25%. Los valores registrados, pueden atribuirse a que el material vegetal utilizado provino de distintas plantas madre en diferente estado fisiológico y posiblemente en este tratamiento se incluyó material vegetal proveniente de una planta madre joven, donde la respuesta *in vitro* es adecuada y las posibilidades de contaminación por deterioro del explante disminuyen, debido a que los tejidos están en plena división celular y crecimiento, a diferencia de las plantas viejas, como reportó Krikorian (1991b), quien indica que entre los factores que afectan la micropropagación se encuentra el estado fisiológico de las plantas, en especial el factor juvenilidad.

Tabla 5. Prueba de rango múltiple de Tukey de los promedios de la variable frascos libres de contaminación a los 7 días de la Fase de Introducción.

Valor 2	Valor 3 Medio
2	1.359
3	1.359
4	1.307
6	1.256
5	1.151

La prueba Tukey al 0.05% para las variables de frascos libres de contaminación (Tabla 5), detectó la presencia de cuatro variables. En el primer lugar se ubicaron los T2 y T3, en el segundo el T4, en el tercero T6, y en el cuarto T5 que fueron evaluados el número de frascos libres de contaminación. De los resultados obtenidos, se establece que el T5 y T6 son los mejores tratamientos libres de contaminación.

Tabla 6. Prueba de rango múltiple de Tukey de los promedios de la variable frascos de ensayos libres de contaminación a los 14 días de la Fase de Introducción.

Valor 2	Valor 4 Medio
2	1.462
3	1.359
4	1.359
5	1.307
6	1.154

La prueba Tukey al 0.05% para las variables de frascos libres de contaminación (Tabla 6), detectó la presencia de cuatro promedios. En el primero se ubicó el T2, en el segundo T3 y T4, en el tercero T5, y en el cuarto T6, que fueron evaluados el número de frascos libres de contaminación. De los resultados obtenidos, siendo los T3 y T4, los mejores tratamientos libres de contaminación.

Tabla 7. Prueba de rango múltiple de Tukey de los promedios de la variable frascos libres de contaminación a los 42 días de la Fase de Introducción.

Valor 2	Valor 8 Medio
3	1.307
4	1.256
2	1.205
5	1.205
6	1.102

La prueba Tukey al 0.05% para las variables de frascos libres de contaminación (Tabla 7), detectó la presencia de tres variables. En el primer caso se ubicó el T3, en el segundo los T4, T2 y T5 y el tercer T6, que fueron evaluados el número de frascos libres de contaminación. De los resultados obtenidos, se establece que el T3 es el mejor tratamiento libre de contaminación a los 42 días de la Fase de Introducción alcanzaron los resultados.

Tabla 8. Prueba de rango múltiple de Tukey de los promedios de la variable frascos libres de contaminación a los 49 días de la Fase de Introducción.

Valor 2	Valor 9 Medio
3	1.307
5	1.256
2	1.205
4	1.205
6	1.051

La prueba Tukey al 0.05% para las variables frascos libres de contaminación (Tabla 8), detectó la presencia de tres variables. En el primer caso se ubicó el T3, en el segundo los T2, T4 y T5 y en el tercer T6 que fueron evaluados el número de frascos libres de contaminación a los 49 días de la Fase de Introducción. De los resultados obtenidos, se establece el T3 como mejor tratamiento libre de contaminación.

Tabla 9. Prueba de rango múltiple de Tukey de los promedios de la variable frascos libres de contaminación a los 56 días de la Fase de Introducción.

Valor 2	Valor 11 Medio
3	1.307
5	1.256
2	1.205
4	1.205
6	1.051

La prueba Tukey al 0.05% para las variables de frascos libres de contaminación (Tabla 9), detectó la presencia de cuatro promedios. En el primer se ubicó el T3, en el segundo el T5, tercer lugar los T2, T4 y en el cuarto T6, que fueron evaluados el número de frascos libres de contaminación. De los resultados obtenidos, se establece al T3 como el mejor tratamiento libre de contaminación a los 56 días de la Fase de Introducción.

Tabla 10. Prueba de rango múltiple de Tukey de los promedios de la variable Aparición de callo.

Var 2	Valor 13 Medio
2	1.205
3	1.205
4	1.051
5	1.051
6	1.102

La prueba Tukey al 0.05% para las variables aparición de callos (Tabla 10), detectó la presencia de tres promedios. El primero ubica a los T2 y T3, el segundo los T4, T5 y el tercer T6 que fueron evaluados el número de frascos con aparición de callos. De los resultados obtenidos, se establece los T2 y T3 como los mejores tratamientos de apareamiento de callos en la Fase de Introducción.

Tabla 11. Prueba de rango múltiple de Tukey de los promedios de la variable Aparición de brotes.

Valor 2	Valor 14 Medio
4	1.154
3	1.102
5	1.102
2	1.051
6	1.000

La prueba Tukey al 0.05% para las variables de frascos con aparición de brotes (Tabla 11), detectó la presencia de cuatro variables. En el primer lugar se ubica el T4, el segundo los T3, T5, el tercer T2 y el cuarto T6 que fueron evaluados el número de frascos con aparición de brotes. De los resultados obtenidos el T4 obtuvo el mejor tratamiento con aparición de brotes de la Fase de Introducción.

Sobrevivencia

En esta variable se hizo una evaluación porcentual de los segmentos de yemas de ápices al término de la Fase de Introducción. Los datos se obtuvieron a los 56 días de terminada fase de introducción.

Tabla 12. Porcentaje de sobrevivencia en la Fase de Introducción.

Tratamientos	Medias (%)
T1	-
T2	37.5
T3	75.0
T4	75.0
T5	50.0
T6	12.0

De acuerdo a porcentaje de sobrevivencia en los tratamientos de la variedad en estudio presentaron los siguientes promedios de sobrevivencia para T3 y T4 fue de 75% de sobrevivencia (Tabla 12).

Es importante notar que a pesar de que T6, fue el tratamiento con mayor porcentaje de contaminación, alcanzó el 12% de sobrevivencia. Se puede afirmar que la contaminación, al estar presente en tejido necrosado de la cicatriz de corte, ubicada fuera del medio basal, no afectó a la yema en crecimiento ubicada en la parte central del segmento nodal, la cual se desarrolló normalmente.

Por el contrario, en trabajos realizados por Pierick (1960), la contaminación del medio y la mala desinfección, provocó la muerte de los explantes de *Cymbidium sp.*, debido a su deficiente capacidad de absorción de nutrientes.

Discusión

La base de este trabajo de investigación, fue la búsqueda de un protocolo eficiente para la producción de plantas de plátano barraganete mediante micropropagación. El cultivo *in vitro*, permite la multiplicación de plantas a gran escala, especialmente en el ámbito de la producción comercial, lo que determinó hacer este ensayo sobre Influencia del balance hormonal en la multiplicación *in vitro* del plátano barraganete *Musa paradisiaca* en el cantón Jipijapa.

Los resultados del experimento uno en la fase de establecimiento mostró que el tratamiento 3 en bicloruro 0,05% durante 20 minutos se agitó ocasionalmente y se enjuagó tres veces con agua estéril durante dos minutos, luego se le empleó 30% durante 5 minutos, y luego se utilizó cobre nordox 0,5% + Amistar 0,5% durante 15 minutos. Obtuvo un promedio de contaminación por hongos y bacterias fue de 12,5%, lo que permitió una sobrevivencia del 87,5%. Esto demuestra que el uso de bicloruro, cloro, combinado con cobre nordox 0,5% + Amistar 0,5%, puede controlar este tipo de microorganismos, al menos durante los 28 días que permanecieron en el medio de cultivo inicial. También corroboran dichos resultados los obtenidos por Fitchert & Winnaar (1988), quienes determinaron que la contaminación por hongos es uno de los principales problemas que limitan el establecimiento aséptico de segmentos nodales.

En cuanto al tratamiento de mayor apareamiento de callo se obtuvo con los tratamientos T2 y T3, La producción de callo se vio incrementada por la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, aunque la presencia de citoquininas aumenta los niveles de oxidación en lo que se concuerda con (Mroginski y Roca 1993), ya que una vez que comienza la división celular la oxidación se reduce debido a que el proceso de exudado de sustancias fenólicas se ve inhibido. Existía también una relación negativa entre la presencia de oxidación y la producción de callo. Esto puede confirmar la teoría sugerida anteriormente acerca de la inhibición del crecimiento del callo por la presencia de oxidados fenólicos.

El empleo de la citoquininas bencilaminopurina (BAP) hace que en los explantes regeneren mayor número de plantas y de menor tamaño a medida que aumenta la concentración de la citoquininas en el medio de cultivo ya que el BAP actúa como inhibidor de la dominancia apical y potencia la formación de brotes laterales (Flores 1998).

El objetivo de esta fase fue establecer una mejor concentración de citoquininas (BAP) para la proliferación de brotes de plátano barraganete, luego de los 56 días de haber sido transferido los explantes al medio con diferentes concentraciones de citoquininas, no se observó diferencias significativas, el tratamiento T4 (4mg/l de 6- Benzilaminopurina (BAP) y 0.60mg/l de Ácido indolacético (AIA), sin embargo presentó el promedio más alto en supervivencia con un 75% de explantes vivos. Por lo tanto queda aceptada nuestra hipótesis, estos resultados son similares a la investigación realizada por (Ortega 2010) quien con explantes evaluados a las nueve semanas observaron que la proliferación de brotes con BAP al 0,5 mg L⁻¹ fue el mejor tratamiento en cuanto a la aparición nuevas yemas, brotes con mayor longitud en comparación con los otros tratamientos.

La micropropagación mediante la inducción de yemas axilares y apicales derivados de

plántulas de *Crescentia cujete*, ha sido efectiva presentando un 98% de brotación a partir de plántulas germinadas in vitro. Sin embargo, la inducción de brotes a partir de tallos y hojas hasta ahora no ha dado resultados positivos. Asimismo para esta especie resultó una limitante significativa el alto índice de contaminación por bacterias en los explantes empleados (Estopa 2005). Esta investigación coincide con el presente estudio, donde se utilizó meristemas de yemas tampoco obtuvimos el mayor porcentaje de supervivencia requerido en todos los tratamientos, que permita a lo posterior su enraizamiento, al igual que investigaciones anteriores tuvimos un limitante que fue la contaminación.

Conclusiones

- En la desinfección de los explantes de plátano barraganete (*Musa paradisiaca*) en la fase de establecimiento se obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia fue con la concentración de bicloruro 0,05% durante 20 minutos, cloro 30% durante 5 minutos, cobre nordox 0,5% + Amistar 0,5% 15 minutos, se obtuvo un promedio de contaminación por hongos y bacterias de 12.5%, lo que permitió una sobrevivencia del 87,5%.
- Para la proliferación de brotes y callos en plátano (*Musa paradisiaca*), se obtuvo con 4mg/l de Bencilaminopurina (BAP) y 0.60, 0mg/l de Ácido indolacético (AIA).
- El tratamiento T4 (4mg/l de 6- Benzilaminopurina (BAP) y 0.60mg/l de Ácido indolacético (AIA), presentó el promedio más alto en supervivencia con un 75% de explantes vivos.

Referencias

Alvarenga S (2004) Manual de laboratorio de cultivo de tejidos. San José (CR): Centro de investigaciones en Biotecnología. 77 p.

Álvarez A (2003) Cultivo in vitro de vegetales, Biotecnología. Disponible en: http://www.ffyb.uba.ar/micro_ind/biotec_alim/clase Biotecnología.

Angarita A, Perea M (1995) Micropropagación de plátano y bananos, Cap. 22 (Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/depar/areas/biología/fisiología.vegetal.pdf>, 1995.

AGROTROP (2002) Bioestan en la propagación in vitro del plátano macho (*Musa* sp. AAB). En: Memorias AGROTROP/2002, UNAH.2002.

Canchignia F y Ramos L (s/a) Micropropagación de plátano variedad Barragante. Laboratorio de Biotecnología vegetal. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Echenique V, Mroginski L, Rusbinstein C (2004) Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires (AR): INTA, 424 p. ISBN 987-521-138-9.

Elorrieta M (1993) Caracterización y análisis de la variabilidad genética en poblaciones españolas de tenca (*Tinca tinca*). [Tesis Doc. Ciencias Biológicas] Madrid (ES): Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Biología, 148 p.

Espinoza L (2007) Monitoreo in vitro del potencial de cinco nutrientes (B, Zn, Mn, Cu, Si) sobre el desarrollo de diferentes estructuras de *M. fijiensis*. ESPOL – Tesis de Grado. Ecuador: 6 de marzo de 2007.

Estopa M y Bagot L (2005) El cultivo in vitro en la reproducción vegetativa en plantas de vivero: situación actual. Revista Horticultura 16 (1): 50-58.

Tema 5

Propagación vegetativa de plátano (*Musa paradisiaca*), dominico (*Musa sapientum*) y banano (*Musa cavendish*), mediante el uso de hormonas de enraizamiento ANA y BAP, en el laboratorio de biotecnología vegetal

Paul Choez Indacochea, Blanca Indacochea G, Marcos Manobanda

Ayudar al que lo necesita no sólo es parte del deber, sino de la felicidad

José Martí

Resumen

La investigación Propagación vegetativa del plátano (*Musa Paradisiaca*), dominico (*Musa Sapientum*) y banano (*Musa Cavendish*), mediante el uso de hormonas de enraizamiento (ANA y BAP), fue realizado en el laboratorio de biotecnología vegetal, de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, los objetivos fueron: i) determinar el comportamiento agronómico en la multiplicación vegetativa de plátano y banano con la aplicación de ácido naftilacético (ANA) y Benzilaminopurina (BAP), ii) evaluar los porcentajes de sobrevivencia en los tratamientos de inducción de raíces del plátano y banano; además de establecer el costo unitario de las plantas en la fase de introducción. Se utilizó el diseño experimental de bloques Completamente al azar en arreglo factorial 3 x 9 con tres repeticiones. Los factores estudiados fueron el A variedad de plátano que consistía en Plátano barraganete, Dominico y Guineo seda y el B Hormonas Ácido a-naftalen acético (ANA) y Benzilaminopurina (BAP), que consistía en las mezclas de sin Hormona (testigo), 30 mg L⁻¹ ANA, 40 mg L⁻¹ ANA, 50 mg L⁻¹ ANA, 60 mg L⁻¹ ANA, 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP, 40 mg L⁻¹ ANA + 12 mg L⁻¹ BAP, 50 mg L⁻¹ ANA + 14 mg L⁻¹ BAP y 60 mg L⁻¹ ANA + 16 mg L⁻¹ BAP. Las conclusiones indican que la mayor longitud de brotes se presentó en Plátano Dominico x 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP con 8.73 cm en promedio y el mayor diámetro de brotes se dio Plátano Dominico x 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP con 2.67 mm en promedio. El mayor número de brotes por cepa se presentó en Plátano barraganete x 30 mg L⁻¹ ANA con 2.47 brotes. El número de raíces por cepa fue el mejor tratamiento a Plátano barraganete x 60 mg L⁻¹ ANA + 16 mg L⁻¹ BAP con 7.77 cm. El Vigor presenta de acuerdo a la escala arbitraria realizada como mejor tratamientos a Plátano barraganete x 30 mg L⁻¹ ANA; Plátano barraganete x 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP; Plátano barraganete x 50 mg L⁻¹ ANA + 14 mg L⁻¹ BAP; Plátano Dominico x 40 mg L⁻¹ ANA; Plátano Dominico x 60 mg L⁻¹ ANA y Plátano Dominico x 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP con 1.40 de vigor cada uno respectivamente.

Palabras clave: Brotes, tratamiento, raíces, vigor, diámetro.

Summary

Vegetative propagation of banana (*Musa paradisiaca*), Dominican (*Musa sapientum*) and banana (*Musa cavendish*), through the use of ANA and BAP rooting hormones in the Plant Biotechnology Laboratory

The Vegetative Propagation of banana (*Musa Paradisiaca*), Dominican (*Musa Sapientum*) and banana (*Musa Cavendish*) research, through the use of rooting hormones (ANA and BAP), was carried out in the plant biotechnology laboratory of the State University of Southern Manabí. The objectives were: i) to determine the agronomic behavior in banana vegetative multiplication and banana with the application of naphthylacetic acid (NAA) and Benzylaminopurine (BAP), ii) to evaluate the survival rates in the induction treatments of banana roots; in addition, to establishing the unit cost of the plants in the introduction phase. The experimental design of blocks completely randomized in factorial arrangement 3 x 9 with three replicates was used. The factors studied were the A banana variety which consisted of banana Barraganete, Dominican and Silk Guineo and the B Hormones A-naphthalene acetic acid (ANA) and Benzylaminopurine (BAP), which consisted of mixtures without Hormone (witness), 30 Mg L⁻¹ ANA, 40 mg L⁻¹ ANA, 50 mg L⁻¹ ANA, 60 mg L⁻¹ ANA, 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP, 40 mg L⁻¹ ANA + 12 mg L⁻¹ BAP, 50 mg L⁻¹ ANA + 14 mg L⁻¹ BAP and 60 mg L⁻¹ ANA + 16 mg L⁻¹ BAP. The conclusions indicate that the highest length of sprouts was presented in Dominican Banana x 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP with 8.73 cm in average and the largest sprouts diameter was given in Dominican Banana x 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP with 2.67 mm on average. The highest number of sprouts, per strain, was reported in barraganete banana x 30 mg L⁻¹ ANA with 2.47 sprouts. The number of roots, per strain, was the best treatment for banana barraganete x 60 mg L⁻¹ ANA + 16 mg L⁻¹ BAP with 7.77 cm. The Vigor is presented according to the arbitrary scale performed as the best treatment to Banana barraganete x 30 mg L⁻¹ ANA; Banana barraganete x 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP; Banana barraganete x 50 mg L⁻¹ ANA + 14 mg L⁻¹ BAP; Dominican banana x 40 mg L⁻¹ ANA; Dominican banana x 60 mg L⁻¹ ANA and Dominican banana x 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP with 1.40 of vigor each, respectively.

Key words: Sprouts, treatment, roots, vigor, diameter.

Introducción

La presente investigación tuvo como propósito utilizar colinos de una planta madre de Plátano (*Musa paradisiaca*), ejecutando diferentes dosis de reguladores de crecimiento haciendo comparación y probar que dosis actúa más rápido en el proceso de enraizamiento. La carencia de material de alta calidad es uno de los factores que limitan el buen desarrollo de las plantaciones de plátano y banano. La propagación vegetativa consiste en la estimulación y proliferación de brotes mediante la aplicación exógena de reguladores de crecimiento. La propagación clonal o vegetativa es un método utilizado para multiplicar partes vegetativas, utilizándose tejidos vegetales que conserven las características hereditarias de planta donadora y así generar nuevos individuos. (Vásquez, 2000)

La propagación vegetativa o asexual se utiliza para producir una planta que posea el mismo genotipo que la planta madre (planta donadora) y esto es posible porque todas las células de una planta poseen la información necesaria o suficiente para reproducir la planta entera. Las auxinas influyen en el crecimiento de órganos vegetales estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución. (Maluenda y Reyes, 2003)

En la mayoría de los procesos en que están implicadas las citoquininas ésta a su vez participa junto con otras hormonas, especialmente auxinas. La investigación tuvo como fin proporcionar una alternativa que facilite la disponibilidad de un material de siembra en óptimas condiciones (características deseables excelente calidad genética y aspecto fitosanitario, entre otros) que simplifique la instalación de un sistema de producción, obteniendo plantas uniformes y permita realizar labores de cosecha de la manera más eficiente. La propagación vegetativa o asexual es posible ya que los órganos vegetativos de muchas plantas tienen la capacidad de reproducirse (Hartmann y Kester, 1988)

La vía de multiplicación sexual en muchas especies vegetales tarda gran cantidad de tiempo hasta obtener la joven planta que luego será trasplantada previo la obtención de un tamaño adecuado como: longitud de tallo, grosor de tallo, número de hojas, cantidad de raíces; factores que incurren en altos costos de producción debido a la relación tiempo/gastos, esto determina que se recurra a otro método de multiplicación vegetativa como es la asexual, a través de acodos aéreos, terrestres, obteniéndose resultados muchos más satisfactorios y en menor tiempo. (Arismendi J, 2002) en el presente trabajo de investigación se planteó el objetivo Evaluar la propagación vegetativa del plátano (*Musa paradisiaca*), dominico (*Musa sapientum*) y banano (*Musa cavendish*), con la aplicación de ácido naftilacético (ANA) y benzilaminopurina (BAP).

Materiales y métodos

Diseño experimental.

- a) Factores en estudio.

Factor A: Variedad de plátano

V₁ Plátano barraganete (*Musa Paradisiaca*)

V₂ Plátano Dominicano (*Musa Sapientum*)

V₃ Guineo seda (*Musa Cavendish*)

Factor B: Hormonas: Ácido- naftilacético (ANA) y Benziladenina (BAP).

C0 = Sin Hormona (testigo)

C1 = 30 mg L⁻¹ ANA

C2 = 40 mg L⁻¹ ANA

C3 = 50 mg L⁻¹ ANA

C4 = 60 mg L⁻¹ ANA

C5 = 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP

C6 = 40 mg L⁻¹ ANA + 12 mg L⁻¹ BAP

C7 = 50 mg L⁻¹ ANA + 14 mg L⁻¹ BAP

C8 = 60 mg L⁻¹ ANA + 16 mg L⁻¹ BAP

Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental de bloques Completamente al azar en arreglo factorial 3 x 9 con tres repeticiones. Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), con 27 tratamientos y tres repeticiones (27 x 3). Cada unidad experimental estuvo constituida por 1 cepa, para determinar diferencias entre medias de los tratamientos se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey al 0.05% de probabilidad.

Metodología

Manejo del experimento

Área de estudio: El presente trabajo experimental se realizó en el cantón Jipijapa que se encuentra localizado en la parte sur de la provincia de Manabí entre las coordenadas 80° 37' 00'' de longitud y 1° 17' 40''S en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, Ubicado en el Km. 1 vía Noboa, la duración del ensayo abarcó el periodo comprendido entre Mayo a Agosto del 2013

Material biológico: El material fue extraído de las fincas de los agricultores ubicados en la Parroquia la Unión, recinto San Eloy y el recinto Andil perteneciente al cantón Jipijapa un día antes de realizar el ensayo

Preparación del sustrato empleado: el sustrato utilizado fue arena de río, tierra negra y estiércol de ganado bovino la tierra negra fue coleccionada en los cafetales del recinto Cabo de Hacha y se utilizaron 60 sacos quintaleros por las 3 platabanda 20 por cada una, 7 sacos de estiércol de ganado y 7 sacos de arena de río aplicando una relación de 3-1-1 tres de tierra negra, uno de arena de río y uno de estiércol de ganado para la elaboración del sustrato.

Desinfección del material vegetativo: Para la desinfección de las 81 cepas se utilizó un recipiente de 60 litros de agua con 30 gramos del fungicida cobre de nordox durante 20 minutos sumergieron los colinos (10 gramos por cada 20 litros de agua).

Preparación y siembra del material vegetativo: Se procedió a lavar y eliminar las raíces y pseudotallos viejo. Se cortó transversalmente el pseudotallo de cada yema a 2 cm del cuello del rizoma, luego se eliminó la yema central o ápices meristematicos (romper la dominancia apical), a una profundidad de 4 cm, dejando una cavidad de 2 cm de diámetro aproximadamente. A continuación se realizó un corte en forma de cruz al segmento inyectando con una jeringuilla las diferentes concentraciones de hormonas por cada variedad de plátano una vez concluido este paso se lo llevo a su lugar definitivo.

Establecimiento en vivero: El área total tuvo una dimensión de 63m² constituido por tres camas 3m de ancho y 9m de longitud.

Preparación de concentraciones hormonal: Para la preparación de las concentraciones hormonales ácido naftilacético (ANA) y Benziladenina (BAP) se las realizo en el laboratorio de biotecnología vegetal en la que se utilizo una balanza analítica, esta a su vez era encerada cada vez que se iba a pesar. Aplicando una regla de 3 para sacar los miligramos ese uso papel aluminio con el que se elaboró recipientes pequeños que se usaban en cada pesado de hormona ya distribuidos las concentraciones en sus respectivos frascos se usó hidróxido de sodio para disolver las hormonas y se enrazo a 25 con agua ionizada.

Riego: se aplicó diariamente riego en frecuencia de 2 veces al día con un intervalo de 1 hora daría.

Resultados

Longitud de brote

La Tabla 1, presenta el análisis de varianza realizado para la longitud de brote, en este se puede observar que el factor A variedad de plátano y el Factor B Hormonas: Ácido Naftilacético (ANA) y benzilaminopurina (BAP), presentan diferencias estadísticas altamente significativas, la

interacción Variedad de plátano x Hormonas: Ácido Naftilacético (ANA) y Benzilanino (BAP), presenta diferencia estadísticas significativas. El Coeficiente de variación es 55.21 % y el promedio general 4.21 cm.

Los valores promedios y la prueba de Tukey realizada, se puede observar que el factor A o variedad de plátano presenta tres rangos de significación estadística, el mayor corresponde a plátano dominico con 6.32 cm y el más bajo se presentó en guineo de seda con 1.80 cm.

El factor B Hormonas: Ácido Naftilacético (ANA) y Benzilanino (BAP), presenta dos rangos de significación estadística, el mayor corresponde al tratamiento 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 6.71 cm y el rango más bajo corresponde al resto de tratamientos.

La interacción presenta cuatro rangos de significación estadística, el mayor corresponde a 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP con 8.73 cm y el rango más bajo se presentó en el tratamiento Sin Hormona, 40 mg L-1 ANA, 50 mg L-1 ANA, 60 mg L-1 ANA, 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP, 40 mg L-1 ANA + 12 mg L-1 BAP y 50 mg L-1 ANA + 14 mg L-1 BAP con 1.00 cm cada uno respectivamente.

Tabla 1. Análisis de varianza de longitud de brotes.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADO	CUADRADOS MEDIOS	F CALCULADA	F DE TABLA	
					0.05	0.01
Repetición	2	0.68	0.34	0.06	3.18	5.06
Variedad de plátano	2	278.90	139.45	25.88**	3.18	5.06
Hormonas: (ANA) y (BAP).	8	138.14	17.27	3.20**	2.13	2.88
Variedad de plátano x Hormonas: (ANA) y (BAP).	16	173.17	10.82	2.01*	1.85	2.39
Error	52	280.23	5.39			
Total	80					
Promedio	4.21					
C.V. %	55.21					

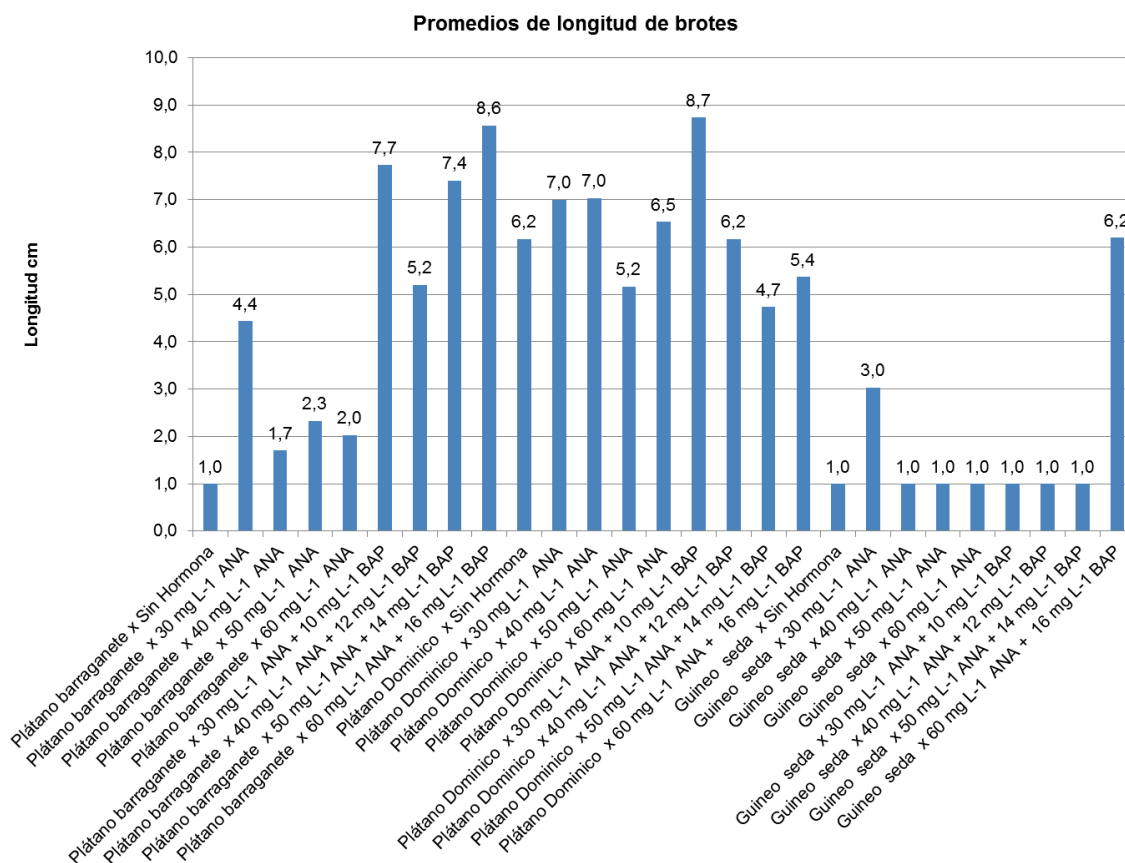


Figura 1. Presenta los valores de longitud de brotes, se puede ver que la mayor longitud se presenta en el tratamiento 9 (Plátano barraganete x 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP) y 15 (Plátano Dominico x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP) con 8,57 y 8,73 cm., cada uno respectivamente.

Diámetro de brotes

La Tabla 2, presenta el análisis de varianza de la variable diámetro de brotes, en este se puede observar que el Factor A o variedades de plátano presentan diferencias estadísticas altamente significativas, el Factor B Hormonas: Ácido Naftilacético (ANA) y Benzilanina (BAP), presentan diferencias estadísticas significativas, las otras fuentes de variación no presentan diferencia estadística alguna. El Coeficiente de Variación es 31.25 % y el promedio general 1.74 mm.

Los valores promedios y la prueba de Tukey efectuada, en el que se puede notar que el Factor A o variedades de plátano presenta tres rango de significación estadística, el mayor corresponde a la variedad Plátano Dominico con 2.11 mm y el rango más bajo se presentó en guineo de seda con 1.14 mm. El Factor B Hormonas: Ácido Naftilacético (ANA) y Benzilanino (BAP), presenta tres rangos de significación estadística, el mayor corresponde a 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 2.13 mm y el rango más bajo se presentó en Sin Hormona (testigo) con 1.32 mm.

Tabla 2. Análisis de varianza de diámetro de brotes.

Fuentes de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrado	Cuadrados medios	F Calculada	F de tabla	
					0.05	0.01
Repetición	2	0.09	0.04	0.15	3.18	5.06
Variedad de plátano	2	14.76	7.38	25.00**	3.18	5.06
Hormonas: (ANA) y (BAP).	8	5.92	0.74	2.51*	2.13	2.88
Variedad de plátano x Hormonas: (ANA) y (BAP).	16	5.12	0.32	1.08ns	1.85	2.39
Error	52	15.35	0.30			
Total	80					
Promedio	1.74					
C.V. %	31.25					

Diámetro de brotes.

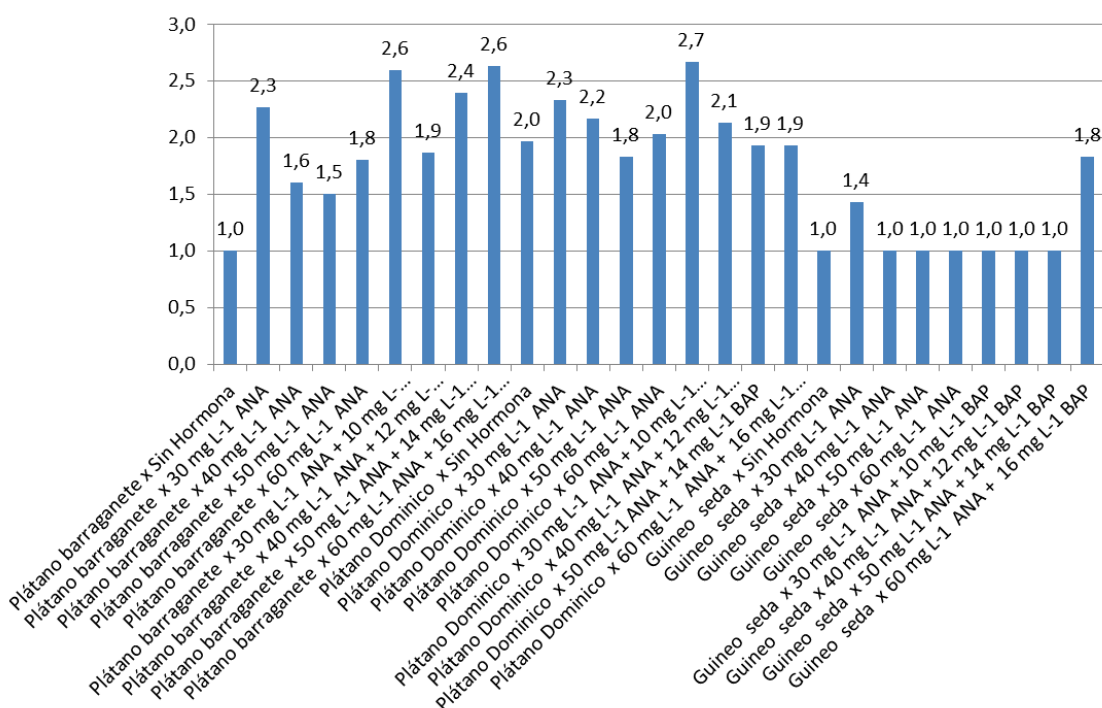


Figura 2. Presenta los valores promedios de diámetro de brotes donde se puede observar que el mayor diámetro se presentó en los tratamientos 6 (Plátano barraganete x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP), 9 (Plátano barraganete x 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP) y 15 (Plátano Dominico x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP) con 2.6, 2.6 y 2.7 cada uno en su orden respectivamente.

Número de brotes por cepa

La Tabla 3, presenta el análisis de varianza de la variable brotes por cepa, aquí se puede ver que el Factor A o Variedades de Plátano presenta diferencias estadísticas altamente significativas, el Factor B Hormonas: Ácido Naftilacético (ANA) y Benzilanino (BAP), presenta diferencias

estadísticas significativas, las otras fuentes de variación no presentan diferencia estadística alguna. El Coeficiente de variación es 32.57 % y el promedio general 1.64 brotes por cepa.

Los valores promedios y la prueba de Tukey efectuada, aquí se puede ver que el Factor A o Variedades de Plátano presenta tres rango de significación estadística, el mayor corresponde al plátano dominico con 1.91 brotes y el rango más bajo corresponde al guineo de seda con 1.17 brotes. El Factor B Hormonas: Ácido Naftilacético (ANA) y Benzilanino (BAP), presenta tres rangos de significación estadística, el mayor corresponde a 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 2.08 brotes y el más bajo se presentó en Sin Hormona (testigo) con 1.20 brotes.

Tabla 3. Análisis de varianza de brotes por cepa.

Fuentes de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrado	Cuadrados medios	F Calculada	F de tabla	
					0.05	0.01
Repetición	2	0.03	0.02	0.06	3.18	5.06
Variedad de plátano	2	8.89	4.45	15.57**	3.18	5.06
Hormonas: (ANA) y (BAP).	8	6.40	0.80	2.80*	2.13	2.88
Variedad de plátano x Hormonas: (ANA) y (BAP).	16	3.73	0.23	0.82ns	1.85	2.39
Error	52	14.85	0.29			
Total	80					
Promedio	1.64					
C.V. %	32.57					

Número de brotes por cepa

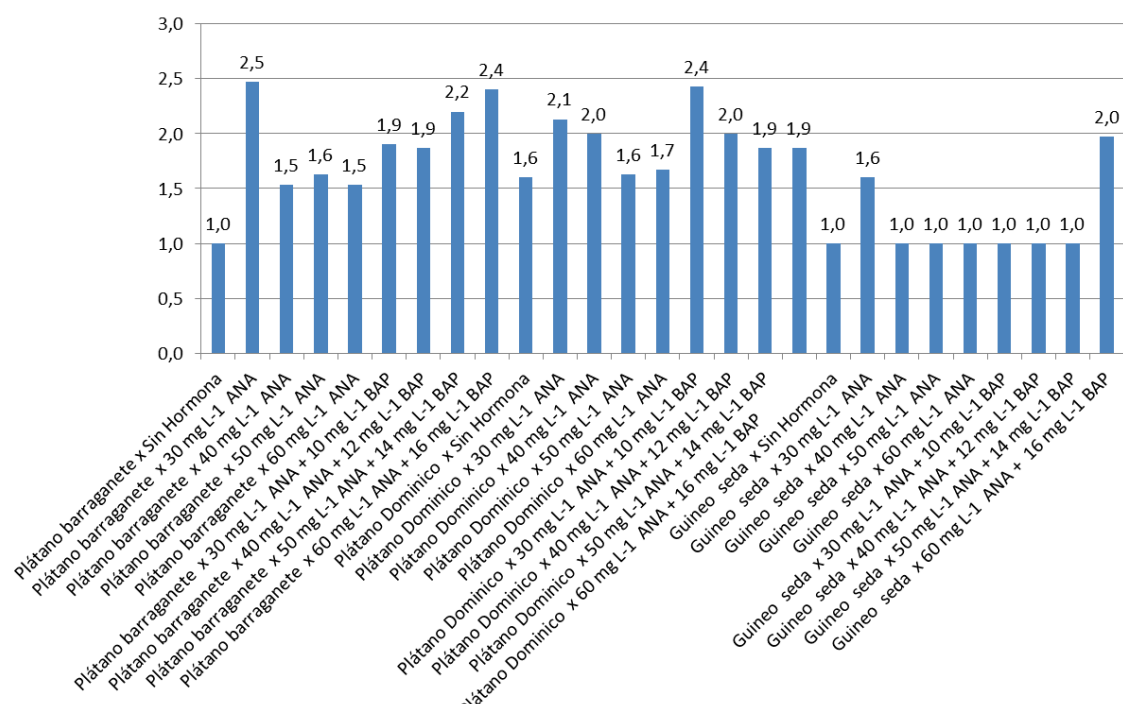


Figura 3. Presenta los valores promedios de número de brotes por cepa, aquí se puede ver que los valores más altos se presentan en los tratamientos 2 (Plátano barraganete x 30 mg L-1 ANA), 9 (Plátano barraganete x 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP) y 15 (Plátano Dominicico x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP) con 2.5, 2.4 y 2.4 brotes cada uno respectivamente.

Número de raíces por cepa

La Tabla 4, presenta el análisis de varianza de raíces por cepa, aquí se puede observar que el Factor A Variedad de plátano y el Factor B Hormonas: Ácido Naftilacético (ANA) y Benzilanino (BAP), presentan diferencias estadísticas altamente significativas, las otras fuentes de variación no presentan diferencia estadística alguna. El Coeficiente de variación es 36.42 % y el Promedio General 3.20 raíces por cepa.

Los valores promedios y la prueba de Tukey efectuada, aquí se puede ver que el Factor A Variedad de plátano presenta tres rangos de significación estadística, el mayor corresponde a plátano dominico con 3.74 raíces por cepa y el rango más bajo corresponde a guineo de seda con 2.16 raíces por cepa. El Factor B presenta tres rangos de significación estadística el mayor corresponde a 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 4.50 raíces por cepa y el más bajo se presentó en Sin Hormona (testigo) con 2.19 raíces por cepa.

Tabla 4. Análisis de varianza de raíces por cepa.

Fuentes de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrado	Cuadrados medios	F Calculada	F de tabla	
					0.05	0.01
Repetición	2	0.992	0.496	0.366	3.18	5.06
Variedad de plátano	2	43.890	21.945	16.20**	3.18	5.06
Hormonas: (ANA) y (BAP).	8	33.349	4.169	3.08**	2.13	2.88
Variedad de plátano x Hormonas: (ANA) y (BAP).	16	31.484	1.968	1.45ns	1.85	2.39
Error	52	70.455	1.355			
Total	80					
Promedio	3.20					
C.V. %	36.42					

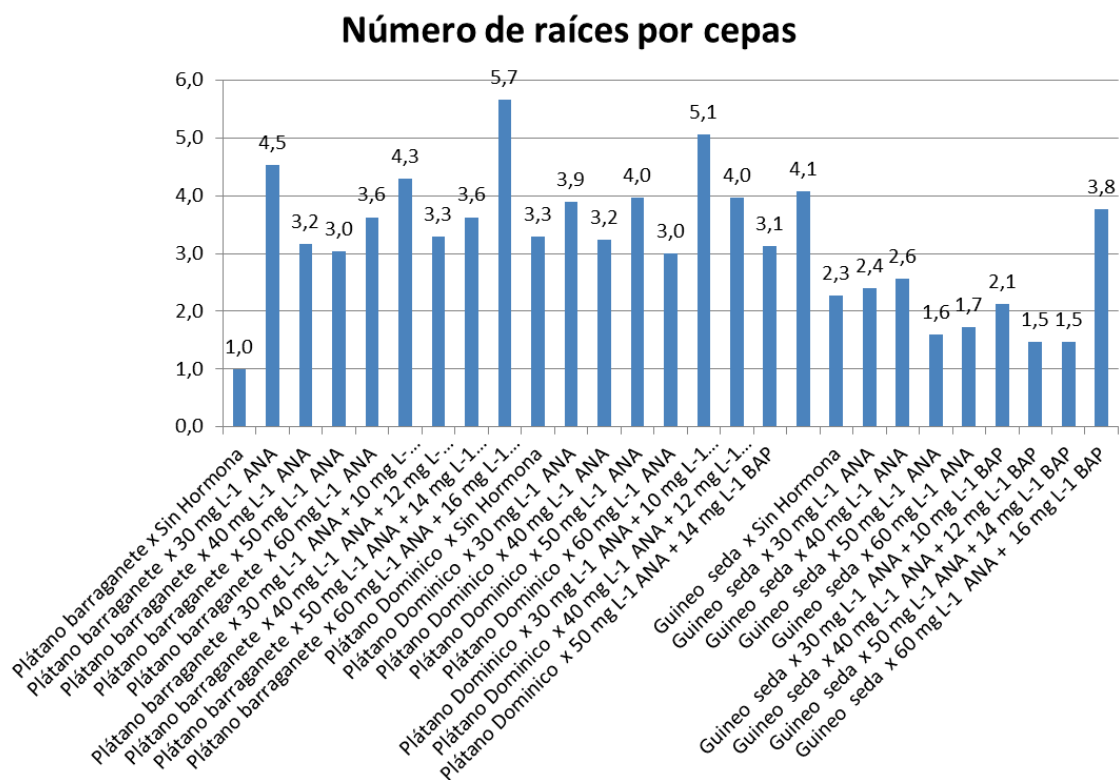


Figura 4. Presenta los valores promedios obtenidos de número de raíces por cepas, aquí se puede observar que los mayores promedios se presentaron en los tratamientos 9 (Plátano barraganete x 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP) y 15 (Plátano Dominico x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP) con 5,7 y 5,1 raíces en su orden cada uno respectivamente

Longitud de raíces

La Tabla 5, presenta el análisis de varianza para longitud de raíces, aquí se puede observar que el Factor A o variedades de plátano presenta diferencias estadísticas altamente significativas, el factor B Hormonas: Ácido Naftilacético (ANA) y Benzilanino (BAP), y la interacción Variedad de plátano x Hormonas: Ácido Naftilacético (ANA) y Benzilanino (BAP), presentan diferencias estadísticas significativas. El Coeficiente de variación es 38.57 % y el promedio general 4.73 cm.

Los valores promedios y la prueba de Tukey efectuada, aquí se puede ver que el factor A o variedades de plátano presentan tres rangos de significación estadística el mayor corresponde a plátano dominico con 5.83 cm y el rango más bajo corresponde a guineo de seda con 2.94 cm.

El Factor B Hormonas, presenta tres rangos de significación estadística, el mayor corresponde a 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 6.69 cm y el más bajo se presentó en Sin Hormona (testigo) con 3.49 cm.

La interacción Variedad de plátano x Hormonas, presenta cuatro rangos de significación estadística, el mayor corresponde a 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 7.77 cm y el rango más bajo corresponde a los tratamientos Sin Hormona, 50 mg L-1 ANA, 40 mg L-1 ANA + 12 mg L-1 BAP y 50 mg L-1 ANA + 14 mg L-1 BAP con 1.00, 1.73, 1.57 y 2.03 cm cada uno respectivamente.

Tabla 5. Análisis de varianza de longitud de raíces

Fuentes de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrado	Cuadrados medios	F Calculada	F de tabla	
					0.05	0.01
Repetición	2	1.72	0.86	0.26	3.18	5.06
Variedad de plátano	2	132.08	66.04	19.82**	3.18	5.06
Hormonas: (ANA) y (BAP).	8	63.27	7.91	2.37*	2.13	2.88
Variedad de plátano x Hormonas: (ANA) y (BAP).	16	103.40	6.46	1.94ns	1.85	2.39
Error	52	173.22	3.33			
Total	80					
Promedio	4.73					
C.V. %	38.57					

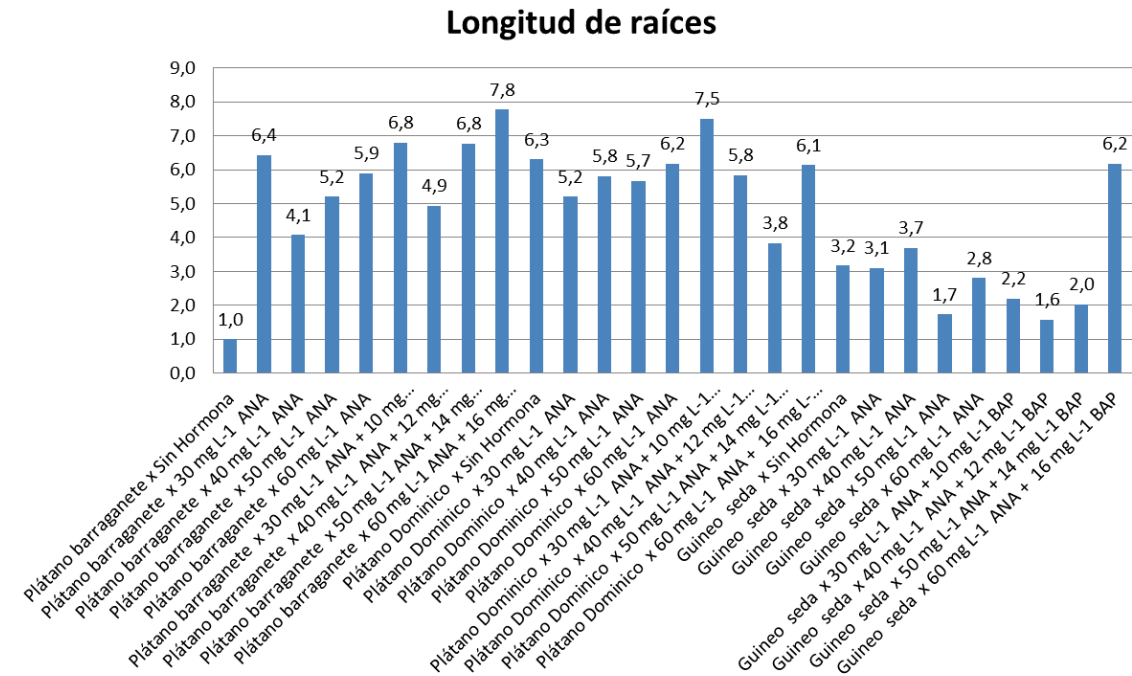


Figura 5. Presenta los valores promedios de longitud de raíces, aquí se puede ver que los tratamientos que presentan la mayor longitud son el 9 (Plátano barraganete x 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP) y el 15 (Plátano Dominico x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP) con 7.8 y 7.5 cada uno en su orden respectivamente.

Vigor

La Tabla 6, presenta el análisis de varianza para vigor de planta, aquí se puede ver que el factor A o Variedad de plátano presenta diferencias estadísticas altamente significativas, la interacción Variedad de plátano x Hormonas: Ácido Naftilacético (ANA) y Benzilanino (BAP), presenta diferencias estadísticas significativas, las otras fuentes de variación no presentan diferencia estadística alguna. El Coeficiente de variación es 10.18 % y el promedio general 1.59 de vigor según la tabla establecida para el efecto.

Los valores promedios y la prueba de Tukey efectuada, en este se puede observar que el Factor A o Variedad de plátano presenta tres rangos de significación estadística, el rango más elevado corresponde a Guineo seda con 1.77 de vigor y el rango más bajo se presentó en Plátano Dominicano con 1.47 de vigor.

La interacción Variedad de plátano x Hormonas: presentan tres rangos de significación estadística, el mayor corresponde a Sin Hormona con 2.00 de vigor y el rango más bajo se dio en los tratamientos 30 mg L⁻¹ ANA, 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP, 50 mg L⁻¹ ANA + 14 mg L⁻¹ BAP, 60 mg L⁻¹ ANA + 16 mg L⁻¹ BAP, Sin Hormona, 40 mg L⁻¹ ANA, 60 mg L⁻¹ ANA y 30 mg L⁻¹ ANA + 10 mg L⁻¹ BAP con 1.40 de vigor cada uno respectivamente.

Tabla 6. Análisis de varianza de Vigor.

Fuentes de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrado	Cuadrados medios	F Calculada	F de tabla	
					0.05	0.01
Repetición	2	0.02	0.010	0.38	3.18	5.06
Variedad de plátano	2	1.34	0.67	25.62**	3.18	5.06
Hormonas: (ANA) y (BAP).	8	0.32	0.04	1.52ns	2.13	2.88
Variedad de plátano x Hormonas: (ANA) y (BAP).	16	1.18	0.07	2.82**	1.85	2.39
Error	52	1.36	0.03			
Total	80					
Promedio	1.59					
C.V. %	10.18					

Vigor de planta

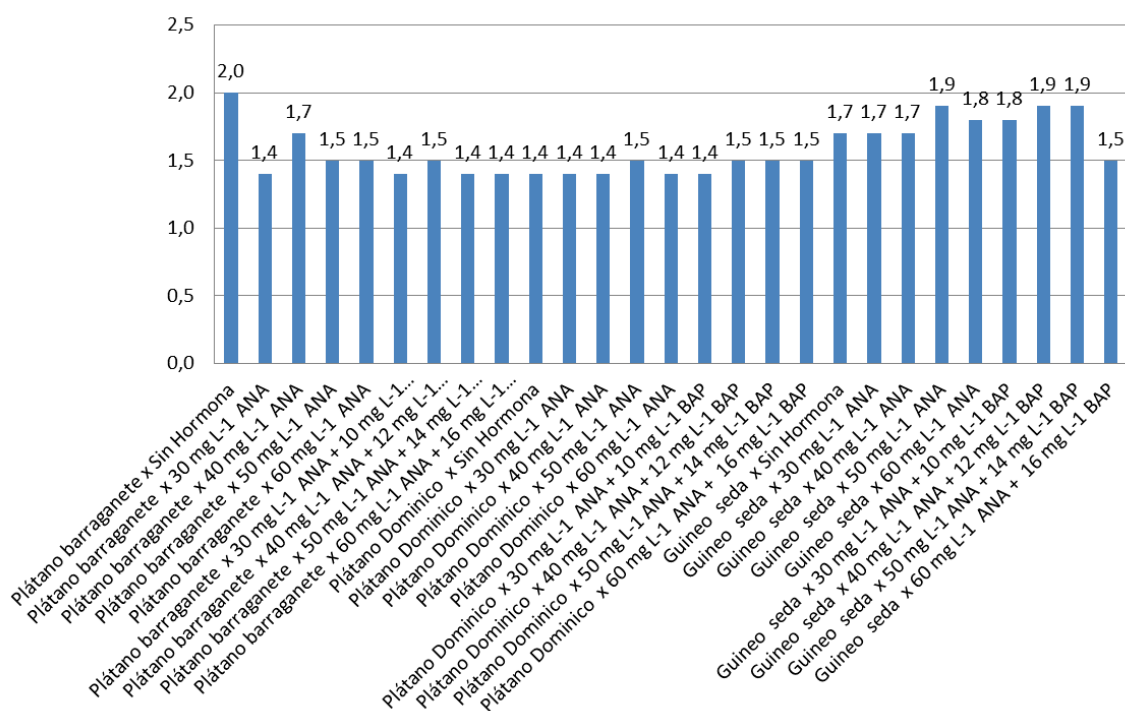


Figura 6. Presenta los valores promedios de Vigor de Planta, aquí se puede ver que el mejor vigor se presentó en los tratamientos 1 (Plátano barraganete x Sin Hormona), 22 (Guineo seda x 50 mg L-1 ANA), 25 (Guineo seda x 40 mg L-1 ANA + 12 mg L-1 BAP) y 26 (Guineo seda x 50 mg L-1 ANA + 14 mg L-1 BAP) con 2.0, 1.9, 1.9 y 1.9 cada uno en su orden respectivamente.

Discusión

En la determinación del comportamiento agronómico en la multiplicación vegetativa de plátano y banano con la aplicación de ácido α -naftalen acético (ANA) y Benzilanino (BAP). se indica que la mayor longitud de brotes se presentó en variedades de plátano con Dominico con 6.32 cm, en cuanto a hormonas la mejor dosis fue 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 6.71 cm y para la interacción variedades de plátano x hormonas el mejor tratamiento fue Plátano Dominico x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP con 8.73 cm en promedio y el mayor diámetro de brotes se dio para variedades de plátano con Dominico con 2.11 mm y en cuanto a las hormonas 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 2.13 mm y en la interacción de variedades de plátano x hormonas se presentó en el tratamiento Plátano Dominico x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP con 2.67 mm en promedio. Esto es corroborado por Albany *et al.* (2004), quienes indican que evaluando el acodo aéreo como técnica de propagación vegetativa del guayabo; en un primer ensayo se estudió la aplicación de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) a 5.000 mg kg-1 cada uno y una combinación de ambos (2.000 y 1.000 mg kg-1, respectivamente). En un segundo experimento, se aplicó 5.000 mg kg-1 de ANA y se evaluaron dos sustratos: abono de río y la mezcla de abono de río+espuma fenólica (3:1 v/v). Entre los reguladores de crecimiento, 5.000 mg kg-1 de ANA indujo los mayores porcentajes de acodos aéreos enraizados (96.43%), número (7.89) y longitud (4.13) de raíces. La mezcla de abono de río+espuma fenólica favoreció el mayor porcentaje de acodos enraizados (92.07%). Basado en el porcentaje de acodos aéreos enraizados, número y longitud de raíces primarias; se concluye que el ANA a 5.000 mg kg-1 fue el mejor estimulante para la formación de raíces en acodos aéreos de guayabo usando la mezcla de sustratos.

En la evaluación de los porcentajes de sobrevivencia de los tratamientos de inducción de raíces del plátano y banano se tiene que el mayor número de brotes por cepa se presentó en variedad de plátano con Dominico con 1.91 brotes, en hormonas la mejor dosis fue 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 2.08 brotes y la interacción variedades de plátano x hormonas presenta como mejor alternativa a Plátano barraganete x 30 mg L-1 ANA con 2.47 brotes. El número de raíces por cepa presenta como mejor tratamiento a Plátano barraganete x 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 5.67 raíces por cepa. En la longitud de raíces se presenta como mejor tratamiento a Plátano barraganete x 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 7.77 cm. El Vigor presenta de acuerdo a la escala arbitraria realizada como mejor tratamientos a Plátano barraganete x 30 mg L-1 ANA; Plátano barraganete *Musa paradisiaca*, x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP; Plátano barraganete x 50 mg L-1 ANA + 14 mg L-1 BAP; Plátano Dominico x 40 mg L-1 ANA; Plátano Dominico x 60 mg L-1 ANA y Plátano Dominico x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP con 1.40 de vigor cada uno respectivamente. Esto es corroborado por Chicaiza Arreaga (2004), quien indica que en el ensayo realizado con el fin de obtener en la zona de Balzar un protocolo para la propagación vegetativa de Teca a través de estacas enraizadas, usando hormonas de enraizamiento (ácido naftalenacético ANA y ácido indolbutírico AIB), a partir de la

cuarta semana se evaluó el porcentaje de enraizamiento, número de raíces, longitud de raíz mayor, número de brotes y sobrevivencia. El mejor tratamiento fue 1500 mg/Kg ANA + 1500 mg/Kg AIB para las variables enraizamiento con 91.66%, número de raíces con 6.42, longitud de raíz mayor con 11.11 cm y sobrevivencia con 85.42%.

Conclusiones

En la determinación del comportamiento agronómico en la multiplicación vegetativa de plátano y banano con la aplicación de ácido α -naftalen acético (ANA) y Benzilanino (BAP), se indica que la mayor longitud de brotes se presentó en Plátano Dominicó *Musa sapientum* x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP con 8.73 cm en promedio y el mayor diámetro de brotes se dio Plátano Dominicó *Musa sapientum* x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP con 2.67 mm en promedio.

En la evaluación de los porcentajes de sobrevivencia de los tratamientos de inducción de raíces del plátano y banano se tiene que el mayor número de brotes por cepa se presentó en Plátano barraganete *Musa cavendish* x 30 mg L-1 ANA con 2.47 brotes. El número de raíces por cepa presenta como mejor tratamiento a Plátano barraganete *Musa cavendish* x 60 mg L-1 ANA + 16 mg L-1 BAP con 7.77 cm. El Vigor presenta de acuerdo a la escala arbitraria realizada como mejor tratamientos a Plátano barraganete *Musa cavendish* x 30 mg L-1 ANA; Plátano barraganete *Musa cavendish* x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP; Plátano barraganete x 50 mg L-1 ANA + 14 mg L-1 BAP; Plátano Dominicó x 40 mg L-1 ANA; Plátano Dominicó *Musa sapientum* x 60 mg L-1 ANA y Plátano Dominicó *Musa sapientum* x 30 mg L-1 ANA + 10 mg L-1 BAP con 1.40 de vigor cada uno respectivamente.

Referencias

Arismendi J (2002) Multiplicación asexual, injertos-acodos. Cali Colombia 79p.

Albany. N., Vilchez. J.; Viloría. Z.; Castro. C. y Gadea. J. 2004. Propagación asexual del guayabo mediante la técnica de acodo aéreo. La Universidad del Zulia (LUZ). Facultad de Agronomía. Maracaibo-Venezuela. Agronomía Tropical. Versión impresa ISSN 0002-192X. Agronomía Trop. v.54 n.1 Maracay ene. 2004. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0002-192X2004000100005&script=sci_arttext

Castrillón J, Carvajal E, Ligarreto G, Magnitskiy S (2008) El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*) en diferentes sustratos. Propagación y cultivos de tejidos. Fecha de recepción: diciembre 13 de 2007. Aceptado para publicación: abril 9 de 2008. Agronomía Colombiana 26(1), 16-22, 2008. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v26n1/v26n1a03>

Carranza Patiño M, Cruz Ibarra O, Nieto Rodríguez E, Saucedo Aguiar S, Cevallos Falquez O, Escobar Troya A, Reyes Chancay X, Morante Carriel J (2012) Propagación de *Tabebuia Donnell-Smithii* Rose (Guayacán Blanco) utilizando hormonas de enraizamiento. Recibido: 28-Enero-2012. Recibido en forma corregida: 30-Agosto-2012. Aceptado: 27-Noviembre-2012. Publicado como artículo científico en Ciencia y Tecnología 5(2): 17-26. 2012. Disponible en: http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_3Propagaci%C3%B3n%20guayacan%20blanco.pdf

Contreras JJ (2006) Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica. Disponible en: www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/.../CAPÍTULO%201.doc. Obtenido de Capitulo 1 doc- DS pace en ESPOL.

Chicaiza Arreaga D (2004) Propagación vegetativa de *Tectona grandis* L. (Teca) a través de estacas enraizadas. Tropibosques S.A. Balzar, Guayas, Ecuador. Diciembre de 2004. UTEG. Guayaquil- Ecuador.

Delvin R (1980) Fisiología Vegetal. Barcelona, España. 517 p.: Tercera Edición. Traducido por X. Llimosa Ediciones Omega, S. A.

Exkart RK (2009) Análisis de mercado buenos augurios exportables, Cifras estadísticas Manifiestos y Sopisco News. Bananaexport. Obtenido de (Editorial informativa disponible en: <http://bananaexport.com/analisis/index.htm>).

Hartmann H y Kester D (1983) Propagación de plantas, principios y prácticas.

Hartmann H y Kester D (1988) Propagación de plantas: principios y prácticas. Editorial continental S.A. México. 814 p.

Hartmann H (1990.) Plant Propagation-Principles and Practices, 5th edn. Prentice-Hall, EnglewoodCliffs, NJ, 647 pp.

Hartmann H y Kester D (2001) Propagación de Plantas. Principios y Prácticas. 8ª Reimpresión. Editorial Continental. México. 760 p.

INIBAP (1998) Networking Banana and Plantain. Obtenido de INIBAP Annual Report 1997. International network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France.

López L (1989) Desarrollo de la embriogénesis somática y su empleo en la transformación

Maluenda J y Reyes A (2003) AUXINAS: química, biosíntesis de la auxina, fitohormonas, transporte, catabolismo auxínico (en línea). Valparaíso. CL. Obtenido de Disponible en: <http://pdf.rincondelvago.com/auxinas.html>.

May G, Afza R, Mason H, Wiecko A, Novak F, y Arntzen C (1995) Propagación vegetal. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos21/propaveg/propaveg.html>. Obtenido de Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via Agrobacterium-mediated transformation. Bio Technol. 13, 486-490.

Núñez R (1989) El Cultivo del Banano Ministerio de Agricultura y Ganadería. Obtenido de (Publicación disponible en: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/.../banano.pdf>).

Núñez R (1989) El Cultivo del Banano Ministerio de Agricultura y Ganadería. (Publicación disponible en: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/.../banano.pdf>).

PDL Jipijapa (2012) Plan de desarrollo estratégico Cantonal de Jipijapa.

Petryk EN (2009) La selección del Chef Plátano /Banana. Disponible en: <http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/Chef/banana.htm> 25,).

Quijada R (1980) Métodos de propagación vegetativa. En mejora genética de árboles forestales.fao.danina.Roma.341pg. Recuperado el febrero de 2013

Ramírez-Villalobos M, Urdaneta-Fernández A, Vargas-Simón G (2004) Tratamientos con ácido indolbutírico y lesionado sobre el enraizamiento de estacas de Icaco (*Chrysobalanus icaco L.*). *Agronomía Tropical*. Versión impresa ISSN 0002-192X. *Agronomía Trop.* v.54 n.2 Maracay abr. 2004. Universidad del Zulia (LUZ). Maracaibo-Venezuela. Pdf. p. 1. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0002-192X2004000200005&script=sci_arttext

Rodríguez C, Nomberto C. Murga S, Ilich S (2012) Efecto del ácido naftalenacético y 6 bencilaminopurina en la germinación y crecimiento de *Lepidium peruvianum* Chacón “maca” in vitro. Vol. 8. Número 22. 2012. *Revista Ciencia y Tecnología*. Universidad Nacional de Trujillo. Escuela de Posgrado. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/188>

UNIDAD 2



Aplicaciones de la micropropagación y los efectos hormonales en especies forestales

Tema 6

Micropropagación de árboles superiores de *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav) Oken, en la microrregión sur de Manabí

Blanca Indacochea G, Maurilio Garcia L, Rogelio Sotolongo S

Nuestro arte de observar se compone, en general, de tres procedimientos diferentes: primero, observación propiamente dicha, o sea, examen directo del fenómeno tal como se presenta naturalmente; segundo, experimentación, o sea, contemplación del fenómeno más o menos modificado por circunstancias artificiales que intercalamos expresamente buscando una exploración más perfecta, y tercero, comparación, o sea, la consideración gradual de una serie de casos análogos en que el fenómeno se vaya simplificando cada vez más”

— Auguste Comte

Resumen

La especie *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (laurel), es un árbol maderable de la familia Boraginaceae, que ha sido sobreexplotada por el valor comercial de la madera y por actividades de conversión del uso de la tierra para el desarrollo de sistemas agroforestales, pero además ha sido evaluada e identificada como especie clave para la restauración de estos bosques. Con el fin de establecer un programa de mejora forestal de *Cordia alliodora* se desarrollaron protocolos para la propagación vegetativa *in vitro*, a partir de material vegetal proveniente de la selección de fenotipos superiores de la especie. Para ello se estableció una metodología de micropropagación a partir de segmentos nodales, tomados de brotes epicórmicos y de plantas de dos meses de vivero que se desinfectaron con NaClO 2,5%, 2 min. + alcohol 75%, 1 min. + Gentamicina 80 mg/L, 1 min. + Povidyn 2,5%, 5 min. + Ácido ascórbico 150 mg/L, en un medio MS con un balance hormonal: KIN 2,5 mg/L + AIB 0,8 mg/L, donde se mantuvieron 28 días para inducir la multiplicación y se subcultivaron 3 veces. En esta etapa, se evaluó a las tres semanas el número de brotes por explantes y para el enraizamiento en un medio de cultivo MS, suplementado con sacarosa 15 g/L + carbón activado 1,0 g/L + AIB 1,0 mg/L, durante 30 días. En este documento, se propone una metodología para la propagación *in vitro* de *Cordia alliodora*.

Palabras clave: Protocolos, vivero, brotes, hormona, especie.

Summary

Micropropagation of superior trees of *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken, in the southern micro-region of Manabí

The species *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (laurel) is a timber tree of the Boraginaceae family, that has been overexploited by the commercial value of wood and land use conversion activities for the development of agroforestry systems, but also it has been evaluated and identified as a key species for the restoration of these forests. With the aim of establishing a forest improvement program of *Cordia alliodora*, protocols for *in vitro* vegetative propagation were developed, as from plant material from the selection of higher phenotypes of the species. For this purpose, a micropropagation methodology was established from nodal segments, taken from epicormic sprouts and from two months nursery plants, which were disinfected with NaClO 2.5%, 2 min. + 75% alcohol, 1 min. + Gentamicin 80 mg / L, 1 min. + Povidyn 2.5%, 5 min. + Ascorbic acid 150 mg / L, in a MS medium with a hormonal balance: KIN 2.5 mg / L + AIB 0.8 mg / L, where 28 days were maintained to induce multiplication and were subcultivated 3 times. At this stage, the number of sprouts per explants and for rooting in an MS medium was evaluated after three weeks, supplemented with sucrose 15 g / L + activated charcoal 1.0 g / L + IAB 1.0 mg / L, for 30 days. In this document, a methodology for the *in vitro* propagation of *Cordia alliodora* is proposed.

Key words: Protocols, nursery, sprouts, hormone, species.

Introducción

La *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken o laurel, es un árbol maderable de la familia Boraginaceae, que ha sido sobreexplotada por el valor comercial de la madera y por actividades de conversión del uso de la tierra y transformación del paisaje para el desarrollo de sistemas agroforestales; al mismo tiempo esta especie ha sido evaluada e identificada como especie clave para el mantenimiento de la integralidad ecológica. En la actualidad la especie está reconocida entre las 10 especies prioritarias para la reforestación, protección, conservación y creación de plantaciones comerciales (Grijalva *et al.* 2012).

La especie se reproduce naturalmente vía semilla con tasas de germinación regularmente bajas, menores del 30% Hartmann y Kester (1996). Fundamentalmente por la pérdida de su viabilidad entre los 2 a 3 meses, y con mucha irregularidad de las producciones de semilla. Por estas razones no se cuenta con un origen de material estable y en cierta medida superior, ya sea por el escaso desarrollo de fuentes de semillas así como por la inexistencia de metodologías para la micropropagación y/o macro propagación que impulsen la conservación de la especie.

Considerando que el sistema agroforestal cafetalero de Jipijapa, ha sido pobremente descrito en su diversidad y en su estructura, es preciso conocer este tipo de bosque para contribuir a la información acerca de la riqueza de especies en estos tipos de vegetación, para una mejor toma de decisiones en la realización de actividades de manejo y conservación, así como la identificación de especies claves que permitan el desarrollo de los sistemas y faciliten la reconversión al bosque original.

Por ello se realizó un estudio ecológico en siete localidades del cantón Jipijapa, Provincia de Manabí, República del Ecuador, con la finalidad de determinar la estructura horizontal y vertical de los bosques secundarios; así, como diversidad alfa, beta y estructura por clases diamétricas de las especies forestales.

Se seleccionó la especie *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav) Oken, presente en todas las localidades, por su valor biológico y económico, pero que como se ha venido diciendo es considerada como especie clave para la restauración de estos bosques, con el fin de establecer un programa de mejora forestal de *Cordia alliodora*, vegetal proveniente de la selección de fenotipos superiores de la especie. Se desarrolló un protocolo y se estableció una metodología de micropropagación, a partir de yemas apicales de plantas de dos años de edad (vivero) y brotes epicórmicos inducidos de los árboles seleccionados. Los mejores resultados se obtuvieron con explantes de plantas juveniles provenientes del vivero y cultivados en el medio de cultivo MS suplementado con KIN 2,5 mg/L y AIB 0,80 mg/L. En la fase de aclimatización, se logró un 89% de supervivencia.

Materiales y métodos

Para el desarrollo de la investigación se planteó el siguiente problema: ¿Cómo cambia la estructura del bosque en los sistemas agroforestales del cantón Jipijapa a consecuencia de la de los hábitats, de la deforestación, de la baja tasa de germinación y de la pérdida de viabilidad de sus semillas? Es una pregunta que se relaciona también con el valor paisajístico de los bosques.

Los métodos utilizados hasta el momento para la reproducción no han podido dar respuesta a las necesidades de plantas para llevar a cabo la recuperación de *Cordia Alliodora*, por lo que es de esperar que la inducción de brotes de yemas apicales y brotes epicórmicos *in vitro*, a partir de segmentos nodales tomados de plantas de dos meses de edad, provenientes de vivero y de brotes epicórmicos tomados de árboles plus seleccionados del campo, permitirá la regeneración de plantas completas, nueva vía para la reproducción de la especie, proporcionando plantas para la reconversión al bosque original y el establecimiento de plantaciones comerciales.

En consecuencia el objetivo general de la investigación ha sido el de establecer una metodología para la propagación vegetativa de la especie, a través de la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro*. Con ello se ha pretendido:

- Caracterizar la composición y estructura de las formaciones de la especie de *Cordia alliodora*.
- Establecer una metodología para la multiplicación *in vitro*, partiendo de árboles plus seleccionados en el campo.
- Evaluar los parámetros morfológicos de la plantación de mejora, a partir de material vegetal propagado vegetativamente de la especie *Cordia alliodora*.

La importancia de este resultado radica en que permitirá la reproducción de *Cordia alliodora*, por tanto, su protección y recuperación; además, crea las bases para la preservación de programas de mejora forestal y plantaciones comerciales de alta calidad de la especie. Así mismo, permitirá contar con un número suficiente de plantas, con la finalidad de producir madera para las industrias de muebles y para la construcción.

La novedad científica de este trabajo radica en el estudio detallado de la estructura de las áreas donde se distribuye *Cordia alliodora*, la evaluación de la estructura de las poblaciones de la especie, así como en la propuesta de una metodología para la micropropagación, a partir de yemas apicales y brotes epicórmicos de árboles plus superiores directamente de campo.

Pero también en la creación de una población de mejora de la especie que contribuiría a la implementación del método de conservación *quasi in situ* de *Cordia alliodora*, en el cantón Jipijapa para un programa de mejora forestal.

Se considera que el aporte teórico estriba en la caracterización de las áreas donde se desarrolla la especie *Cordia alliodora* sobre la base de elementos de la estructura del bosque y poblacional.

Como aporte práctico se estima el hecho de que se establece una población de mejora, a partir de la propagación vegetativa, *in vitro* para que sirva de fuente de material selecto y viable para la conservación y el fomento de la especie *Cordia alliodora*. El área de estudio está comprendida en la Unión, Pedro Pablo Gómez, Membrillal, Julcuy, Puerto Cayo, América y Anegado, al Oeste de Ecuador (Figura 1)



Figura 1. Mapa de la División Política del Cantón Jipijapa- Manabí- Ecuador. Plan de Desarrollo Local del Jipijapa.

Para el tamaño de la muestra se empleó la metodología de inventario rápido (Gentry 1985, 1988, Keels *et al.* 2004). En el estudio se plantea el tipo de bosque, el décimo de hectárea (0.1 ha), así como tamaño de parcela transitoria para muestrear, desde el punto de vista florístico. Los criterios por muestreo se han basado en Duivenvoorden (1994), Cuevas *et al.* (2002), Galindo *et al.* (2003), Sánchez y López (2003), Matos (2006), Mosquera *et al.* (2007)

La variable independiente considerada ha sido la correspondientes a las localidades, mientras las variables dependientes han sido: Diversidad, riqueza de especies, abundancia, dominancia,

dasometrías, diámetro a 1,30 m ($D_{1,30}$) de *Cordia alliodora*, así como la altura, por último también la distribución por clases diamétricas de *Cordia alliodora*.

A continuación se expone la muestra de la marcha analítica propuesta para la propagación vegetativa de *Cordia alliodora*, cultivo in vitro (Micropropagación).

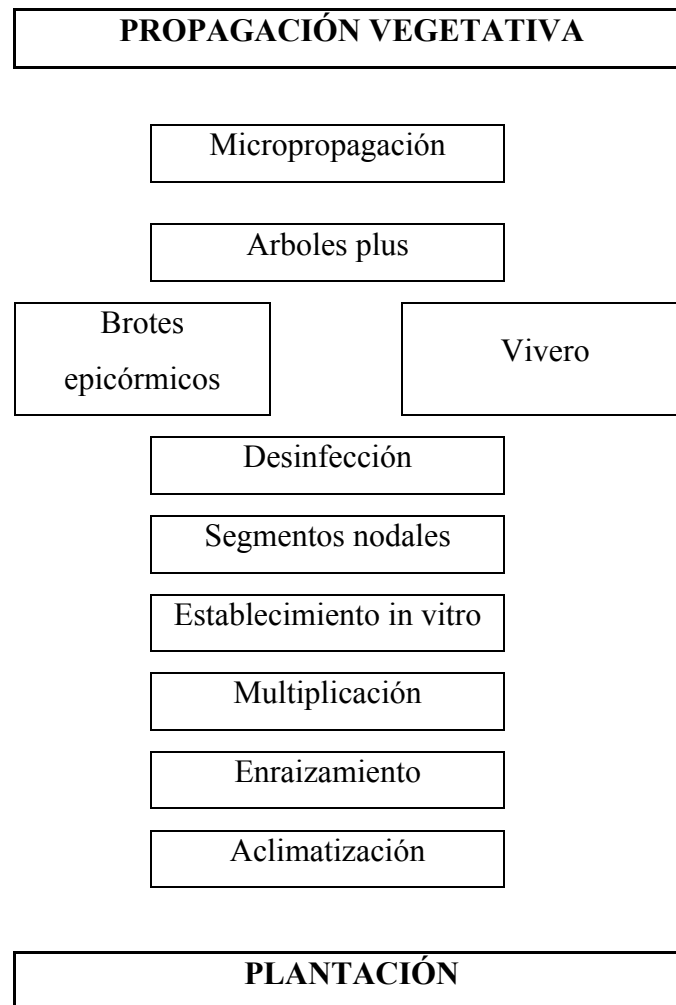


Figura 2. Muestra de la marcha analítica propuesta para la propagación vegetativa de *C. alliodora*

Establecimiento del cultivo aséptico

En esta fase se procedió según los cinco tratamientos (Tabla 1), en los que se condensan los procesos con las respectivas sustancias químicas utilizadas en la desinfección del material vegetal de *Cordia alliodora*.

Tabla 1. Variantes de desinfección de los explantes empleados.

Variante	Ca(CLO) ₂ g/L	NaCLO %	T Min	EtOH %	T min	Gentamicin a mg/L	Povidyn %	T min	Ácido ascórbico mg/L
T1	2,5	75	2	75	1				150
T2	2,5	50	1	75	½				150
T3		40	2	70	1	80	1	5	150
T4		2,5	3	75	1		5	5	150
T5		2,5	2	75	1	80	2.5	5	150

- Alcohol Marca: Weir, Grado: 97% Laboratorio Farmacéutico Weir (Ecuador)
- Povidyn Jabón Líquido, Antiséptico, Bactericida, Fungicida, Esporicida, Viricida. Contiene: Yodopovina 7.5% U.S.P (O.75% Yodo Disponible) Lab. Dr. A. Bjarner C.A (Ecuador)

Multiplicación

M1: Kinetina (KIN) 0,25 mg/L + AIB 0,40 mg/L, **M2:** Kinetina (KIN) 0,50 mg/L + AIB 0,50 mg/L, **M3:** Kinetina (KIN) 1mg/L + AIB 0,60 mg/L, **M4:** Kinetina (KIN) 1,5 mg/L + AIB 0,70 mg/L, **M5:** Kinetina (KIN) 2,5 mg/L + AIB 0,80 mg/L y un testigo sin hormonas, se mantuvieron por 28 días y se subcultivaron tres veces.

Enraizamiento

Sacarosa 15 g/L, carbón activado 1,0 g/L y para la inducción del enraizamiento se emplearon las auxinas **E1:** ANA 1,0 mg/L, **E2:** AIB 1,0 mg/L, **E3:** AIA1, 0 mg/L junto al testigo.

Adaptación y endurecimiento

De 3 a 6 cm. de longitud promedio tres raíces y que la raíz mayor mida entre 3 y 5 cm, tierra de cafetal 50% + 50% aserrín.

Establecimiento de la plantación

Se refiere al diseño de bloque completamente al azar con 5 parcelas; 4 parcelas de 40 plantas cada una procedentes de miniestacas y 1 parcela de 56 vitroplantas con un total de 216 plántulas a un espaciamiento de 4 x 3 m.

Resultados y discusión

Con respecto a la estructura de las poblaciones de *Cordia alliodora* por localidad se obtuvieron los siguientes resultados:

1. Puerto Cayo presenta los valores más bajos de ambas variables dasométricas, resultado esperado de acuerdo a las condiciones ambientales de esta localidad.
2. Las mejores poblaciones desde el punto de vista dasométrico son: El Anegado y Membrillal, este último favorecido por ser un bosque de transición seco – húmedo (Tabla 2).

Tabla 2. Promedios de diámetro y altura de la estructura de las poblaciones de *C. alliodora* por localidad.

Localidad	Número de individuos	Diámetro (cm)	Altura (m)
La Unión	294	21,72 ± 21,2 b	8,48 ± 6,7 d
Pedro Pablo Gómez	128	25,87 ± 16,4 b	10,68 ± 4,6 c
Membrillal	76	25,44 ± 10,1 b	16,17 ± 6,5 a
Julcuy	39	28,04 ± 16,9 b	10,85 ± 5,9 c
Puerto Cayo	70	7,55 ± 8,9 c	5,76 ± 6,3 e
América	170	22,36 ± 16,0 b	8,04 ± 4,6 d
Anegado	139	33,97 ± 19,3 a	14,17 ± 5,8 b

Distribución por clases diamétricas de *Cordia alliodora*

La Unión y El Anegado, que son las localidades con mayor abundancia de la especie y riqueza como medida de diversidad y, además, están bien estructuradas desde las clases inferiores a las superiores (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución por clases diamétricas de *Cordia alliodora*

Clases Diamétricas (cm)	Unión (Un)	Pedro Pablo Gómez (PPG)	Membrillal (Mem)	Julcuy (Jul)	Puerto Cayo (PC)	América (Am)	Anegado (An)
10	102	18	9	3	48	42	7
20	70	30	10	15	16	39	19
30	40	50	21	8	5	64	44
40	63	20	36	4	1	10	33
50	10	3		3		8	17
60	1			6			4
70	3	2				2	6
80	1	2				2	4
90	1						1
100		3				3	4
120	1						
140	1						
150	1						

Propagación *in vitro* de *Cordia alliodora*

Todas las variantes usadas resultaron efectivas para desinfectar más del 50% de los explantes iniciales. La variante de mejores resultados es el T5, porque mostró un porcentaje más alto de explantes útiles para la siguiente fase (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la desinfección en explantes de *C. alliodora*.

Variantes	Plantas de 2 meses (%)			Brotos epicórmicos (%)		
	C	F	E	C	F	E
T1	30	15	55	35	25	40
T2	20	12	68	25	30	45
T3	25	10	65	30	40	30
T4	35	5	60	40	25	35
T5	15	5	80	20	15	65

C - contaminados; *F* - fenolizados; *E* - establecidos

Inducción y multiplicación

De la fuente de explantes proveniente de plantas de dos meses se obtiene mejor establecimiento (Tabla 5), su comportamiento ante la inducción fue similar al de otra fuente donante, lo que hace que los brotes epicórmicos sean una fuente donante idónea para la propagación futura de árboles superiores en ensayos de mejoramiento genético en la especie (Wats,Berjak,Makhathini y Blakeway., 2003; Schuler *et al.*, 2005).

Hasta el momento, la micropropagación de *Cordia alliodora* se ha realizado sobre material tomado de semillas germinadas *in vitro* (Schuler *et al.*, 2005; Nuñez *et al.*, 2008), e inducción de callos embriogénicos en hojas de clones de *Cordia alliodora* o laurel, (Ortiz 2012), pero una metodología, a partir de material directo de campo o material juvenil no ha sido descrita (González *et al.* 2007). Por lo tanto, en la presente investigación, se realizó la micropropagación con plantas de dos meses de edad (vivero) y brotes epicórmicos de árbol plus seleccionados del campo (Figura 4).

Tabla 5. Resultados de la multiplicación *in vitro* de *C. alliodora* en los diferentes balances hormonales.

Variantes	Explantes brotados (%)		Promedio del número de brotes por explantes	
	Plantas de dos meses	Brotos epicórmicos	Plantas de dos meses	Brotos Epicórmicos
M1	31.2 c	29.9 c	1.62 ± 0.34	1.25 ± 2.22
M2	59.2 b	53.2 a	1.75 ± 1.31	1.12 ± 3.12
M3	46.3 b	50.3 b	1.87 ± 2.11	1.50 ± 1.45
M4	60.3 a	59.3 a	2.00 ± 3.10	1.62 ± 2.63
M5	63.8 a	61.4 a	2.62 ± 2.12	2.00 ± 3.43
Testigo	0	0	0	0



Figura 4. Brotes epicórmicos de árboles seleccionados y yemas apicales de plantas de dos meses de edad de *C. alliodora*, en la fase de multiplicación.

Autor. Blanca Indacochea Ganchozo

Enraizamiento

Para *Cordia alliodora* el mejor medio fue AIB 1,0 mg/L (81%), no sólo por el porcentaje de enraizamiento, sino también por la morfología de las raíces, lo cual coincide con Schuler *et al.* (2005), Núñez *et al.* (2008), Castro y Sánchez (2010), en los que sólo una auxina es usada para el enraizamiento y donde los porcentajes de éste oscilan entre 80-95%. Millán *et al.* (2011), demostraron en *Cedrela odorata L.*, *Cedro* al igual que en trabajos realizados en el CATIE (Leakey *et al.*, 1990; Mesén *et al.*, 1992 y 1996; Mesén, 1993; Mesén y Trejos, 1998; Núñez, 1997) con varias especies tales como: *Terminalia oblonga* (Ruiz & Pav.) (0,8% de AIB), *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav) (0,8% - 1,6% de AIB) y la especie *Hyeronimaalchorneoides* (1.6% de AIB); con la especie *C. iguaguana*, los mejores porcentajes de enraizamientos se obtuvieron cuando se utilizaron dosis al 0, 8% y 1,6% de AIB.

Adaptación y endurecimiento de vitroplantas

Los valores obtenidos en la especie *Cordia alliodora* de 89% de sobrevivencia son similares a otras especies como *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla* con 75 y 85% de sobrevivencia Orellana (1998), *Psidium salutare*, 75% Sotolongo (2000) y *Eucalyptus globulus* 90%, Abdelnour y Muñoz (2011), pero muy superiores al comportamiento de especies recalcitrantes como *Swietenia macrophylla King* (caoba) con el 27% Azofeifa *et al.* (2009); *Cedrela odorata L.* (*Cedro*) Pérez *et al.* (2006); Salazar (2009), donde el porcentaje de plantas de *Agave cocui sp.* (*cocuy*) fue de 60%.

Establecimiento de la población de mejora

Los resultados que se obtuvieron para *Cordia alliodora*, tanto de las parcelas procedentes de miniestacas como las vitroplantas, tuvieron un buen comportamiento en altura, diámetro y vigor. Sin embargo se observó que en la parcela cuatro de la Unión se produjo un diámetro de 1.03 cm, en la parcela uno El Anegado de 44.84 cm de altura en miniestacas. Con respecto a la vigorosidad de las vitroplantas en cuanto a trasplante a campo se obtuvo un 89.35% (Tabla 6). Rodríguez *et*

al. (2003), en un trabajo realizado en planta medicinal *Artemisia absinthium L.*, informan que el trasplante al campo fue satisfactorio en un 95%, donde las plantas obtenidas por micropropagación alcanzaron superiores rendimientos al momento de la cosecha, tres meses antes que las obtenidas por el método tradicional de estacas.

Para mejorar el proceso de multiplicación de plantas de *Cordia alliodora* por medio de brotes epicórmicos y yemas apicales, el cual abre la posibilidad de establecer un protocolo eficiente de multiplicación masiva de los plus seleccionados para el Programa de Mejoramiento Forestal, se propone una Metodología para la propagación *in vitro* de *Cordia alliodora* (Figura 7).

Tabla 6. Resultado de las variables morfológicas en plantación de *C. alliodora*

Localidad	Altura (cm)	Diámetro (cm)	Vigor			(%)
			E	B	R	
1. El Anegado	44,84 ± 18,77	0,94 ± 0,41	18	21	0	97,50
2. El Anegado	34,52 ± 22,78	0,59 ± 0,36	23	13	0	90,00
3. La Unión	35,72 ± 18,22	0,91 ± 0,35	21	16	1	95,00
4. La Unión	37,65 ± 17,51	1,03 ± 0,61	28	6	1	87,50
5. Vitroplantas	40,78 ± 18,32	0,69 ± 0,28	36	7	2	80,35
Total	38,87 ± 19,37	0,82 ± 0,43	126	63	4	89,35

Leyenda:

E = Excelente: Abundante follaje (9 a más yemas)

B = Buena: Mediano follaje (6 - 8 yemas)

R= Regular: Poco follaje (1 - 5 yemas) Quevedo, (1993)

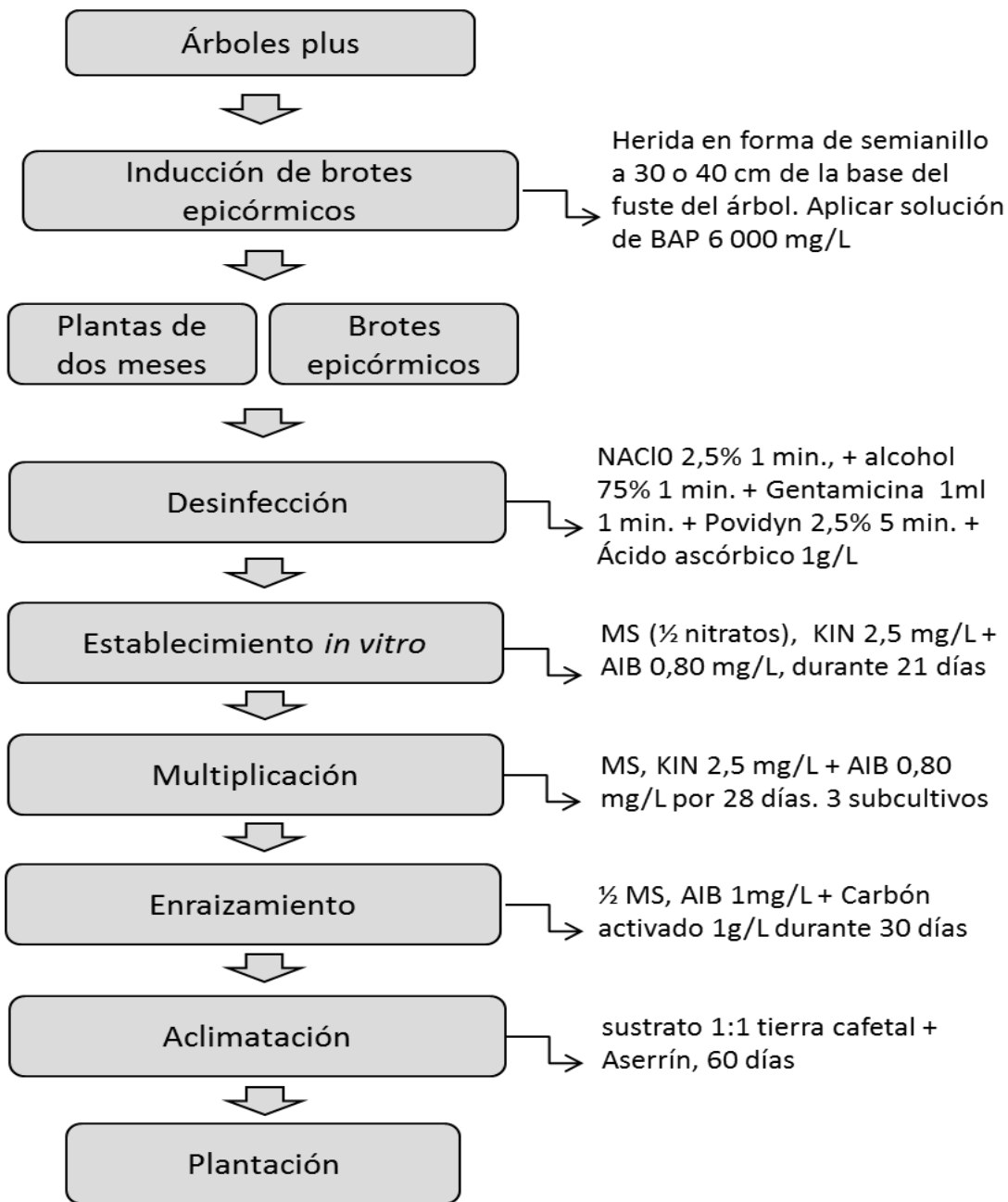


Figura 7. Metodología para la propagación *in vitro* de *Cordia alliodora*.

Conclusiones

La composición, la forma en las distribuciones diamétricas así como la regeneración natural, dominancia y valor comercial de la especie *Cordia alliodora*, constituyen los principales indicadores que validan los efectos de la fragmentación y conversión sobre la especie en Microrregión Sur de Manabí.

Se identifica a *Cordia alliodora* como especie clave para realizar acciones de rehabilitación y conservación de bosques y de la calidad de su paisaje, diferenciando dos agrupaciones básicas: una formada por los bosques húmedos y subhúmedos y la otra, por el bosque seco.

La propagación *in vitro* de árboles plus, se logra a partir de segmentos nodales de brotes epicórmicos y plantas de dos meses de edad, en vivero en un medio MS con un balance hormonal (KIN 2,5 mg/L + AIB 0,8 mg/L) para su multiplicación, y para el enraizamiento emplear un medio de cultivo MS, suplementado con AIB 1 mg/L + carbón activado 1 g/L durante 30 días.

Se establece una plantación de mejora donde las plantas micropropagadas presentaron una mayor vigorosidad, en comparación con las plantas macropropagadas.

Referencias

- Abdelnour A y Muñoz A (2011) Micropropagación de teca (*Tectonagrandis*L.f). *Revista Forestal* 2 (5): 1-11.
- Azofeifa J, Rojas A, Hine A (2009) Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatación de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden Meliaceae). *Tecnología en Marcha* 22 (3): 34-41.
- Castro RD, Sánchez R (2010) Propagación Clonal *in vitro* de *Eucalyptus pellita* F. Muell a partir de árboles plus. *Temas Agrarios* 15 (1): 34 – 43.
- Cuevas R, López L, García E (2002) Primer registro de *Desmopsis trunciflora* (Schlecht. y Cham.) G. E. Schatz (Annonaceae) para el occidente de México y análisis de su población en la sierra de Manantlán, Jalisco. *Acta Botánica Mexicana* 58: 7–18.
- Duivenvoorden F (1994). Vascular plant species counts in the rain Forest of the middle Caquetá area. Colombian Amazonia. *Biodiversity and Conservation* 3: 685–715.
- Galindo R, Betancur J, Cadena J (2003) Estructura y Composición Florística de Cuatro Bosques Andinos del Santuario de Flora y Fauna Guanentá - Alto Río Fonce, Cordillera Oriental Colombiana. Colombia. 30 p.
- Gentry H (1998) Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. *Anuary of Missouri Botanical Garden*. 75(1): 2-34.
- Gentry H (2008) Contrasting phytogeography patterns of upland and lowland Panamanian plants *in* Garibaldi. Efectos de la extracción y uso tradicional de la tierra sobre la estructura y dinámica de bosques fragmentados en la Península de Azuero, Panamá. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Forestales. Panamá: Universidad Hermanos Saíz Montes de Oca, Panamá. 110 p.
- González RJA y Peña Ramirez YJ (2007) Establishment of efficient protocols for massive propagation of tropical trees from Mesoamerica through somatic embryogenesis.
- Grijalva JX, Checa X, Ramos R, Barrera P, Limongi R (2012) Situación de los Recursos Genéticos Forestales – Informe País Ecuador. Preparado por el Programa Nacional de Forestería del INIAP con aval del INIAP/FAO/MAE/MAGAP/MMRREE. Documento sometido a la Comisión Forestal de la FAO – Roma, para la preparación del Primer Informe sobre el Estado de los Recursos Genéticos Forestales en el Mundo. 95 p.

- Hartmann H, Kester D (1996) Propagación de plantas. Principios y prácticas. 4ª ed. México: Continental. 760 p.
- Keels S, Gentry A, Spinzi L (2004) Using vegetation analysis to facilitate the selection of conservation sites in eastern Paraguay. *Biodiversity measuring and monitoring certification training 2*. Washington: SI/MAB.
- Leakey RRB, Mesén F, Tehoundjeu Z, Longman KA, Dick J, Newton A, Matin A, Grace J, Munro RC, Mutoka PN (1990) Low-technology techniques for the vegetative propagation of tropical trees. *Commonwealth Forestry Review* 69 (3): 247-257.
- Matos J (2006) Manual de Manejo de Flora Silvestre para especialistas y técnicos de áreas protegidas. Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna. Villa Clara: Feijóo. 229 p.
- Mesén F (1993) *Avances en la Producción de semillas Forestales en America Latina*. Managua.
- Mesén F, Leakey RRB, Newton AC (1992) Hacia el desarrollo de técnicas de silvicultura clonal para el pequeño finquero. *El Chasqui* 28: 6-18.
- Mesén F, Leakey RRB, Newton AC (1996) Propagadores de subirrigación: un sistema simple y económico para la propagación vegetativa de especies forestales. Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina. Memorias. Managua: Salazar R. pp.101-110.
- Mesén F, Trejos E (1998) Propagación Vegetativa de San Juan (*Vochysia Guatemalensis* Donn, Smith), mediante enraizamiento de estacas juveniles. *Revista Forestal Centroamericana* 21: 19-24.
- Millan OL, Corredoira E, San José ME (2011) In vitro rhizogenesis: of histology Cedrela odorata (Meliaceae) microcuttings. *International Journal of Tropical Biology* 59 (1): 447-453. 2011.
- Mosquera L, Robledo D, Asprilla A (2007) Diversidad Florística de dos zonas de Bosque Tropical Húmedo en el Municipio de Alto Baudó. *Acta biológica Colombia* 12: 75 - 90.
- Núñez SN, Mora SA, Santacruz RF (1997) Propagación Vegetativa del Cristobal (*Platymiscium pinnatum* Benth): pilon (*Hyeronima alcheorneoides* Allemo) y sura (*Terminalia oblonga* Ruiz & Pavon) mediante el enraizamiento de estacas juveniles. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica: CATIE. 150 p.
- Núñez SN, Mora SA, Santacruz RF (2008) Aplicación de técnicas de micropropagación en las especies *Cordia elaeagnoides* A. DC (Borraginaceae).
- Orellana M (1988) Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* para los explantes nodales de Caoba (*Swietenia macrophylla*. King). Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica: CATIE. 85 p.

Tema 7**Propagación ex vitro de laurel *Cordia alliodora*, a partir de explantes obtenidos de plántulas en vivero****Blanca Indacochea, Maurilio Garcia, Rogelio Sotolongo, Johann Parrales V**

*Vive como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a vivir siempre.**Mahatma Gandhi*

Resumen

La *Cordia alliodora* (Ruiz *et al.*), Oken (laurel), pertenece a la familia de las Boraginácea, es una especie forestal utilizada en agroforestería, produce madera de alta calidad, y también se emplea para sombra a los cafetales y pastizales además de utilizarlos en programas de reforestación. Por lo que técnicas de propagación eficientes como el cultivo de tejidos *ex vitro*, constituyen un aporte a las estrategias de conservación y manejo sostenible de este recurso, como en el caso de las especies en estudio. Con este propósito se utilizaron miniestacas de 12 cm de longitud a diferentes partes de las plántulas. Se evaluó la ocurrencia de enraizamiento, la longitud de la raíz mayor y el número de raíces por tratamiento, pasados los dos meses. Los tratamientos en cada una de las variables evaluadas, tanto el ANA como el AIB, fueron efectivos para la inducción, pero los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento con ANA- 1 000 ppm y con AIB- 500 ppm. Si bien con ANA- 1 000 ppm se obtienen los valores más altos en todas las variables con el AIB-500 ppm se logran porcentajes de enraizamiento mayores, gran número de raíces y una longitud dentro de los estándares recomendados. La propagación por estacas juveniles en una longitud de 1-2 cm de raíz y en un número de tres raíces por estaca es suficiente para extraer las estacas enraizadas del propagador y ser trasplantadas en bolsa y adaptadas previamente en el vivero antes de ser llevadas a campo definitivo. La Metodología para la propagación vegetativa de estaquillas de *Cordia alliodora* con la aplicación de AIB a 500 ppm o ANA a 1 000 ppm, es la indicada para obtener resultados de la especies

Palabras clave: *Cordia alliodora*, explante, propagación ex vitro, vivero, plántulas

Summary

Ex vitro propagation of *Cordia alliodora* laurel, from explants obtained from nursery seedlings

The *Cordia alliodora* (Ruiz et al.), *Oken* (laurel), belonging to the Boraginaceae family, is a forest species used in agroforestry. It produces high quality wood, and is also used as shade for coffee plantations and pastures besides their use in reforestation programs. Therefore, efficient propagation techniques such as *ex vitro* tissue culture, constitute a contribution to the conservation strategies and sustainable management of this resource as in the case of the species under study. For this purpose, minicuttings of 12 cm in length were used in different parts of the seedlings. The occurrence of rooting, the length of the larger root and the number of roots per treatment, were evaluated after two months. The treatments in each of the variables evaluated, both the ANA and the AIB, were effective for induction, but the best results were obtained with the treatment with ANA-1000 ppm and with IBA- 500 ppm. Although, with ANA-1000 ppm, the highest values are obtained in all the variables, with IBA-500 ppm, higher rooting rates as well as a large number of roots and a length within the recommended standards are achieved. The propagation by juvenile cuttings in a length of 1-2 cm of root and in a number of three roots by cutting is sufficient to extract the rooted cuttings of the propagator and be transplanted in bag and adapted previously in the nursery before being taken to the field. The methodology for the vegetative propagation of *Cordia alliodora* cuttings with the application of IBA at 500 ppm or ANA at 1000 ppm, is the correct one to obtain results of the species

Key words: *Cordia alliodora*, explant, ex vitro propagation, nursery, seedlings.

Introducción

Cordia alliodora (Ruiz *et al.*), *Oken* (laurel), pertenece a la familia de las Boraginaceae (Dossier y Lamb 1997). Es una especie forestal utilizada en agroforestería, produce madera de alta calidad, y también se emplea para sombra a los cafetales y pastizales además de utilizarlos en programas de reforestación (Boshier y Lamb 1997). La atractiva apariencia de la madera, sus excelentes cualidades físico-mecánicas, el rápido crecimiento, su abundante regeneración natural, el gran aporte en la captura de carbono, protección al suelo y servicio de doble propósito en usos de agroforestería asociada especialmente con café y cacao, la han convertido en una especie ideal para la reforestación (Murrillo *et al.* 2001).

La propagación asexual es una forma de reproducción, que consiste en la duplicación de nuevos individuos a partir de material vegetativo de la planta madre (Hartmann *et al.* 2002). Esta técnica se ha convertido en una alternativa excelente para muchas especies tanto de importancia comestible, ornamental, maderable o en planes de conservación de material genético de especies en peligro de extinción (Sandoval 2008). Además es una herramienta esencial en mejoramiento genético que ha sido utilizada ampliamente para la conservación de genotipos en bancos clonales. Estudios recientes han utilizado extensamente el enraizamiento de estacas juveniles para plantaciones operacionales de pocas especies (Sandoval 2008, Aparicio *et al.* 2009). Sus ventajas e implicaciones han sido ampliamente reportadas en la literatura (Zobel y Talbert 1988, Hartmann *et al.* 2002).

La propagación vegetativa puede realizarse a través de varias técnicas que han logrado aplicaciones prácticas comprobadas. Entre ellas, plantas de dos años de edad provenientes de semillas en miniestacas con fines de propagación clonal, como método eficiente de recuperación

y rejuvenecimiento del materiales adultos (Meyer *et al.* 2012). En base a lo anterior el objetivo de este estudio fue establecer una metodología para el enraizamiento de miniestacas de plántulas en viveros de dos años en *C. alliodora*, utilizando reguladores de crecimiento.

Materiales y métodos

Los materiales utilizados para la propagación:

- Plantas de dos años de edad provenientes de semillas de arboles superiores

Se seleccionaron las plantas de *C.alliodora* del vivero de donde se obtuvieron miniestacas de 12 cm de longitud a diferentes partes de las plántulas eliminando todas sus hojas. Las miniestacas se ubicaron en recipientes que contenían agua destilada para evitar la deshidratación (Figura 1).



Figura 1. Marcha analítica para el establecimiento de la propagación de *Cordia alliodora*

Se diseñaron 9 tratamientos con auxinas para inducir el enraizamiento y un testigo al cual no se le aplicó ningún regulador del crecimiento. Las hormonas utilizadas fueron ANA en concentraciones de 1000, 3500, 4000 y 20000 ppm y AIB de 500, 1000, 1500, 4000 y 20000 ppm, ambas en forma de polvo enraizador, evaluándose la longitud de las raíces.

Para el enraizamiento de las mini estacas se utilizó un sustrato de aserrín + tierra de cafetal en proporción 1:1 el cual fue desinfectado con Vydotel a 5 g/L dejándola en reposo y cubierta con polietileno durante 12 horas para después proceder al llenado de las bandejas y la plantación de las mini estacas. Se evaluó la ocurrencia de enraizamiento, la longitud de la raíz mayor y el número de raíces por tratamiento, pasados los dos meses.

Resultados y discusión

Inducción de enraizamiento

En enraizamiento se obtuvo aproximadamente a los 15 días de la inducción en todos los tratamientos, sin embargo la presencia de reguladores de crecimiento favoreció notablemente el desarrollo (Tabla 3). Pasados los 30 días las plantas ya se encontraban con su desarrollo completo para su trasplante a bolsas.

Este resultado coincide con lo recomendado por (Soudre *et al.*, 2008), quienes plantean que el período óptimo de enraizamiento es propio de cada especie, pero por lo general es de 30 a 50 días para la mayoría de las especies forestales y frutales, después de ese período no vale la pena continuar, ya que las estacas que enraícen después tendrán raíces débiles y escasas por lo que, se debe definir un momento de levante dependiendo de la velocidad de enraizamiento de cada especie.

La prueba de comparación reveló diferencias significativas entre los tratamientos en cada una de las variables evaluadas, tanto el ANA como el AIB, fueron efectivos para la inducción, pero los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento con ANA- 1 000 ppm y con AIB- 500 ppm. Si bien con ANA- 1 000 ppm se obtienen los valores más altos en todas las variables con el AIB-500 ppm se logran porcentajes de enraizamiento mayores, gran número de raíces y una longitud dentro de los estándares recomendados (Cruz *et al.*, 2007)

Tabla 3. Resultados del comportamiento con diferentes balances hormonales en el enraizamiento.

Tratamientos	Enraizamiento	Longitud de la raíz mayor	Número de raíces
Sin hormonas	52.00 c	10.89 b	1.89 b
AIB-1 000	95.25 a	11.50 b	3.27 a
AIB- 1 500	67.30 b	30.47a	1.47. b
AIB- 1 500	68.20 b	11.80 b	1.80 B
AIB-2 000	32.58 d	17.55 a	1.55 B
AIB- 4 000	56.23 bc	16.50 a	1.50 B
ANA-1 000	89.45 a	14.73 a	2.80 A
ANA-3 500	67.68 b	13.67 b	1.67 B
ANA-4 000	57.45 bc	12.30 b	1.30 B
ANA-20 000	36.70 d	14.58 a	1.58 B

Es de señalar que a medida que se incrementa la dosis de ANA y AIB se reduce la producción de raíces, lo cual está relacionado con el efecto inhibitor de estas auxinas en concentraciones altas (Gupta *et al.* 1989, Ramos 2000). Coincidiendo también con lo encontrado por (Chávez *et al.* 2000), (Santelices y Cabello 2006, Santelices 2007), en cuanto a que las mayores respuestas al enraizamiento de estacas para *Fuchsia magellanica* Lam. y *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser, se lograron con bajas concentraciones de AIB.

En relación con la aplicación de reguladores del crecimiento, algunos estudios mencionan que estacas tratadas con AIB no responden al proceso de rizogénesis o no aumentan la producción de raíces (García *et al.* 2005; Bonfil-Sanders *et al.* 2007; Latsague *et al.* 2008). Sin embargo, otros autores reportan que para inducir o estimular la rizogénesis, algunas especies requieren previamente un tratamiento con hormonas promotoras de raíces (Latsague *et al.* 2009).

En ensayos en *Swietenia macrophylla* los mejores resultados se alcanzaron al inducir con AIB a 1 000 ppm para un 78,5 % con una longitud de 3,9 cm los cuales además tuvieron mejor comportamiento en campo (Sánchez 2011), por su parte (Acosta 2006), logró el enraizamiento solo en variantes con combinación de ANA y AIB a 1 000 ppm para la especie *Triplaris guayaquilensis* en un 93.33% con longitud de la raíz de 2.89 cm.

Varios autores reconocen que las sustancias más recomendadas para estimular el crecimiento radicular y su inducción en especies forestales son el AIB y ANA (Fermino-Júnior *et al.* 2011, Sotolongo-Sospedra *et al.* 2011), las cuales se traslocan a las zonas de crecimiento a muy bajas concentraciones induciendo una respuesta fisiológica que desencadena la rizogénesis (Salisbury y Ross 1994, Giraldo *et al.* 2009). Gómez *et al.* (2010), evaluaron la sensibilidad de respuesta de esquejes aplicando un tratamiento con las siguientes concentraciones de AIB: 0 (testigo), 100, 200, 500 y 1000 mg/L. Por un periodo de 90 días el ensayo lo establecieron en invernadero con sistema de riego nebulizado sobre cama de enraizamiento, sin control de temperatura y en sustrato de turba desinfectada.

La sensibilidad mayor la observaron para la concentración de 1000 mg/L y concluyeron que la repuesta de los esquejes a la sobrevivencia y a la inducción de enraizamiento era similar aunque para la concentración de 1000 mg/L de AIB tendía a aumentar. Concentraciones superiores a 3000 ppm en ambas auxinas provocaron no solo la disminución del enraizamiento, sino también a la formación de callo en la base de la miniestaca que se presentaron en el 15% de las miniestacas en tratamientos con 4 000 ppm, este comportamiento es similar en especies como *Berberidopsis corallina* (Latsague-Vidal *et al.* 2008) y *Heliocarpus americanus* (Vásquez- Restrepo *et al.* 2006). Carvalho da Silva *et al.* (2012) usaron dos reguladores del crecimiento: ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en las concentraciones de: 0; 1000; 2000 y 4000 mg/L para inducir la producción de raíces. El mejor regulador del crecimiento resultó ser: AIB en la concentración de 4000 mg/L.

El regulador ANA en la concentración de 4 000 mg/L resultó ser fitotóxico para las estacas de *Melaleuca alternifolia*. Varios autores han referido el efecto negativo del callo basal en las técnicas de propagación *ex vitro* e *in vitro* (Chanatasig 2004), ya que en esa zona no se

desarrollan adecuadamente las estructuras y tejidos de transporte que permiten la conexión entre la parte aérea y la radical (George 1996), o en muchos casos no se inducen raíces (Roca 1991). El tamaño de las raíces y el número de las mismas es un aspecto a considerar como elementos de calidad de la miniestaca y coinciden en que un número de raíces superiores a tres (Ramos-Luis *et al.* 2000) y con longitudes de 2.5 cm son idóneas para garantizar su sobrevivencia en campo (Sánchez 2000, Cruz- Rosero *et al.* 2005).

Por otro lado, cuando se trata de propagación por estacas juveniles, algunos investigadores como (Mesén 1998) considera que con solo obtener una longitud de 1-2 cm de raíz y en un número de tres raíces por estaca es suficiente para extraer las estacas enraizadas del propagador y ser trasplantadas en bolsa y adaptadas previamente en el vivero antes de ser llevadas a campo definitivo, mediante este proceso es necesario además garantizar el mayor porcentaje de enraizamiento con una mayor cantidad de raíces distribuidas alrededor del perímetro de la estaca que obtener estacas con uno o dos raíces largas (Zorilla 2012). Sin embargo, en *C. alliodora* concentraciones bajas de AIB resultan buenas para alcanzar dichos estándares a los 45 días. Por lo que la metodología para la reproducción *ex vitro* quedaría expuesta en la (Figura 6).

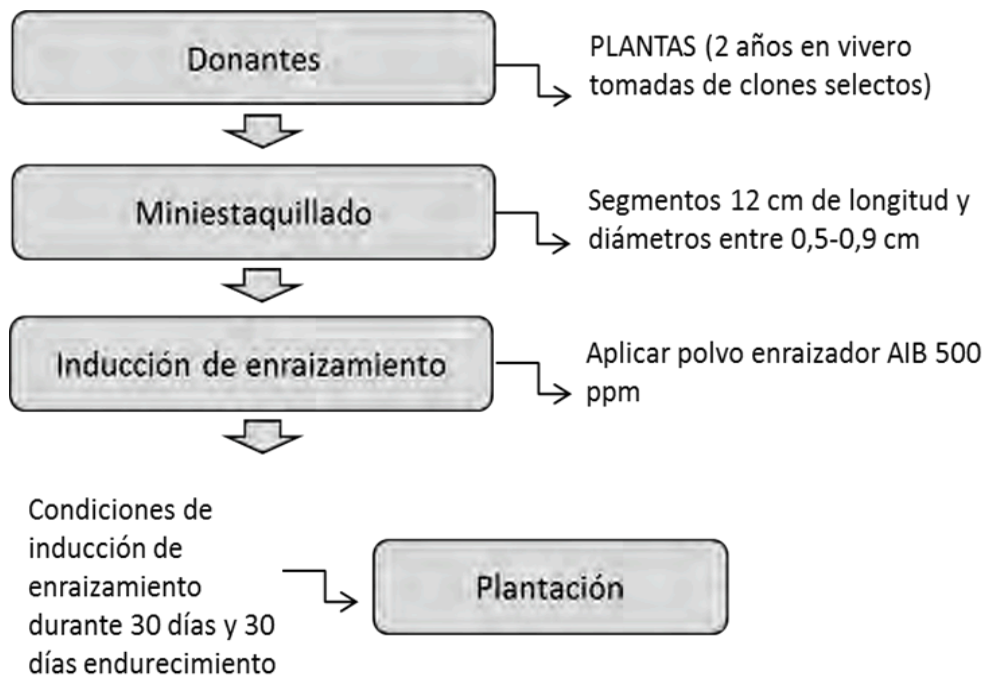


Figura 6. Metodología para la propagación vegetativa de estaquillas de *Cordia alliodora*

Conclusiones

- La propagación *ex vitro* de *C. alliodora* se logra a partir de mini estacas con la aplicación de AIB a 500 ppm o ANA a 1 000 ppm en condiciones de alta humedad por 30 días.

- La propagación por estacas juveniles en una longitud de 1-2 cm de raíz y en un número de tres raíces por estaca es suficiente para extraer las estacas enraizadas del propagador y ser trasplantadas en bolsa y adaptadas previamente en el vivero antes de ser llevadas a campo definitivo
- La Metodología para la propagación vegetativa de estaquillas de *Cordia alliodora* con la aplicación de AIB a 500 ppm o ANA a 1 000 ppm, es la indicada para obtener resultados de la especies.

Referencias

- Abdelnour E, Muñoz A (1997) Micropropagación de especies forestales. X Congreso Forestal Nacional de Especies Forestales. San José de Costa Rica.
- Abdelnour A y Muñoz A (2005) Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f).Kurú: Revista Forestal 2(5):1-11.
- Abdelnour A y Muñoz A (2011) Micropropagación de teca (*Tectona grandis*L.f). Kurú: Revista Forestal 2(5):1-11. 2011.
- Acosta (2006) Propagación de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) Mediante diferentes tipos de esquejes y sustratos Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín vol.61 no.1 Medellín Jan./June 2006.
- Acosta M, Sánchez J, Bañon M (2008) Auxinas.En:J.Azcón-Bie-to y Talón M. (eds).Fundamentos de Fisiología Vegetal.Segunda edición. McGraw- Hill, S.A. Cartagena,Madrid,p.377.
- Agramonte D, Jiménez MA, Dita A (1998) Aclimatización en Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Editorial Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. 400 pp.
- AR-VITRO® (2004) Un sistema de apoyo para el sector agrobiotecnológico de Uruguay, junio 2004, Capdevielle, F.; Castillo, A. I Seminario de Arándanos y Frambuesas, Uruguay
- Soria J, Cabrera D, Pisano J, Castillo A (2000) Avances de Investigación en Frutales de Carozo y Arándanos. Serie Actividades de Difusión N° 237.
- Avances en experimentación de frutales alternativos: arándanos y otros berries. Serie Técnica N° 286, 14 de mayo 2002
- Azofeifa-Bernal ., Rojas A, Hine A (2009) Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatación de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King(Orden Meliaceae).Tecnología en Marcha.22(3):34-41.
- Billard CE, Lallana VH (2005) Multiplicación in vitro de *Eucalyptus dunnii*. Ciencia, Docência y Tecnologia,n. 30, Ano XVI, mayo 2005.
- Caso OH (1992) Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. Agriscientia 9 (1): 5-16. Chalupa, V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae 13: 7-39
- Castillo R, Livera M, Márquez G (2004) Caracterización morfológica y compatibilidad sexual de cinco genotipos de pitahaya.Agrociencia.39-42.
- Castro D y González Olmedo J (2002) Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis*)

- Castro D y González Olmedo J (2005) Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis*)
- Chalupa V (1983) Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. *Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13: 7-39.
- Cruz da Rocha R y Quoirin M (2004) Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados in vitro. *Capa* > v. 14, n. 1 (2004) > Rocha
- Daquinta M, Ramos L, Capote I, Lescano Y, Rodriguez R, Trina D, Escalona M (2001) Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L. F). *Revista Forestal Centroamericana* 35:23-28.
- De Fossard (1996) Tissue culture for plant propagators. *univ. New England printery, armidale.* 409 p.
- Debergh PC, Read PE (1993) Micropropagation. En *Micropropagation*. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 1-13.
- Driver D and Kuniyuki D (1997) *In vitro propagation* of Paradox walnut rootstock. *HortScience* 19:507-509.
- Evans DA, Sharp WR, Bravo JE (1984) Cell culture methods for crop improvement. *Handbook of Plant Cell Culture* 2: 47-68.
- Fonturbel F (2000) Micropropagación de un cultivo perenne. *Portal de Biología y Ciencias de la Salud*, 2002, No.7.9.1-7.
- Gamboa JP, Abdelnour A (2011) Micropropagación de melina (*Gmelina arborea* ROXB). *Agronomía Costarricense* 23:69-76.
- Gangopadhyay G, Das S, Mitra SK, Poddar R, Modak BK, Mukherjee KK (2002) Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Netherlands
- García-González R., Delgado M, González Y, González A, Garriga M, Caligari PD, Quiroz K (2011) In vitro propagation of cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots *Chilean Journal of Agricultural Research*. 71(3):376- 390.
- George EF (1996) *Plant propagation by tissue culture*. Part I.
- George E.F, Hall MA, De Klerk GJ (2008) *Micropropagation: Uses and methods*. In: *Plant propagation by tissue culture*, 3rd edition. George, E.F.; Hall, M.A. and De Klerk, G.E. (eds.) Springer, The Netherlands: 29-64
- González Rodríguez JA y Peña Ramírez YJ (2007) Establishment of efficient protocols for massive propagation of tropical trees from Mesoamerica through somatic embryogenesis.
- Gresshoff PM, Doy CH (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Planta* 107:161-170.
- Gribaudo I, Fronda A (1993) L' ambientamento delle piante frutticole micropropagate. *Rivista di Frutticoltura*, Paris, v.1, p.75-79.
- Ramos J (2000) Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Science Letter*. 17:259-268.
- Hartmann H y Kester D (1997) *Propagación de plantas: Principios y prácticas*. 760 p.

Editorial Continental, Ciudad de México, México.

Hernández H (2011) Regeneración in vitro de *Allium sativum* L. A partir de segmentos de hojas y raíces.

Hu CY y Wang PJ (1983) Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures. En: Evans D. F., W. R. Sharp, P. V. Ammirato y Y. Yamada (eds.). *Basic Techniques of Plant Cell Culture*. Vol. 1. *Techniques for Propagation and Breeding*. 177-227..

Indacochea B (2013) Contribución a la Conservación y Propagación de Clones superiores de *Cordia alliodora* (ruiz & pav). oken, en la Microrregión sur de Manabí Tesis de Doctorado, Diciembre 2013., Tutores: Dr. Maurilio García Lopez y Dr. Rogelio Sotolongo S. Universidad Pinar del rio-Cuba.

Castillo A (2000) Introducción al cultivo de especies aromáticas nativas de interés comercial, Tesis de Maestría, julio 2000. Director Dr. Victoriano Valpuesta, Tutor. Dr. Marco Dalla Rizza. Montevideo, Uruguay.

Jiménez V, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montiel M (2006) In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*;

Klopfenstein NB, Kerl JG (1995) The potential of biotechnology in temperate agroforestry practices. In: *Agroforestry systems 32*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands: 29-44.

Lameira P (2006) In vitro propagation of *Cordia verbenacea* (Borraginaceae). *Revista Brasileira Plantas*.

Latsague M, Sáez P, Yáñez J (2009) Efecto del ácido indolbutírico en la capacidad rizogénica de estacas de *Eucryphia glutinosa*. *Bosque* 30(2): 102 – 105.

Lloyd G and McCown B (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kolmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagator Society* 30: 421-427.

Lobato PE, Gianinazzi-Pearson V, Trouvelot A, Gianinazzi S (1998) The state of art of mycorrhizas and micropropagation. *Adv. Hort. Sci.* 10: 46-52.

MacRae S and Coterill P (1997) Macropropagation and micropropagation of *E. globulus*. Means of capturing genetic gain. *Proceedings of the IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus v2: Biotechnology applied to genetic improvement of tree species*. Salvador, Brasil. pp: 102–110.

Maloso MG, Bertoni BW, da Silva - Coppede M, de Castro-Franca S, Soares-Pereira AM (2012) Micropropagation and in vitro conservation of *Jacaranda decurrens* Cham. *Journal of Medicinal Plant Research* 6 (7):1147.

Mantovani NC, Henz ET, Vestena FS (2001) In vitro regeneration of Louro- pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). *For. Sci.* 11: 93-101

Tema 8

Influencia de niveles de concentración de hormona AIB, en la inducción de raíces en estaquillas de bálsamo (*Myroxylon balsamum*)

Johann Parrales, Blanca Indacochea G

"Si cierras la puerta a todos los errores, también la verdad se quedará fuera."

Rabindranath Tagore

Resumen

La presente investigación "Influencia de niveles de concentración de hormona AIB en la inducción de brotes y raíces en estaquillas de *Myroxylon balsamum* (bálsamo)". Se realizó en el vivero del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí. El objetivo fue Determinar los niveles de concentración de la hormona natural AIB en la inducción de brotes y raíces en estaquillas de *Myroxylonbalsamum* (bálsamo). Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar en arreglo factorial 3 x 6. Los factores estudiados son Factor A: estaquillas de *Myroxylon balsamum* (bálsamo) y Factor B: hormona de enraizamiento ácido indolbutírico (AIB), 1000; 4000; 10000; 15000; 20000 PPM. Los resultados indican que la mayor longitud de brotes se presentó a los 25 días en el tratamiento 1 (AIB, 1 000 PPM) con 1,13 cm de longitud. A los 30 días de iniciada la investigación, se encontró con un porcentaje de mortalidad considerable, las estaquillas comenzaron poco a poco a ir perdiendo su vigor hasta secarse en su totalidad y morir, de esta forma no se logró obtener raíces en esta investigación

Palabras clave: Concentración, factorial, estaquilla, hormonas.

Summary

Influence of levels of AIB hormone concentration on the induction of roots in balsam cuttings (*Myroxylon balsamum*)

The present research "Influence of levels of AIB hormone concentration on the development of sprouts and roots in cuttings of *Myroxylon balsamum* (balm)" was carried out in the Biotechnology Laboratory Nursery of the Southern State University of Manabí. The objective was to determine the concentration levels of the natural AIB hormone in the induction of sprouts and roots in cuttings of *Myroxylonbalsamum* (balm). A completely randomized block design was used in a 3 x 6 factorial arrangement. The factors studied were Factor A: *Myroxylon balsamum* (balm) cuttings and Factor B: indole-butyric acid (IBA) rooting hormone, 1000; 4000; 10000; 15000; 20000 PPM. Results indicate that the greatest length of sprouts was present at 25 days in treatment 1 (IBA, 1 000 PPM) with 1.13 cm in length. After 30 days of the research initiation, it was found a significant percentage of mortality; the cuttings gradually began to lose their vigor until completely dry and die, so it was not possible to obtain roots in this research.

Key words: Concentration, factorial, cuttings, hormones.

Introducción

Los recursos forestales a nivel mundial y latino americano están siendo explotados de forma irracional, especialmente aquellas especies nativas y de alto valor comercial que se encuentran en el bosque seco tropical y que por lo general son de zonas bajas y cálidas, pero también a mayores alturas. En estos bosques las épocas secas se prolongan durante varios meses del año, en los cuales el sol es constante y hay una gran escasez de agua. Aquí las lluvias se presentan durante temporadas cortas, tiempo en que algunos bosques se inundan por las crecientes de los ríos. En los bosques muy secos, las temporadas de sequía son más prolongadas, las lluvias son más escasas y rara vez se inundan, el objetivo de la presente investigación es determinar los niveles de concentración de la hormona natural AIB en la inducción de brotes y raíces en estaquillas de *Myroxylon balsamum* (bálsamo). Varias especies forestales maderables incluida el bálsamo, son muy atractivas para los comerciantes y madereros que a su vez son aprovechadas con mucha frecuencia por los campesinos y agricultores.

En la provincia de Manabí, particularmente en el cantón Jipijapa esta actividad no es una excepción, en gran parte esto se debe a limitaciones a las que están sometidos los campesinos que para subsistir realizan un aprovechamiento selectivo de estas especies para la obtención de madera aserrada, las mismas que son comercializadas en gran medida en los depósitos de madera, en talleres de ebanistería para la elaboración de mueblerías en general, otra parte es utilizada para la construcción de viviendas, así como también se comercializan en otras ciudades del país como Manta, Guayaquil y otras urbes de importancia económica.

Los esfuerzos desplegados por el Gobierno y Organismos no Gubernamentales a través de diferentes programas de forestación y reforestación no son suficientes, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas para restablecer las especies en vías de extinción y de esta manera recuperar las especies nativas del bosque seco tropical.

Una de estas especies es el *Myroxylon balsamum* (bálsamo) que por ser de alto valor comercial requiere un tratamiento especial por lo que esta investigación plantea buscar una alternativa para la propagación masiva y mejoramiento genético del bálsamo, por ello se busca a través de aplicaciones de hormonas naturales de enraizamiento como el ácido Indolbutírico (AIB) aplicándoles a estaquillas de plantas manejadas en vivero, producidas a través de semillas y colocándolas en un ambiente controlado de humedad y temperatura para acelerar el brote y enraizamiento de las mismas. Se pretende entonces evaluar la influencia del balance hormonal con concentraciones 1 000, 4 000, 10 000, 15 000 y 20 000 ppm en estaquillas de *Myroxylon balsamum*.

Los resultados que se obtengan servirán de base para realizar nuevas investigaciones de esta especie y otras con diferentes niveles de concentración.

Materiales y Metodos

Área de estudio: La presente investigación se realizó en el vivero del laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, que se sitúa en el Campus "Los Angeles", Km 11/2 vía Noboa, el mismo que se encuentra ubicada entre las siguientes coordenadas: 17 M 0548196 X y UTM 9850644 Y.

Diseño Experimental

Factores en Estudio:

Factor A: Estaquillas de *Myroxylon balsamum* (bálsamo).

Factor B: Hormona de enraizamiento ácido indol butírico AIB 1 000; 4 000; 10 000; 15 000; 20 000 PPM.

Tipo de diseño: Bloque Completamente al Azar. Este diseño cuenta con tres repeticiones y seis tratamientos

Resultados y discusión

Identificación de la dosis apropiada de AIB en el proceso de brotes en estaquillas de *Myroxylon balsamum* (bálsamo)

Longitud de brote Mayor los 7 días de iniciado el ensayo

La Tabla 1, presenta el análisis de varianza de la variable de brotes, en este se puede observar que los tratamientos y las repeticiones, presentan diferencias estadísticas significativas, las otras fuentes de variación no presentan diferencias estadística alguna.

El Coeficiente de Variación es 23.36 % y el promedio general 0,37 mm.

Tabla 1. Análisis de varianza de brotes a los 7 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	F 0.05	F 0.01
Repeticiones	2	0.0337	0.0168	2.21		
Tratamientos	5	0.1711	0.0342	4.49	3.33	5.64 *
Error	10	0.0763	0.0076			
Total	17	0.2810				
C.V %	23.36					

** : Diferencias estadísticas altamente significativas, * : Diferencias estadísticas significativas, n.s.: no significativo

Los valores promedios y la prueba de Tukey efectuada, en el que se puede observar que el mejor tratamiento presenta una media 0.54 que corresponde al tratamiento 1 (1000 PPM), el rango más bajo se presentó en el tratamiento 6 con una media de 0.22 que corresponde al testigo.

Longitud de brote Mayor los 25 días de iniciado el ensayo

La Tabla 2, presenta el análisis de varianza de brotes, aquí se puede observar que los tratamientos, presentan diferencias estadísticas altamente significativas, las otras fuentes de variación no presentan diferencia estadística alguna. El Coeficiente de variación es 19.74 % y el Promedio General. 0,65 mm

Tabla 2. Análisis de varianza de brotes a los 25 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	F 0.05	F 0.01
Repeticiones	2	0.06	0.03	1.87	3.49	5.95
Tratamientos	5	0.47	0.09	5.69	3.33	5.64**
Error	10	0.17	0.02			
Total	17	0.70				
C.V %	19.74					

** : Diferencias estadísticas altamente significativas, * : Diferencias estadísticas significativas, n.s.: no significativo

Los valores promedios y la prueba de Tukey efectuada, en el que se puede observar que el mejor tratamiento presenta una media 0.95 que corresponde al tratamiento 1 (1 000 PPM), el rango más bajo se presentó en el tratamiento 6 con una media de 0.41 que corresponde al testigo.

Identificación de la dosis apropiada de AIB en el proceso de enraizamiento en estaquillas de *Myroxylon balsamum* (bálsamo)

Longitud de raíz mayor

Estos datos fueron tomados en la evaluación final del ensayo, a los 50 días de iniciado el mismo, encontrándonos que las estaquillas no habían logrado enraizar debido a que las mismas se sacaron y murieron. A los 30 días de iniciado el ensayo, se encontró con un porcentaje de mortalidad considerable, después de esa evaluación las estaquillas que aún se encontraban vivas comenzaron poco a poco a ir perdiendo su vigor y por lo consiguiente se iban marchitando, hasta secarse en su totalidad y morir.

Todos los procesos que se hicieron en esta investigación fueron realizados con mucha cautela para lograr cumplir con el objetivo, sin embargo no se logró obtener raíces en las estaquillas de bálsamo, aunque se realizaba el riego todos los días por la mañana.

Llegando así a la última evaluación con el total de estaquillas muertas, no logrando obtener raíces en esta investigación.

Porcentaje de Mortalidad

Para obtener estos datos se realizaron dos evaluaciones a los 25 y 50 días de iniciada la investigación, teniendo como resultado lo siguiente:

Resultados de la primera evaluación realizada a 25 días de iniciada la investigación

La Tabla 3, presenta los valores promedios y la prueba de Tukey efectuada, indica que en el tratamiento 6 se encontró el mayor porcentaje de mortalidad con una media de 7,67 en este tratamiento no se utilizó hormona.

Tabla 3. Prueba de TUKEY, mortalidad a los 25 días.

BLOQUES	TRATAMIENTOS						Suma	Media
	1	2	3	4	5	6		
I	2	4	5	4	7	8	30	5.00
II	1	6	6	5	5	7	30	5.00
III	4	5	5	7	6	8	35	5.83
Suma	7	15	16	16	18	23	95	15.83
Media	2.33	5.00	5.33	5.33	6.00	7.67	31.67	5.28

Como resultado total del porcentaje de estaquillas muertas se obtuvo un 52.8%, quedando el 47.2% de estaquillas vivas, a los 25 días de iniciada la investigación.

Resultados de la segunda evaluación realizada los 50 días de iniciado el ensayo

En esta evaluación los datos obtenidos fueron el 100% de mortalidad, ya que todas las estaquillas se secaron y por ende murieron.

Discusión

La base de este trabajo de investigación fue la búsqueda en la determinación del comportamiento agronómico de brotes, raíz y mortalidad, lo que determino hacer este ensayo sobre “Influencia de niveles de concentración de hormona AIB, en la inducción de raíces en estaquillas de *Myroxylon balsamum* (bálsamo)”

Con el uso de la concentración 1000 PPM de la hormona AIB, se puede obtener brotes al menos durante los 7 y 25 días de evaluación, los resultados encontrados en la presente investigación son similares a los reportados por (Chicaiza, 2004), a los 30 días de evaluación, quien trabajó en la propagación vegetativa de la teca, empleando hormonas ANA y AIB. En cuanto a supervivencia el tratamiento 1 000 mg/kg de ANA + 1 000 mg/kg de AIB presento los mejores resultados para número de brotes, longitud de brote mayor y supervivencia 83.3 % (Quevedo 2003).

En cuanto a la evaluación realizada a los 50 días de iniciado el ensayo, se pudo verificar que las estaquillas no habían logrado enraizar. Sin embargo en la evaluación que se realizó a los 25 días aún se encontraban vivas el 47.2% y se observó que las estaquillas poco a poco iban perdiendo su vigor y se marchitaban, hasta secarse en su totalidad y morir. Esto es corroborado por Zobel y Talbert (1988). Mencionan que árboles jóvenes enraizaban fácilmente, pero al ensayar los mismos árboles en etapa madura no consiguieron el mismo resultado.

Esto es frustrante para el genetista forestal, quien trabaja con genotipos convenientemente probados, porque cuando se espera a que crezcan los árboles lo suficiente para mostrar su valor genético suele ser demasiado tarde para enraizarlos. Sin embargo los esquejes de diversas especies de plantas enraizan con facilidad en gran variedad de medios, pero en las plantas de difícil enraizamiento el sustrato influye en el porcentaje de enraizamiento y en la calidad de las raíces (Hartmann y Kester 2002). Según Valarezo (1984), citado por

(García, 2008) indican que las sustancias más utilizadas para estimular el crecimiento radicular de brotes son el Ácido Indol Butírico AIB y el Ácido Naftalen Acético ANA.

En relación con la aplicación de reguladores de crecimiento, algunos estudios mencionan que estacas tratadas con AIB no responden al proceso de rizogénesis o no aumentan la producción de raíces, en lo que se concuerda con (Latsague *et al.* 2008). Sin embargo, otros autores reportan que para inducir enraizamiento o estimular la rizogénesis, algunas especies requieren previamente un tratamiento con hormonas promotoras de raíces así, varios autores han realizado ensayos para el enraizamiento de estacas, empleando reguladores del crecimiento en diversas especies de plantas leñosas.

Conclusiones

Para la proliferación de brotes en las estaquillas de *Myroxylon balsamum*, los mejores resultados se obtuvieron aplicando dosis de AIB en concentración de 1 000 ppm a los 7 y 25 días de iniciado el ensayo.

En el proceso de inducción de raíces de las estaquillas de *Myroxylon balsamum*, la longitud de raíz mayor a los 50 días de iniciado el ensayo, no se obtuvo raíz en ninguna de las concentraciones hormonales de AIB aplicadas.

Referencias

- Acosta M (2006). Propagación Vegetativa de *Triplaris guayaquilensis* (Fernán sánchez), mediante utilización de hormonas. Tesis Ing. FOr. Universidad Estatal de Quevedo.
- Álvarez PA y Varona JC (1988). Silvicultura. Ed. Pueblo y Educación. La Habana, Cuba.
- Añazco M (2000). Producción de plantas. CAMAREN. Quito.
- Bermudez M (2006). Propagación Vegetativa de la *Gmelina Arbórea* Roxb. con el uso de hormonas de enraizamiento (ANA y AIB) y establecimiento en campo de parcelas permanentes. (Tesis de grado para la optención de Título de Ingeniero Forestal, Universidad Estatal de Quevedo). Quevedo.
- Bidwell R (1979). Fisiología vegetal. Trad. Por Guadalupe Gerónimo Cano y Cano y Manual Rojas Garcidueñas. México D.F. p. 410 – 411. México D.F.
- Bonfil S, Mendoza P, Ulloa J (2007.). Bonfil-Sanders C.; P. MendEnraizamiento y formación de callos en estacas de siete especies del género *Bursera* (Vol. 41).
- Briscos C (1990). Manual de ensayos de campo con árboles de usos múltiples. Proyecto F/FRED. Bangkok Tailandia.
- Carvalho da Silva R, Costacurta Antunes M, Roveda LF, Carvalho TC, Biasi L (2012) Enraizamiento de estacas de *Melaleuca alterni* Semina: Ciências Agrárias 33.
- Catro K y Sánchez R (2010). Propagación in vitro de *eucalyptus pellita* T. Muell a partir de árboles plus. (Vol. 15).
- Chamba (2002). Propagación en vivero de seis especies forestales promisorias de la zona seca de la provincia de Loja. Tesis Ingeniero Forestal. Universidad Nacional de Loja. Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. Loja, Ecuador.
- Chicaiza D. (2004). Propagación Vegetativa de *Tectona grandis* L. (Teca) a través de estacas

enraizadas (Tesis para optar al título de Ingeniero Forestal, Univesidad Técnica Estatal de Quevedo). Quevedo.

Costa Silva FV, Moura Castro A, Alves Chagas E, Pessoni LA (2009) Costa Silva, F. V.; Moura Castro, A.; Alves Chagas, E.; Propagação vegetativa de camu-camu por estaquia: efeito de fitorreguladores e substratos [en línea]. *Agro@ambiente on-line* v. 3, n.2 Disponible en: <http://revista.ufr.br>.

Cruz N y Morante M (2008) Propagación Vegetativa de Fernán Sánchez (*Triplaris guayaquilensis*) mediante la utilización de hormonas de enraizamiento (ANA y AIB). *Revista Ciencia y Tecnología*: 7-10.

Cuculiza P (1985) Propagación de Plantas. Lima, Perú. .

Delvin R (1980) Fisiología Vegetal. Omega, Barcelona, España.

Easley D y Lamberth C (1989) Potencial de rebrotamiento y enraizamiento de diferentes especies Amazónicas. Cali, Colombia.

García R, Vargas JJ, Cetina V, Villegas A (2005). Efecto del ácido indolbutírico (AIB) y tipo de estaca en el enraizado de *Gmelina arborea* Roxb. García, R.; J.J. Vargas, V. Cetina y A. Villegas. 2005. Efecto del ácido indolbutírico (AIB) y tipo de estaca en el enraizado d*Revista de Fitotecnia Mexicana* 28(004).

García T (2008) Empleo de fitohormona ANA y AIB para la propagación vegetativa de *Cedrela odorata* L. (Cedro) bajo tres sustratos en la zona de Quevedo. Tesis para optar al título de Ingeniero Forestal, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador.

Giraldo L, Fabio Ríos H, Polanco MF (2009.) Giraldo, L.A.; Fabio-Ríos Efecto de dos enraizadores en tres especies forestales promisorias para la recuperación de suelos.

Hartmann HT y Kester DE (2002) *Plant propagation: Principles and Practice*. (5 ed.). New Jersey, USA.

Holdridge LR, Poveda ALJ (1975) *Árboles de Costa Rica*. Vol. 1. San José, Costa Rica.

Tema 9**Obtención de protocolos de desinfección para la propagación *in vitro* de tres especies forestales nativas en la zona sur de Manabí****Blanca Indacochea, Máximo Vera, Johann Parrales, Carlos Castro, Fernando Ayón**

*Sabemos lo que somos, pero no sabemos lo que podemos ser.**William Shakespeare*

Resumen

Se planteó una metodología para el establecimiento *in vitro* de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) *Tabebuia crhysantha guayacán* y *Tabebuia billbergii*, (madero negro), árboles nativo ecuatoriano. Actualmente el cultivo *in vitro* se ha constituido en una vía excelente para incrementar el número de individuos de especies leñosas. El objetivo fue Desarrollar alternativas tecnológicas para la propagación de plantas forestales nativas amenazadas en la zona Sur de Manabí, mediante la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*, empleado para el establecimiento diferentes concentraciones de Povidyn, NaClO + Tween + HgCl₂ y tiempos de exposición. La contaminación fue controlada con 1% Povidyn por 20 minutos +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 minutos + 0.5% HgCl₂ por 5 minutos, alcanzando un 90%, 87% y 88% de sobrevivencia. Los explantes sanos fueron transferidos a un medio de cultivo con distintos niveles de bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (AIB) para su multiplicación *in vitro* fue 80%, 82% y 87% de brotes con 2 mg L⁻¹ de BAP, en combinación con 1 mg L⁻¹ de AIB. Los mejores brotes de la fase de multiplicación se colocaron en medio de cultivo, con diferentes concentraciones de ANA, para facilitar su enraizamiento de los tratamientos ensayados permitió generar raíces a los 30 días de su evaluación en la especie *Myroxylon balsamum*, en cambio para las otras dos especies no presentaron raíces. Los mejores resultados de los segmentos nodales cultivados *in vitro* se obtuvo en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) y la combinación hormonal 2 mg L⁻¹ BAP y 1 mg L⁻¹ ANA, el mayor porcentaje de sobrevivencia fue de 64%, 66% y 68%, de las especies.

Palabras clave: Manejo ambiental, efecto ambiental, hormonas, bioseguridad, reproducción *in vitro*.

Summary

Achievement of disinfection protocols for *in vitro* propagation of three native forest species in the southern zone of Manabí

A methodology was proposed for the *in vitro* establishment of *Myroxylon balsamum*, (*balm*) *Tabebuia crhysantha guayacán* and *Tabebuia billbergii*, (blackwood), native Ecuadorian trees. The *in vitro* crop has now become an excellent channel to increase the number of individuals of woody species. The objective was to develop technological alternatives for the propagation of threatened native forest plants in the Southern zone of Manabí, by applying *in vitro* crop techniques used for the establishment with different concentrations of Povidyn, NaClO + Tween + HgCl₂ and exposure times. The contamination was controlled with 1% Povidyn for 20 minutes + 15% NaClO + 2 drops Tween for 5 minutes + 0.5% HgCl₂ for 5 minutes, reaching 90%, 87% and 88% of survival. The healthy explants were transferred to a culture medium with different levels of benzylaminopurine (BAP) and indolebutyric acid (IBA) for its *in vitro* multiplication which was 80%, 82% and 87% of sprouts with 2 mg L⁻¹ of BAP, in combination with 1 mg L⁻¹ of IBA. The best sprouts of the multiplication phase were placed in culture medium, with different concentrations of ANA, to facilitate their rooting of the tested treatments allowing the generation of roots 30 days after their evaluation in the species *Myroxylon balsamum*. In contrast, for the others two species, there were no roots. The best results of *in vitro* cultivated nodal segments were obtained in Murashige and Skoog (MS) culture medium and the hormonal combination of 2 mg L⁻¹ BAP and 1 mg L⁻¹ ANA, the highest survival rate was 64% 66% and 68%, of the species.

Key words: Environmental management, environmental effect, hormones, biosecurity, *in vitro* reproduction.

Introducción

El cantón Jipijapa y la zona sur de Manabí tiene una gran variedad de especies maderables, se cuenta aún con bosques primarios, zonas de reserva y a pesar de eso el hombre no ha respetado la naturaleza, deforestando en forma indiscriminada los bosques para hacer uso de este recurso en la elaboración de artesanías, muebles y en gran escala la mayor parte de esta madera es llevada a Guayaquil y Manta para la exportación.

La especie *Tabebuia chrysantha*, es un árbol originario de la zona intertropical de América. Es común en toda la geografía ecuatoriana en el rango altitudinal de 200 a 1200 m.s.n.m., es decir, crece preferiblemente en regiones cálidas. Loja, en su cantón Zapotillo, parroquias Mangahurco, Bolaspamba y Cazaderos, está el bosque de Guayacán más vistoso debido a que alberga 40.000 hectáreas de la especie. La floración en el cantón Zapotillo ocurre entre los meses de diciembre y enero, durante este tiempo es común observar cómo una alfombra de flores amarillas cubre el suelo del bosque cuando de las copas de los guayacanes empiezan lentamente a caer. (Ministerio de Turismo 2014).

La especie *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Scum.) Standl., es un árbol caducifolio, de tamaño mediano que alcanza hasta 14 metros de altura. Se distribuye en los valles secos de 0 a 500 msnm. Su madera dura y pesada es cotizada en Ecuador para artesanía y carpintería, por el

contraste en el color entre la albura clara y el duramen muy oscuro. En el Perú su madera es usada para fabricación de parquet y en construcciones rurales. Sus hojas sirven como forraje (INRENA 2002). *T. billbergii* es una especie representativa del bosque estacionalmente seco (BES), un ecosistema muy frágil que se extiende desde la península de Santa Elena, en el sur del Ecuador, hasta el noroeste del Perú, comprendiendo la costa de las regiones Tumbes, Piura, Lambayeque y el norte de La Libertad así como el piso inferior del valle del Marañón; estas dos áreas se comunican a través del Paso de Porculla, una depresión de 2100 m de elevación, considerada la más baja de los Andes peruanos (Brack y Mendiola 2004).

La especie *Myroxylon balsamum*, es un árbol originario de América tropical, se encuentra distribuido en forma natural en América del sur; su presencia se ha registrado en Bolivia, Brasil, Ecuador, Paraguay, Perú, Venezuela, Guyana y el noroeste de Argentina, en el Ecuador se encuentra en las provincias de: Esmeraldas, sector de San Mateo a 45 msnm; Manabí, sector La Isla de Jama, La Unión de San Vicente a 226 msnm, Jardín Botánico de la UTM en Portoviejo a 42 msnm, El Chontal de Pedro Pablo Gómez desde 484 hasta 588 msnm, Cantagallo de Puerto Cayo a 45 msnm, comuna Agua Blanca de Machalilla en Puerto López, Mirador San Antonio de Jipijapa a 279 msnm, Choconcha de Jipijapa y Las Coronas de Charapotó desde 244 a 339 msnm; Guayas, sector Las Minas 57 msnm, El Aguacate Petrillo a 103 msnm y Casas Viejas Chungón desde 317 a 360 msnm; Santa Elena, cantones Santa Elena y La Libertad a 60 msnm; Los Ríos, Finca La Represa de la UTEQ a 90 msnm; Loja, sectores Cofrana Cotacocha entre 1621 a 1631 msnm y Colanga entre 1487 a 1617 msnm, Napo, comunidad de Campococha desde 380 a 557 msnm. El Jardín Botánico de Missouri reporta la presencia del género en las provincias de Sucumbíos y El Oro. (Limongi 2012). En Ecuador es una de las especies maderables nativas amenazadas ante la acelerada deforestación que se registra en la ecoregión del bosque seco del Litoral ecuatoriano.

Una de las estrategias para superar las dificultades de propagación y evitar la extinción de especies valiosas, es el cultivo in vitro de tejido vegetal (Delgado *et al.* 2008). Esta técnica permite obtener plantas a partir de un fragmento pequeño de tejido cultivado en condiciones estériles (Murashige y Skoog 1962). La propagación in vitro vía organogénesis directa incrementa de forma rápida el número de individuos, etapa importante en la producción de plántulas a nivel industrial y un banco de germoplasma con fines de rescate (Uribe *et al.* 2008). Además, permite obtener plantas libres de enfermedades, en algunas ocasiones reduce el tiempo de propagación (Rebolledo *et al.* 2006). Debido a las dificultades de propagación sexual de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) *Tabebuia crhysantha* (guayacán), *Tabebuia billbergii*, (madero negro) y escasa información disponible de propagación in vitro (Valverde *et al.* 1998 y Collado *et al.* 2004), (Pérez *et al.* 2008), se ha propuesto desarrollar alternativas tecnológicas para la propagación de plantas forestales nativas amenazadas en la zona sur de Manabí y definir los medios de cultivos y protocolos de desinfección más adecuados para la reproducción in vitro de las especies nativas amenazadas que facilite el establecimiento y multiplicación de plantas de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*, mediante la aplicación de técnicas de cultivo in vitro, vía organogénesis directa con fines de recuperación.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, Ecuador,

Material vegetal y preparación de los explantes

Se empleó segmentos nodales de plantas de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii* de tres meses de edad del invernadero del Laboratorio de Biotecnología, fumigadas dos veces por semana con mezcla de Agrimicin y Benlate a una concentración de 1 g L⁻¹ (Indacochea 2013) para disminuir la contaminación de los segmentos nodales en el establecimiento in vitro (Anexos) (Rebolledo *et al.* 2006 y Flores *et al.* 2009).

Medios de cultivo

Se empleó el medio de cultivo MS propuesto por Murashige y Skoog (1962) y Uribe *et al.* (2008), suplementado con bacto agar (Becton, Dickinson and Company) (7 g L/L) sacarosa (30 g L⁻¹), 20 mg L⁻¹ de gentamicina, Macronutrientes (25 mL/L), Micronutrientes (10 mL/L), Cloruro de Calcio (10 mL/L), Yoduro de Potasio (10 mL/L), Sulfato de Hierro (10 mL/L), Vitamina Gambort (10 mL/L), Cisteína (10 mL/L), el PH ajustado a 5.7 con NaOH a una concentración 0.1 N. El medio fue químicamente esterilizado con vitrofural al 0.118 g L⁻¹, en la cámara de flujo laminar.

Fases de la propagación in vitro

Establecimiento aséptico del cultivo.

Las plántulas de dos meses fueron fumigadas dos veces por semana con una mezcla de Vitavax y Benlate a la concentración de 1 g/L para asegurar una mayor sanidad de los materiales, los explantes se colectaron en solución de ácido ascórbico 150 mg/L, seccionado de brotes a 3 cm. de longitud, fueron lavados en agua destilada (2-3 veces), y luego sumergidos en agua destilada por 10 minutos a objeto de bajar el contenido endógeno de fenoles, inmediatamente se sumergieron en bicloruro de mercurio a concentración de 0,25% más dos gotas de Tween 80 durante cinco minutos en la zaranda orbital marca: Vwr Modelo: Incubating Orbital Shaker Serie: 100928002, se suministraron tres enjuagues de agua destilada estéril. En la cabina de flujo Bioseguridad marca: Labconco, Modelo: 3450001, Serie: 1008293010, se procedió según tratamientos; (T1) 1% de Povidyn por 5 min+ 10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl₂ por 5 min, (T2) 1% de Povidyn por 10 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 10 min +0.5% HgCl₂ por 5 min, (T3) 10 % de Povidyn por 15 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 15 min +0.5% HgCl₂ por 5 min (T4) 10% de Povidyn por 20 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl₂ por 5 min, (T5) 1% Povidyn por 15 min +12% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl₂ por 5 min y (T6) 1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl₂ por 5 min, con tres enjuagues de agua destilada estéril, los explantes fueron sembrados en tubos de ensayo con 15 mL de medio de cultivo e incubados a 25° C ± 1° C durante 30 días. (Figura 2,3, 4,5 y 6 .Anexo)

Fase de multiplicación. Los explantes establecidos en la etapa anterior libres de agentes contaminantes de entre 2 cm de longitud, fueron transferidos a un medio de cultivo MS de multiplicación, con bencilaminopurina (BAP) (1.5, 2.5 y 3 mg L⁻¹) y ácido indolbutírico (AIB) (0.5 y 1 mg L⁻¹), siguiendo el método descrito por Gupta *et al.* (1980) y Carranza *et al.* (2012). Se efectuaron tres siembras a intervalos constantes de 30 días. (Figura 7,8 y 10. Anexo).

Fase de enraizamiento. Se seleccionaron brotes de 3 cm de longitud de la fase de multiplicación, se ubicaron en el medio de cultivo MS con AIB a concentraciones de 1; 1.5; 2 y 2.5 mg L⁻¹. Los explantes fueron evaluados a los 30 días de su establecimiento. En la tabla 1, se muestran los tratamientos y las variables evaluadas en las distintas fases de la propagación *in vitro* de las especies de *Myroxylon balsamum* (bálsamo), *Tabebuia crhysantha* (guayacán) y *Tabebuia billbergii*, (madero negro). Siguiendo el método descrito por (Carranza *et al.* 2012)

Incubación y fotoperíodo de vitroplantas. La incubación en las tres etapas se efectuó en el área de crecimiento de cultivo con intensidad lumínica de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un fotoperíodo de 16 h y temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

Diseño experimental y análisis estadístico Para analizar las condiciones del ensayo en la fase de establecimiento, se empleó un Diseño Completo al Azar (DCA) con arreglo factorial (2x3) (Tabla 1) con seis tratamientos, cuatro repeticiones. En la fase de multiplicación, se aplicó un DCA con arreglo factorial (3x2) (Tabla 2), con seis tratamientos, cuatro repeticiones. La fase de enraizamiento, se evaluó mediante un DCA con cuatro tratamientos, cuatro repeticiones. Se utilizaron cinco unidades experimentales en cada fase.

Los datos de cada una de las variables se sometieron a un análisis de varianza ANDEVA y separación de medias al 95% de probabilidad, empleando el programa estadístico MSTAT-C (Michigan State University 1983). Para establecer diferencias estadísticas entre tratamientos se efectuó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey ($p < 0.05$). Los datos con valores cero fueron transformados con la siguiente fórmula: $\sqrt{(x+0.5)}$.

Tabla 1. Tratamientos y variables evaluadas en las distintas fases de la propagación *in vitro* de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) *Tabebuia crhysantha* (guayacán) y *Tabebuia billbergii*, (madero negro).

Fases de la propagación <i>in vitro</i>	Variables analizadas por fase
Establecimiento	
T1 1% de Povidyn por 5 min+ 10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.	Contaminación hongos
T2 1% de Povidyn por 10 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 10 min +0.5% HgCl2 por 5 min	Contaminación bacterias
T3 10 % de Povidyn por 15 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 15 min +0.5% HgCl2 por 5 min.	Número de explantes quemados (necrosis)
T4 10% de Povidyn por 20 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.	Porcentaje de explantes vivos
T5 1% Povidyn por 15 min +12% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.	Número de brotes
T6 1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.	Longitud de brotes
Multiplicación	
T1 1 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 AIB	Contaminación hongos
T2 1 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 AIB	Contaminación bacterias
T3 2 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 AIB	Porcentaje de brotes
T4 2 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 AIB	Número de brotes
T5 3 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 AIB	Longitud de brote mayor
T6 3 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 AIB	
Enraizamiento	
T1 1 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 ANA	Contaminación hongos

T2 1 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA	Contaminación bacterias
T3 2 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 ANA	Porcentaje de explantes vivos
T4 2 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA	Longitud de raíces

Resultados y discusión

Fase de establecimiento

La contaminación por bacterias, número de brotes y longitud de brotes (tratamientos T3, T6 y T5) no mostraron diferencia ($p < 0.05$). En los explantes contaminados por hongos, quemados y vivos (%), se observan diferencias notables ($p < 0.05$), obteniendo los promedios más altos en los tratamientos T2, T5 y T6. Al aplicar 1% Povidyn por 20 minutos +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 minutos +0.5% HgCl₂ por 5 minutos (T6), no se observó diferencias, alcanzando un 90%, 87% y 88% de explantes vivos, libres de contaminación por hongos y bacterias a los 30 días de evaluación en las tres especies (Tabla 2a, 2b, y 2c). Los resultados obtenidos en esta fase en *Cordia alliodora*, utilizando hipoclorito de sodio al 2,5% durante 2 minutos, proporcionó una menor tasa de contaminación; pero, provocó un aumento considerable del número de explantes que se pierden por fenolización y necrosis, lo que demuestra el efecto dañino que tienen estos desinfectantes sobre los tejidos vegetales (Indacochea 2013). Al respecto, varios autores reportan que el uso de hipoclorito de sodio durante 15 a 20 minutos reduce la contaminación (Romano *et al.* 2000), pero en ocasiones puede provocar la necrosis de los tejidos que en ocasiones conduce a la muerte del explante (Sotolongo 2003), (García y Cazorla 2000), pero en otras especies ha resultado negativo, pues inhibe el crecimiento y provoca la muerte del explante (Camargo y Pascual 1999). Pérez *et al.* (2012) aplicaron hipoclorito de sodio al 10% durante 10 min en explantes de caoba, logrando reducir la contaminación hasta un 14%. En cambio (Carranza *et al.* 2012) empleo 15 g de hipoclorito de calcio durante 20 minutos, alcanzando un 95% de explantes vivos, libres de contaminación por hongos y bacterias. Aunque los problemas en el establecimiento in vitro de especies leñosas, se debe en gran medida a la contaminación microbiana de los explantes provenientes del invernadero, criterio que coincido con (Carranza *et al.* 2012), los resultados obtenidos sugieren que la contaminación presente en el material vegetal de las especies *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhyantha* y *Tabebuia billbergii*, puede ser impedido mediante la desinfección con 1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl₂ por 5 min, por la adición de éste al medio de cultivo.

Tabla 2a. Establecimiento aséptico de segmentos nodales para el cultivo in vitro de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo).

Variables	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1% de Povidyn por 5 min+ 10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.	1% de Povidyn por 10 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 10 min +0.5% HgCl2 por 5 min	10 % de Povidyn por 15 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 15 min +0.5% HgCl2 por 5 min	10% de Povidyn por 20 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min	1% Povidyn por 15 min +12% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.	1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.
Número de bacterias	0.30 a	0.25 a	0.40 a	0.35 a	0.19 a	0.00 a
Número de hongos	0.30 b	0.70 a	0.25 b	0.15 bc	0.10 bc	0.00 c
N°.explantos quemados	0.05 b	0.00 b	0.10 ab	0.05 ab	0.20 a	0.00 b
Explantos vivos (%)	35.00 bc	5.00 c	25.00 bc	35.00 bc	55.00 ab	90.00 a
Número de brotes	0.60 a	0.05 b	0.25 ab	0.40 ab	0.55 a	0.65 a
Longitud de brotes (cm)	0.53 a	0.13 a	0.20 a	0.63 a	0.75 a	0.63 a
DE*	0.34	0.25	0.31	0.31	0.33	0.19

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, $p>0.05$).

Tabla 2b. Establecimiento aséptico de segmentos nodales para el cultivo in vitro de *Tabebuia crhyssantha* (guayacán).

Variables	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1% de Povidyn por 5 min+ 10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.	1% de Povidyn por 10 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 10 min +0.5% HgCl2 por 5 min	10 % de Povidyn por 15 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 15 min +0.5% HgCl2 por 5 min	10% de Povidyn por 20 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min	1% Povidyn por 15 min +12% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.	1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.
Número de bacterias	0.32 a	0.25 a	0.40 a	0.35 a	0.19 a	0.00 a
Número de hongos	0.32 b	0.70 a	0.25 b	0.15 bc	0.10 bc	0.00 c
N°.explantos quemados	0.05 b	0.00 b	0.10 ab	0.05 ab	0.20 a	0.00 b
Explantos vivos (%)	34.00 bc	5.00 c	3.00 bc	36.00 bc	53.00 ab	87.00 a
Número de brotes	0.63 a	0.06 b	0.24 ab	0.39 ab	0.57 a	0.66 a
Longitud de brotes (cm)	0.54 a	0.14 a	0.21 a	0.64 a	0.73 a	0.63 a
DE*	0.33	0.26	0.32	0.31	0.32	0.19

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, $p>0.05$).

Tabla 2c. Establecimiento aséptico de segmentos nodales para el cultivo in vitro de *Tabebuia billbergii*, (madero negro).

Variables	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1% de Povidyn por 5 min+ 10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.	1% de Povidyn por 10 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 10 min +0.5% HgCl2 por 5 min	10 % de Povidyn por 15 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 15 min +0.5% HgCl2 por 5 min	10% de Povidyn por 20 min +10% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min	1% Povidyn por 15 min +12% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.	1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl2 por 5 min.
Número de bacterias	0.31 a	0.25 a	0.50 a	0.33 a	0.18 a	0.00 a
Número de hongos	0.32 b	0.69 a	0.26 b	0.15 bc	0.10 bc	0.00 c
N°.explantos quemados	0.06 b	0.05 b	0.10 ab	0.05 ab	0.20 a	0.00 b
Explantos vivos (%)	37.00 bc	5.00 c	3.00 bc	32.00 bc	51.00 ab	88.00 a
Número de brotes	0.60 a	0.06 b	0.24 ab	0.37 ab	0.56 a	0.67 a
Longitud de brotes (cm)	0.55 a	0.15 a	0.23 a	0.67 a	0.70 a	0.66 a
DE*	0.32	0.25	0.32	0.33	0.31	0.21

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, $p>0.05$).

Fase de multiplicación

Si bien, no se encontró diferencias ($p<0.05$) entre los tratamientos (Tabla 3a, 3b y 3c), al añadir 2 mg L⁻¹ de BAP en combinación con 1 mg L⁻¹ de AIB, se obtuvo el 80%, 82 y 87% de explantes con brotes de las tres especies en estudio. (T4). Estos resultados son superiores a los obtenidos por (Indacochea 2013) en *Cordia alliodora*, alcanzó una brotación de explante 63.8% y un promedio del número de brotes por explantes de aproximadamente 2.62%, Comúnmente, para especies forestales se utiliza BAP en combinación con auxinas para inducir la multiplicación. Las plantas superiores al poseer una mejor carga hormonal endógena comparada con plantas herbáceas, según (Schmülling 2004) no requieren que se les suministre una elevada carga hormonal para establecerlas y lograr su multiplicación en condiciones in vitro, por ello, el resultado obtenido es favorable para la micropropagación de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) *Tabebuia crhysantha* (guayacán) y *Tabebuia billbergii*, (madero negro), de acuerdo a (Monteuuis *et al.* 1998), (Mantovani *et al.* 2001), lograron con la adición de 1 mg/L y 2 mg/L de BAP favorecer el desarrollo de un mayor porcentaje de brotes (64% y 71%), incrementando también el número de ejes por estaca a dos y tres, respectivamente. Daquinta *et al.* (2001), cuando combinó el BAP (2 mg/L) con AIA (0.02 mg/l), observó el mayor porcentaje de brotación 80% y la mayor producción de ejes por estaca (4.6 ejes por estaca). Además, la concentración de AIA fue incrementada a 0,2 mg/L, la brotación se disminuyó 55%, lo mismo que el número de ejes por estacas (2 ejes), a la vez se incrementó el porcentaje de microestacas que produjeron callos en lugar de brotes 45%. (Millán *et al.* 2007), obtuvieron brotes de las especies *Chlorophora tinctoria L* y *Quercus humboldtii*, alcanzaron 80% de brotes; en esta

etapa se ha comprobado que la concentración ideal de BAP es la de 1mg/L, a concentraciones mayores, se produce un aumento en la producción de brotes, sin embargo, son pocos vigorosos y la formación de callos, es también notable.

Posteriormente, (Castro *et al.* 2002) reportaron que la mayor tasa de multiplicación en *Tectona grandis* LF (teca), se obtuvo cuando los explantes consistentes de meristemas apicales obtenidos de brotes epicórmicos fueron cultivados en un medio MS suplementado con 2,22 mg/L de BAP. Al respecto, (García *et al.* 2011), reportan que al parecer, éste es un comportamiento de determinadas familias como Meliaceae y Boraginaceae, al igual que algunas especies de leguminosas (McCown 2000, Jha *et al.* 2004).

En *C. alliodora*, se realizaron hasta tres subcultivos, la tasa de multiplicación, nunca aumentó y se mantuvo aproximadamente en 2.5 brotes. Aunque, por norma general, en las distintas metodologías de micropropagación, se establece que una vez multiplicado el material, éste debe aumentar la tasa de multiplicación en los subsiguientes subcultivos (Indacochea 2013, Sotolongo *et al.* 2003, Yasodha *et al.* 2005); en otras, el comportamiento resulta ser a la mantención del número de brotes por explante (Maruyama 2006, Pérez *et al.* 2002, Rodríguez *et al.* 2003) e inclusive la pérdida de la respuesta morfogénica con los subcultivos (Ríos *et al.* 2005); las cuales son llamadas por McCrown (2000) y García *et al.* (2011), como recalcitrantes al cultivo in vitro, los resultados en *C. alliodora*, indican que éste, puede ser el caso de esta especie. El efecto inhibitorio en la emisión y elongación de los brotes por aumento en la concentración exógena de hormonas es diferente dependiendo del tipo de hormona a emplear, reducción de los niveles, ya sea de auxina o citoquinina, teniendo efectos distintos sobre el desarrollo de las plántulas in vitro (Sánchez *et al.* 2004). Para inducir la división y elongación celular, es necesario un balance apropiado entre citoquininas y auxinas, en un medio nutritivo, además de las que se encuentran en forma endógena en los explantes in vitro (Cob *et al.* 2010; Martínez y Pacheco 2006). Los resultados encontrados en esta investigación respecto del número de brotes (0.34 a 0.75) concuerdan con lo expresado con (Carranza *et al.* 2012)

En éste estudio, la combinación de BAP y AIB, en una relación 2:1 mg L⁻¹ fue suficiente para conseguir alto porcentaje de brotación y longitud de brotes de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*, resultados que coincido con (Carranza *et al.* 2012) que alcanzó con 2 mg L⁻¹ de BAP en combinación con 1 mg L⁻¹ de AIB, obtuvo el 70% de explantes de caoba.

Tabla 3a. Fase de multiplicación in vitro de segmentos nodales de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo).

Variables	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1 mg L ⁻¹ BAP+ 0.5 mg L-1 AIB	1 mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA	3 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 AIB	3 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 AIB
Número de bacterias	0.34a	0.11a	0.16a	0.04a	0.36 ^a	0.17a
Número de hongos	0.30a	0.51a	0.14a	0.17a	0.44 ^a	0.50a
Explantos vivos (%)	34.00a	33.00a	62.00 a	80.00a	30.00a	40.00a
Número de brotes	0.35a	0.40a	0.65a	0.70a	0.40 ^a	0.45a

Longitud de brotes (cm)	0.08a	0.09a	0.16a	0.09a	0.04a	0.17a
DE*	0.10	0.04	0.05	0.09	0.11	0.02

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, $p>0.05$).

Tabla 3b. Fase de multiplicación in vitro de segmentos nodales de *Tabebuia crhysantha* guayacán.

Variables	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1 mg L-1 BAP+ 0.5 mg L-1 AIB	1 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA	3 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 AIB	3 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 AIB
Número de bacterias	0.36a	0.13a	0.17a	0.05a	0.36a	0.18a
Número de hongos	0.33a	0.53a	0.16a	0.17a	0.44a	0.52a
Explantos vivos (%)	36.00a	34.00a	59.00 a	82.00a	32.00a	43.00a
Número de brotes	0.35a	0.40a	0.65a	0.70a	0.40a	0.47a
Longitud de brotes (cm)	0.08a	0.09a	0.16a	0.09a	0.04a	0.18a
DE*	0.12	0.05	0.06	0.08	0.12	0.03

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, $p>0.05$).

Tabla 3c. Fase de multiplicación in vitro de segmentos nodales de *Tabebuia billbergii*, (madero negro).

Variables	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1 mg L-1 BAP+ 0.5 mg L-1 AIB	1 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA	3 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 AIB	3 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 AIB
Número de bacterias	0.36a	0.13a	0.16a	0.012a	0.30a	0.16a
Número de hongos	0.33a	0.53a	0.15a	0.18a	0.45a	0.52a
Explantos vivos (%)	37.00a	34.00a	61.00 a	87.00a	30.00a	41.00a
Número de brotes	0.35a	0.40a	0.65a	0.70a	0.40a	0.45a
Longitud de brotes (cm)	0.08a	0.09a	0.16a	0.09a	0.04a	0.17a
DE*	0.11	0.05	0.06	0.08	0.10	0.02

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, $p>0.05$).

Fase de enraizamiento

De todos los tratamientos aplicados en la fase de enraizamiento (Tabla 4a, 4b y 4c) ninguno permitió la formación de raíces, sin embargo, con el tratamiento T4: 2 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA se obtuvo un 64%,66% y 68% de explantes vivos en las tres especies, ninguno de los tratamientos ensayados permitió generar raíces a los 30 días de su evaluación. Los resultados

obtenidos en esta investigación coinciden con Carranza *et al.* (2012), que los mejores brotes de la fase de multiplicación se colocaron en medio de cultivo MS/2 con diferentes concentraciones de ANA para facilitar su enraizamiento, ninguno de los tratamientos ensayados permitió generar raíces a los 30 días de su evaluación, aunque el mayor porcentaje de sobrevivencia (65%) se obtuvo al combinar 2 mg L⁻¹ BAP y 1 mg L⁻¹ ANA, para multiplicar *Swietenia macrophylla*, caoba y los informados por (Rathore *et al.* 1993), quienes encontraron que la combinación BA y AIA, (2mg/L y 0.02 mg/L, respectivamente) fue la más eficiente para la multiplicación de teca. Por otra parte Umboh (1988) señaló que la combinación BA y ANA también resultaron eficiente para inducir la multiplicación de teca, aún cuando no informaron sobre la cantidad de ejes o nudos producidos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se demostró la necesidad de una fuente exógena de auxinas para el enraizamiento de los brotes, de forma general, las más usadas en esta fase son el ANA, AIB, AIA (Orellana 1998). Sotolongo *et al.* (2011) y Flores *et al.* (2009), reportan que en especies forestales, el AIB tiene mejor respuesta que los demás reguladores del crecimiento.

Algunas especies de plantas, no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo *et al.* 2004). En muchas especies forestales el enraizamiento puede ocurrir al pasar las plántulas enraizadas a un medio libre de hormonas (Daquinta *et al.* 2001), lo cual puede deberse al contenido endógeno de auxinas que pueden desencadenar la rizogénesis (Pelacho *et al.* 2003, Castillo 2006, Bernal *et al.* 2009), además que se reconoce que esta fase tiene requerimientos nutricionales inferiores a la multiplicación, por lo que, en muchas ocasiones disminuir la concentración del medio de cultivo en esta etapa, favorece el enraizamiento (Gamboa y Abdelnour 2011, González y Vilca 1998). Para *C. alliodora* el mejor medio fue aquel con AIB, no sólo por el porcentaje de enraizamiento, sino también por la morfología de las raíces, lo cual coincide con Schuler *et al.* (2005), Núñez *et al.* (2008), Castro y Sánchez (2010), en los que solo una auxina es usada para el enraizamiento y donde los porcentajes de éste oscilan entre 80-95%. (Millán *et al.* (2011), demostraron en *Cedrela odorata* L, Cedro que el efecto del AIB en concentración de 1mg/L sobre la rizogénesis radica en el aumento del número de meristemoides que se derivan de tejidos del cambium, especialmente de las células parenquimatosas cercanas a la región más externa del floema cerca del anillo del esclerenquima, los cuales se diferencian más tarde alrededor del sexto día en el medio de cultivo. Al igual, que trabajos realizados en el CATIE (Leakey *et al.* 1990, Mesén *et al.* 1992, 1996, Mesén 1993); con varias especies, tales como: *Terminalia oblonga* (Ruiz & Pav.) (0.8% de AIB), *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav) (0.8%-1.6% de AIB) y la especie *Hyeronima alchorneoides* (1.6% de AIB); con la especie *C. iguaguana*, los mejores porcentajes de enraizamientos se obtuvieron cuando se utilizaron dosis al 0.8% (T4) y 1.6% (T5) de AIB. En esta investigación se realizó una combinación de citoquinina BAP y la auxina AIA, siendo la más utilizada en la inducción radical (Collado *et al.* 2004).

Tabla 4a. Fase de enraizamiento in vitro de yemas axilares de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) *Tabebuia crhysantha* (guayacán) y *Tabebuia billbergii*, (madero negro).

Variables	T1	T2	T3	T4
	1 mg L-1 BAP+ 0.5 mg L-1 AIB	1 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA
Número de bacterias	0.04a	0.21b	0.19b	0.20b
Número de hongos	0.05a	0.04a	0.11 ^a	0.00a
Explantes vivos (%)	24.00b	51.00ab	21.00b	64.00a
Número de raíces	0.24a	0.93a	0.24 ^a	0.60a
Longitud de raíces (cm)	0.16a	0.52a	0.11 ^a	0.26a
DE*	0.10	0.17	0.08	0.09

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, $p>0.05$).

Tabla 4b. Fase de enraizamiento in vitro de yemas axilares de *Tabebuia crhysantha* guayacán.

Variables	T1	T2	T3	T4
	1 mg L-1 BAP+ 0.5 mg L-1 AIB	1 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA
Número de bacterias	0.06a	0.22b	0.18b	0.20b
Número de hongos	0.05a	0.05a	0.12 ^a	0.00a
Explantes vivos (%)	27.00b	53.00ab	20.00b	66.00a
Número de raíces	0.25a	0.90a	0.24 ^a	0.61a
Longitud de raíces (cm)	0.15a	0.50a	0.12 ^a	0.26a
DE*	0.10	0.16	0.08	0.08

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, $p>0.05$).

Tabla 4c. Fase de enraizamiento in vitro de yemas axilares de *Tabebuia billbergii*, (madero negro).

Variables	T1	T2	T3	T4
	1 mg L-1 BAP+ 0.5 mg L-1 AIB	1 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 0.5 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP + 1 mg L-1 ANA
Número de bacterias	0.06a	0.22b	0.18b	0.20b
Número de hongos	0.05a	0.05a	0.12 ^a	0.00a
Explantes vivos (%)	27.00b	53.00ab	20.00b	68.00a
Número de raíces	0.25a	0.90a	0.24 ^a	0.61a
Longitud de raíces (cm)	0.15a	0.50a	0.12 ^a	0.26a
DE*	0.10	0.16	0.08	0.08

*DE=Desviación Estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey, $p>0.05$).

Identificación de agentes patógenos

En el proceso de la propagación in vitro de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) *Tabebuia crhysantha* (guayacán) y *Tabebuia billbergii*, (madero negro), las bacterias y hongos fueron las

principales responsables de la contaminación, lo cual parece ser un comportamiento usual para las plantas leñosas, en particular las provenientes de campo, (Abdenour y Muñoz 2005).

La oxidación fenólica, aparece como consecuencia de los cortes durante la preparación de los explantes y de la acción de los desinfectantes sobre el tejido dañado, constituye un serio problema para la supervivencia de meristemos y ápices sobre todo de especies leñosas. Estos compuestos oxidados son altamente reactivos y fitotóxicos (Hu y Wang 1983), lo cual resulta letal para los explantes. Al respecto, muchos autores consideran la fenolización como la segunda causa de merma de material donante en especies leñosas (Nagori *et al.* 2004, García *et al.* 2011), sin embargo en este caso no fue un factor importante en las pérdidas de material proveniente de campo lo que pudiera estar relacionado con la época de colección del explante (Merkle y Nairn 2005) y por la cantidad de compuestos del metabolismo secundario que en material rejuvenecido se encuentran en menor proporción y al uso de ácido ascórbico durante la desinfección, el cual fue suficiente para controlar la oxidación e inhibir la actividad de la polifenoloxidasas y peroxidasas, las cuales se encargan de oxidar los fenoles y transformarlos a quinonas.

En cuanto, al origen del explante, se puede observar que los provenientes de plantas de dos meses de edad (vivero), muestran siempre un mayor porcentaje de establecimiento en comparación con el material proveniente de brotes epicórmicos de árbol plus seleccionado; lo cual, está relacionado con el estado de desarrollo del donante y la edad fisiológica del explante, son de gran influencia en el éxito del cultivo *in vitro* (Lameira 2006;). De esta manera, también la posibilidad de establecer material directamente de campo es más baja, porque al estar expuestos los donantes a las condiciones ambientales, tienen una mayor presencia de contaminantes difíciles de eliminar durante los procesos de desinfección, (Sotolongo 2000), no es posible aplicar tratamientos fitosanitarios previos y no contarse con plantas cultivadas bajo condiciones controladas como comúnmente se reporta en otros trabajos de este tipo. Las bacterias y hongos fueron las principales responsables de la contaminación, lo cual parece ser un comportamiento usual para las plantas leñosas, en particular las provenientes de campo, (Abdenour y Muñoz., 2005). Sin embargo, es importante tener en cuenta, la zona de tejido que se utiliza para iniciar el cultivo *in vitro*, porque tiene gran influencia en la eficiencia de la desinfección. Los explantes tomados de plantas en crecimiento son más fáciles de desinfectar que los explantes de plantas adultas, donde la desinfección se hace muy difícil), resultados que coincido con Carranza *et al.* (2012) en el proceso de la propagación *in vitro* de caoba se evidenció la presencia de diversos hongos filamentosos, así como bacterias en los diferentes tratamientos. La clasificación y detección se realizó a nivel de género en el caso de hongos, de acuerdo a claves taxonómicas (Barnett y Hunter 1972). Uno de los hongos encontrados en el cultivo *in vitro* de caoba pertenece al género *Curvularia*. Estos resultados coinciden con los descritos por Acosta *et al.* (2002) quien encontró varios géneros de hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de árboles leñosos, incluido *Curvularia*. A pesar de que se han implementado protocolos para propagar un gran número de especies forestales por cultivo *in vitro*, la contaminación fúngica y bacteriana de los explantes constituye uno de los problemas que limita su aplicación (Acosta *et al.* 2009, y Alvarado 1998). Los principales microorganismos contaminantes del cultivo *in vitro* son los hongos filamentosos, las levaduras y las bacterias, los cuales habitan comúnmente plantas *in vivo*, pero tienen efectos devastadores en el cultivo *in vitro* (George 1993, Leifert *et al.* 1994, Leifert y Cassells 2001). En Anexo, se muestran los resultados de la propagación *in vitro* de las tres especies en estudio, desde la Selección, desinfección de los segmentos nodales hasta su multiplicación y enraizamiento.

Conclusiones

En la fase de establecimiento in vitro de explantes de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) *Tabebuia crhysantha* (guayacán) y *Tabebuia billbergii*, (madero negro), se demuestra que la aplicación de 1% Povidyn por 20 min +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 min +0.5% HgCl₂ por 5 minutos, permite reducir significativamente la contaminación de los explantes por microorganismos.

En la fase multiplicación in vitro *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) *Tabebuia crhysantha* (guayacán) y *Tabebuia billbergii*, (madero negro), se logra a partir de segmentos nodales de plántulas de tres meses de edad en vivero, con un balance hormonal medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de AIB, permitió generar el 80%, de brotes.

El enraizamiento de brotes de *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*, en dosis combinadas de BAP/AIB y BAP/ANA, no presentó efecto alguno. La ausencia de raíces de las dos especies, puede estar asociada a las bajas dosis. Sin embargo para la especie *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) si presentó efecto alguno y presencia raíces. Siendo necesario, evaluar concentraciones de BAP, ANA y AIA superiores a 2 mg L⁻¹. Para las dos especies en mención.

Todas las etapas evaluadas durante esta experiencia permitieron alcanzar el objetivo deseado, con porcentajes de éxito comparables o superiores a los mostrados en otros estudios reportados. Sin embargo, es opinión de los autores que dependiendo del material a utilizar, es posible que se requiera hacer algunas modificaciones a este protocolo, sobre todo en lo que respecta a la etapa de establecimiento aséptico, debido a las variaciones en la sanidad de los materiales como resultado de su procedencia y aún más, dependiendo de la época del año en que éstos se colecten para iniciar la micropropagación.

Referencias

- Abdelnour A y Muñoz A (2011) Micropropagación de teca (*Tectonagrandis* L.f). Kurú: Revista Forestal 2(5):1-11.
- Acosta M, Alvarado Y, Caballero I (2002) Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento in vitro de la guayaba (*Psidium guajava* L.). *Biotecnología Vegetal* 2(2): 67-71.
- Alvarado Y (1998) Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas. In Pérez, J. (Ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Santa Clara, CU, Instituto de Biotecnología de las Plantas. p. 81-104.
- Barnett H y Hunter B (1972) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3 ed. Estados Unidos: Burgess Publishing Company.
- Bernal JA, Rojas R y Hine A (2009) Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden: Meliaceae).
- Brack A y Mendiola C (2004) *Ecología del Perú*. PNUD. Asociación Editorial Bruño, Lima, Perú. 495 pp.
- Camargo JT y Pasqual M (1999) Efeito do escuro e do seccionamento de internódios do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido, na calogênese in vitro *Revista Brasileira de Agrociência* 5:81-83.
- Carranza Patiño H, Reyes Morán W, Mora Silva W, Cevallos Falquez O, Escobar Troya E, Cadme Arévalo M, Nieto Rodríguez J, Morante Carriel J (2012) Propagación clonal in vitro de

Swietenia macrophylla King (CAOBA).

Castillo G (2006) Propagación in vitro de papa Ratona.

Castro RD y Sánchez RGA (2010) Propagación Clonal in vitro de *Eucalyptus pellita* F. Muell a partir de árboles plus. *Temas Agrarios* 15:(1): 34 – 43.

Cob J, Sabja A, Ríos D, Lara A, Donoso P, Arias L, Escobar B (2010) Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación in vitro de *Persea lingue* en la zona Centro-Sur de Chile. *Bosque* 31(3): 202-208.

Collado R, Barbón D, Agramonte F, Jimenez M, Pérez G, Odalys D, Ramírez D (2004) Establecimiento in vitro de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King, Universidad Central “Marta Abreu”, Cuba. *Biocología Vegetal* 4(3): 143-146.

Daquinta M, Ramos L, Capote I, Lescano Y, Rodríguez R, Trina D, Escalona M (2001) Micropropagación de la teca (*Tectonagrandis* L. F). *Revista Forestal Centroamericana* 35:23-28.

Delgado MF, Cuba M, Hechenleitner P, Thiers O (2008) Propagación vegetativa de taique (*Desfontainia spinosa*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*) con fines ornamentales. *Bosque* 29(2): 120-126.

Flores CM, Cabañas A, Peñalosa I, Quintanar R, Vázquez J, Urzúa M (2009) Auxinas endógenas, AIA-Oxidasa y enraizamiento en *Vigna radiata* L. Wilczek inducido por auxina exógena libre y conjugada. *Revista Fitotecnia* 32(1): 61-66.

Flores M, Jiménez V, Chacon R (2009) Cultivo de tejidos en *Ficus carica* con miniestacas, *Revista Forestal Agronomía Mesoamericana* 20(2): 319 - 325.

Gamboa JP y Abdelnour A (2011) Micropropagación de melina (*Gmelina arborea* ROXB). *Agronomía Costarricense* 23:69-76.

García GR, Delgado M, González Y, González A, Garriga M, Caligari PD, Quiroz K (2011) In vitro propagation of cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots *Chilean Journal of Agricultural Research* 71(3):376-382.

George EF (1993) *Plant propagation by tissue culture*, 2 ed. p. 130-143.

González C y Vilca J (1998) Micropropagación vegetativa “in vitro” de aliso (*Alnus acuminata*). *Red Andina de Semillas Forestales (RADEFORCOSUDE)*. Cajamarca, Perú. 41 p.

Gupta P, Nadgir A, Mascarenhas A, Fagannathan V (1980) Tissue culture of foresta trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Science Letters* 17:259-268.

Hu CY y Wang PJ (1983) Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures. En: Evans D. F., W. R. Sharp, P. V. Ammirato y Y. Yamada (eds.). *Basic Techniques of Plant Cell Culture*. Vol. 1. *Techniques for Propagation and Breeding*: 177-227.

Indacochea B (2013) Conservación y propagación de árboles superiores de *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav). Oken, en la Microrregión Sur de Manabí,

INRENA (2002) Manual divulgativo de las especies forestales de la Reserva de Biosfera del Noroeste. Tumbes - Perú.

Lameira P (2006) In vitro propagation of *Cordia verbenacea* L.(Borraginaceae). *Revista Brasileña Plantas*.

- Leakey RRB, Mesén F, Tehoundjeu Z, Longman KA, Dick JMcP, McP J, Newton A, Matin A, Grace J, Munro RC, Mutoka PN (1990) Low-technology techniques for the vegetative propagation.
- Leifer C and Cassells A (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures in vitro. *Cell Dev. Biol. Plant* 37(2):133-138.
- Leifert C, Morris C, Waites W (1994) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue cultura and field grown plants: reason for contamination problems in vitro. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13:139-183.
- Mantovani NC, Henz ET, Vestena FS (2001) In vitro regeneration of Louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). *For. Sci.* 11: 93-101.
- Limongi R (2012) Catálogo del banco de germoplasma de bálsamo. Programa Nacional de Forestería. Estac. Experimental Litoral Sur, INIAP. 8. 8.
- Maruyama E (2006) TISSUE culture of *Swieteniamacrophylla* King (Big-Leaf Mahogany). (En) Suzuki, K., K. Ishii, S. Sakurai, and S. Sasaki (Eds) *Plantation technology in tropical forest sciencie*. Springer-Verlag, Tokio, Japa. P. 131-136.
- McCown BH (2000) Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 36(3):149-154.
- Merkle S and Nairn J (2005) Hardwood tree biotechnology. *In Vitro Cell Developmetal Biology Plant.* 41:602-619.
- Mesén F, Leakey RRB, Newton AC (1992) Hacia el desarrollo de técnicas de silvicultura clonal para el pequeño finquero. *El Chasqui* 28:6-18.
- Mesén F, Leakey RRB, Newton AC (1996) Propagadores de subirrigación: un sistema simple y económico para la propagación vegetativa de especies forestales. In *Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina. Memorias 1996.* 1996. (Ed. Salazar. R.). Managua, Nicaragua, 1995. pp. 101-110.
- MICHIGAN State University (1989) MSTAT-C. A software program for the design, management, and analysis of agronomic research experiments. Russell, D.F. (Director MSTAT). Michigan State University, Department of Crop and Soil Sciences and Department of Agricultural Economic, East Lansing, Michigan, USA.
- Millán L, Corredoira E, San José ME (2011) In vitro rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings. *International Journal of Tropical Biology* 59(1):447-453.
- Millán L y Ballester A (2007) Micropropagación de *Chlorofora tictoria* (L) Gaudichaud y *Quercus Humboldt* Bonpl. *Revista Real Academia Galega de Ciencias. Volumen: 2007.* XXVL. Pags. 17-28.
- MINISTERIO DE TURISMO (2014) El Guayacán, el árbol que despierta a la vida 2014. Disponible en <http://www.turismo.gob.ec/el-guayacan-el-arbol-que-despierta-a-la-vida/> [18-05- 2016]
- Monteuuis O, Bon MC, Goh DKS (1998) Teak propagation By in vitro culture. *Bois et Forests des Tropiques: 1998.* 256:1-11.
- Murashige TF, Skoog F (1962) A revised médium for rapid growth and biossays of tobacco

cultures. *Physiological Plantarum* 15: 473-497.

Nogori R y Purohit SD (2004) In vitro plant regeneration in *Annonasquamosa* L. through direct shoot but differentiation on hypocotyls segments. *Science Horticulture* 991: 89-98.

Núñez SN, Mora SA, Santacruz RF (2008) Aplicación de técnicas de micropropagación en las especies *Cordia elaeagnoides* A. DC (Borraginaceae).

Núñez SN (1997) Propagación Vegetativa del Cristobal (*Platymiscium pinnatum* Benth): pilon (*Hieronima alcheorneoides* Allemo) y sura (*Terminalia oblonga* Ruiz & Pavon) mediante el enraizamiento de estacas juveniles. Tesis M. Sc., CATIE, Turrialba. Costa Rica. 150 p.

Orellana M (1998) Desarrollo de un sistema de cultivo In vitro para los explantes nodales de Caoba (*Swietenia macrophylla* King). Tesis Mag.Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 85 p.

Pelacho AA, Glosas LM, Cueva RB, Sanfeliu JL, Badia JS, Alins GV (2014) Aplicaciones del cultivo in vitro 2003. Disponible en: www.etsea2.udl.es/invitro [20 -04-2014]

Pérez J, Mesén F, Aguilar M, Hilje L (2002) Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. optimización de la fase de multiplicación. *Revista Forestal Centroamericana* 38:67-71.

Rathore IS, Singh RP, Skekhawat NS (1993) Clonal propagation of desert teak (*Tectona undulata*) through tissue culture. *Plant Science Limerich* 79:217-222.

Rebolledo V, Aparicio R, Cruz A (2006) Estudio preliminar para la propagación in vitro de dos especies de pinos. *Foresta Veracruzana* 8 (2): 27-32.

Rebolledo V, Aparicio R, Cruz A (2006) Estudio preliminar para la propagación in vitro de dos especies de pinos. *Foresta Veracruzana* 8 (2):19-22.

Ríos D, Avilés F, Sánchez – Olante M, Escobar R, Pereira G (2005) Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de microtallos de castaño (*Castanea sativa* Mill). *Agricultura Técnica* 65(3):258-264.

Rodríguez González H, Hechevarría Sosa I, Rodríguez Ferradá CA, Rivera Amitas MM (2003) Propagación in vitro de *Artemisia absinthium* L. en Cuba. *Rev. Cubana Plant. Med.* v.2003 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2003.[fecha de consulta: 20 de noviembre 2014 Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962003000100003&script=sci_arttext . ISSN 1028-4796

Romano A, Barros S, Martins MA (2000) Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68:35-41.

Sánchez M, Ríos D, Pedraza M, Pereira G, Castellanos H, Escobar R (2004) Propagación in vitro de *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst) a partir de embriones aislados, *Revista Forestal, Bosque* 25 (1): 123-128.

Schmülling T (2004) CYTOKININ. En Schmülling T., In *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Berlin: Eds. Lennarz, W., Lane, M.D.

Schuler I, Baquero S, Gaona D, Vega E, Ramirez R, Nieto V, Hodson E (2005) Propagación in vitro del material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav) Oken (Nogal cafetero). *Revista Colombiana de Biotecnología* 7(1): 39-50.

Sotolongo SR (2003) Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae) *Revista del Jardín*

Botánico Nacional 24(1-2).

Sotolongo SR (2000) Micropropagación de *Psidium salutare* (HBK) Berg. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Forestales. Universidad del Pinar del Río. Cuba.

Sotolongo SR, Geada LG, Cobas LM (2011) Fomento Forestal. (Ed) Félix Varela. Ciudad de la Habana, Cuba. 287 p.

Umboh MIJ (1988). The application of tissue culture techniques in economically important tropical trees. *Biotrop Spec. Publ.* 35:77-86

Uribe M, Delaveau C, Garcés R, Escobar E (2008) Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento in vitro de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque* 29 (1): 5864.

Valverde L, Dufour M, Villalobos V (1998) In vitro organogénesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabácea, meliácea). *Rev. Trop.* 46(2): 225-228.

Yasodha R, Sumathi R. Gurumurthi K (2005) Improved micropropagation methods for teak. *Journal of Tropical Forest Science* 17:63-75.

Tema 10

Aclimatación de plantas *in vitro* de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*

Blanca Indacochea G, Johann Parrales V, Carlos Castro P, Máximo Vera T

“El ignorante afirma, el sabio duda y reflexiona”

Aristóteles

Resumen

Plantas obtenidas mediante micropropagación de las especies: *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*, que medían de 5 a 10 cm. de longitud y poseían como mínimo 3 raíces, se colocaron en bolsas como sustrato una mezcla de 40% de arena de río 40% de abono orgánico y 20% viruta de madera (aserrín) descompuesta y fueron ubicadas en un vivero que proporcionaba 70 % de sombra. El riego fue por aspersión durante 15 días, se fertilizaron con abono (10-20-30) a los 25 días de iniciada la aclimatación y se realizaron aspersiones con oxiclورو de cobre 0.3 g L-1 cada 7 días. A los tres meses de haber sido trasplantadas a suelo, las plantas alcanzaron aproximadamente 20 cm de longitud y se consideraron preparadas para plantación. Los porcentajes de adaptación logrados fueron: *Myroxylon balsamum* 65%, *Tabebuia crhysantha* 80% y *Tabebuia billbergii* 70%.

Palabras claves: *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha*, *Tabebuia billbergii*, aclimatación, micropropagación, cultivo de tejidos.

Summary

Acclimatization of plants obtained *in vitro* from *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* and *Tabebuia billbergii*

Plants obtained by micropropagation of the species: *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* and *Tabebuia billbergii*, that measured from 5 to 10 cm. in length and had as a minimum, three roots, where placed in bags as substrate with a mix of 40% of river sand, 40% of organic fertilizer and 20% of decomposed wood chips (sawdust) and were placed in a nursery that provided 70% of shadow. The irrigation was by spraying for 15 days. Later they were fertilized with fertilizer (10-20-30) 25 days after acclimatization began and spraying with copper oxychloride 0.3 g L-1 every 7 days were carried out. Three months after being transplanted to the soil, the plants reached approximately 20 cm in length and were considered ready for planting. The percentages of adaptation achieved were: *Myroxylon balsamum* 65%, *Tabebuia crhysantha* 80% and *Tabebuia billbergii* 70%.

Key words: *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha*, *Tabebuia billbergii*, acclimatization, micropropagation, tissue culture.

Introducción

El cantón Jipijapa y la zona sur de Manabí, Ecuador tiene una gran variedad de especies maderables, se cuenta aún con bosques primarios, zonas de reserva y a pesar de eso el hombre no ha respetado la naturaleza, deforestando en forma indiscriminada los bosques para hacer uso de este recurso en la elaboración de artesanías, muebles y en gran escala la mayor parte de esta madera es llevada a Guayaquil y Manta para la exportación.

La especie *Tabebuia Chrysantha*, es un árbol originario de la zona intertropical de América. Es común en toda la geografía ecuatoriana en el rango altitudinal de 200 a 1200 m.s.n.m., es decir, crece preferiblemente en regiones cálidas. Loja, en su cantón Zapotillo, parroquias Mangahurco, Bolaspamba y Cazaderos, se encuentra el bosque de Guayacán más vistoso debido a que alberga 40.000 hectáreas de la especie. La floración en el cantón Zapotillo ocurre entre los meses de diciembre y enero, en esta etapa es común observar una alfombra de flores amarillas cubriendo el suelo del bosque (Ministerio de Turismo, 2014).

La especie *Tabebuia billbergii* (Bureau & K. Scum.) Standl., es un árbol caducifolio, de tamaño mediano que alcanza hasta 14 metros de altura. Se distribuye en los valles secos de 0 a 500 msnm. Su madera dura y pesada es cotizada en Ecuador para artesanía y carpintería, por el contraste en el color entre la albura clara y el duramen muy oscuro. En el Perú su madera es usada para fabricación de parquet y en construcciones rurales. Sus hojas sirven como forraje (INRENA 2002). *T. billbergii* es una especie representativa del bosque estacionalmente seco (BES), un ecosistema muy frágil que se extiende desde la península de Santa Elena, en el sur del Ecuador, hasta el noroeste del Perú, comprendiendo la costa de las regiones Tumbes, Piura, Lambayeque y el norte de La Libertad así como el piso inferior del valle del Marañón; estas dos áreas se comunican a través del Paso de Porculla, una depresión de 2100 m de elevación, considerada la más baja de los Andes peruanos (Brack y Mendiola 2004).

La especie *Myroxylon balsamum*, es un árbol originario de América tropical, se encuentra distribuido en forma natural en América del sur; su presencia se ha registrado en Bolivia, Brasil, Ecuador, Paraguay, Perú, Venezuela, Guyana y el noroeste de Argentina, en el Ecuador se encuentra en las provincias de: Esmeraldas, sector de San Mateo a 45 msnm; Manabí, sector La Isla de Jama, La Unión de San Vicente a 226 msnm, Jardín Botánico de la UTM en Portoviejo a 42 msnm, El Chontal de Pedro Pablo Gómez desde 484 hasta 588 msnm, Cantagallo de Puerto Cayo a 45 msnm, comuna Agua Blanca de Machalilla en Puerto López, Mirador San Antonio de Jipijapa a 279 msnm, Choconcha de Jipijapa y Las Coronas de Charapotó desde 244 a 339 msnm; Guayas, sector Las Minas 57 msnm, El Aguacate Petrillo a 103 msnm y Casas Viejas Chungón desde 317 a 360 msnm; Santa Elena, cantones Santa Elena y La Libertad a 60 msnm; Los Ríos, Finca La Represa de la UTEQ a 90 msnm; Loja, sectores Cofrana Cotacocha entre 1621 a 1631 msnm y Colanga entre 1487 a 1617 msnm, Napo, comunidad de Campococha desde 380 a 557 msnm. El Jardín Botánico de Missouri reporta la presencia del género en las provincias de Sucumbíos y El Oro. (Limongi 2012). En Ecuador es una de las especies maderables nativas amenazadas ante la acelerada deforestación que se registra en la ecoregión del bosque seco del Litoral ecuatoriano.

Una de las estrategias para superar las dificultades de propagación y evitar la extinción de especies valiosas, es el cultivo in vitro de tejido vegetal (Delgado *et al.* 2008). Esta técnica permite obtener plantas a partir de un fragmento pequeño de tejido cultivado en condiciones

estériles (Murashige y Skoog 1962). La propagación in vitro vía organogénesis directa incrementa de forma rápida el número de individuos, etapa importante en la producción de plántulas a nivel industrial y un banco de germoplasma con fines de rescate (Uribe *et al.* 2008). Además, permite obtener plantas libres de enfermedades, en algunas ocasiones reduce el tiempo de propagación (Rebolledo *et al.* 2006). Debido a las dificultades de propagación sexual de *Myroxylon balsamum*, (bálsamo) *Tabebuia crhyantha* (guayacán), *Tabebuia billbergii*, (madero negro) y escasa información disponible de propagación in vitro (Valverde *et al.* 1998, Collado *et al.* 2004. Pérez *et al.* (2008), propuso desarrollar alternativas tecnológicas para la propagación de plantas forestales nativas amenazadas en la zona sur de Manabí y definir los medios de cultivos y protocolos de desinfección más adecuados para la reproducción in vitro de las especies nativas amenazadas que facilite el establecimiento y multiplicación de plantas de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhyantha* y *Tabebuia billbergii*, mediante la aplicación de técnicas de cultivo in vitro, vía organogénesis directa con fines de recuperación

Materiales y métodos

De las plantas obtenidas in vitro de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhyantha* y *Tabebuia billbergii* de 6 - 7 centímetros de altura, que poseían como promedio 3 raíces y que la raíz mayor medía entre 5 - 7 cm de longitud aproximadamente. Se extrajeron de los tubos de cultivo para evaluar su supervivencia y se colocaron en una solución en vitavax a 1g L⁻¹, eliminando completamente el agar para evitar la aparición de hongos y su deshidratación en el proceso de cambio de sustrato, posteriormente se trasplantaron a una bolsa de polietileno negro de 4 x 9 cm; que contenían sustrato 40% de arena de río 40% de abono orgánico y 20% viruta de madera (aserrín). Se trasplantaron 20 plantas de cada especie, las plántulas se ubicaron en un sitio que proporcionaba un 70 % de sombra en vivero. El riego se aplicó con un aspersor durante 20 días dos veces al día a partir de los cuales se fue reduciendo paulatinamente hasta los 40 días en que se sacaron las plantas del vivero, regándolas a partir de ese momento una vez al día durante otros 20 días. Se aplicó fertilizante de fórmula completa abono (10-20-30) a los 25 días de iniciada la aclimatación, a razón de 4 gL⁻¹. Se realizaron aspersiones con oxiclورو de cobre 0.3 g L⁻¹, cada siete días por un mes, esto debido a que en esta etapa existe un alto índice de ataque de hongos a los explantes principalmente. Esta metodología es la utilizada en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la UNESUM y es similar a la empleada por González *et al.* (1987) para la aclimatación de *E. saligna*, mediante el empleo de estaquillas. Las variaciones fundamentales están dadas por el porcentaje de sombra y el sustrato utilizado.

Resultados y discusión

Las plantas vigorosas y que medían aproximadamente de 20 a 30 cm. de altura se consideraron establecidas y listas para ser llevadas a plantación (Figura 1), lo que ocurre aproximadamente a los tres meses de iniciado el proceso de aclimatación. Los porcentajes de supervivencia alcanzados para las tres especies de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhyantha* y *Tabebuia billbergii* se muestran en la Tabla 1.

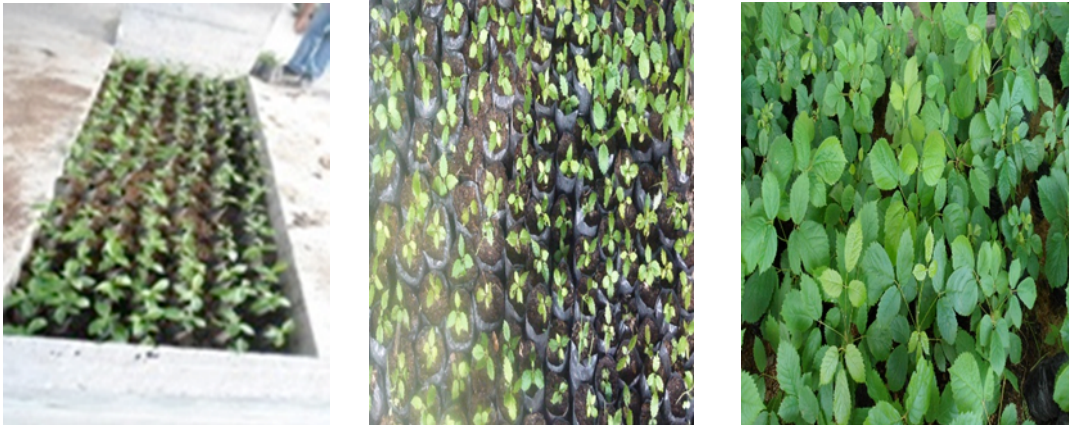


Figura 1. Plantas aclimatadas a) *M. balsamun* b) *T. crhysantha* y c) *T. billbergii*

Tabla 1. Porcentajes de supervivencia logrados para las tres especies de *M. balsamun*, *T. crhysantha* y *T. billbergii*

Especie	Supervivencia (%)
<i>M. balsamun</i>	65
<i>T. crhysantha</i>	80
<i>T. billbergii</i>	70

Fuente: propia

Previo a la fase de aclimatización se observó que las vitroplantas comenzaron a emitir raíces después del sexto día de cultivo *in vitro* en medio sin regulador de crecimiento y al cabo de tres semanas mostraron un buen desarrollo del sistema radical. Igualmente Roy y Sarkar (1991), observaron el desarrollo de raíces en el medio MS sin regulador de crecimiento después de cinco semanas y un sistema radical bien desarrollado después de siete semanas en la micropropagación de *Aloe vera* L.

La supervivencia de las plantas *in vitro*, regeneradas durante el período de adaptación, depende fundamentalmente de las peculiaridades fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas presentan producto del desarrollo *in vitro*, el cual permite una elevada humedad relativa en el interior de los frascos, baja intensidad luminosa, bajo intercambio gaseoso, abundante disponibilidad de nutrientes y carbono (generalmente en forma de sacarosa) y una pequeña variación de temperatura en un rango considerado óptimo para el cultivo (Preece y Sutter 1991, Teixeira *et al.* 1995, Aloísio 1997). El control de la intensidad de la luz en esta fase es también importante ya que las plantas provienen de un ambiente con intensidad baja, por lo tanto ésta se debe regular para evitar la fotoinhibición del aparato fotosintético. Para atenuar el efecto de la luz durante las dos primeras semanas, se emplean mallas plásticas de diferentes porcentajes de sombra, generalmente entre 30-70 % en dependencia de las necesidades de los cultivos (Agramonte *et al.* 1998). Trindade y Paris (1997), lograron entre un 90 y un 95 % de sobrevivencia de plantas *in vitro* de *E. globulus* en la fase de aclimatación

Es muy probable que la capacidad de las vitroplantas de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*, para adaptarse a condiciones *ex vitro* sin mayor inconveniente, se debió a que estas especies poseen un mecanismo fotosintético y al pasar de la condición heterótrofa (*in vitro*) a autótrofa (*ex vitro*) posee mayor resistencia a la pérdida de agua

por excesiva transpiración; lo cual se ha reportado como una de las principales causas de muerte de vitroplantas en esta fase.

Queda demostrado que las vitroplantas de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*, pueden superar la adaptación a condiciones ex vitro, siendo este uno de los objetivos de la fase de aclimatización como es señalado por Agramonte (1998). De acuerdo con lo obtenido por los autores anteriormente citados, los porcentajes de sobrevivencia alcanzados en este trabajo para las tres especies de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii*, son aceptables

Conclusiones

- De los ensayos expuestos anteriormente, se puede concluir que:
- Se aclimataron plantas obtenidas *in vitro* de *M. balsamum*, *T. crhysantha* y *T. billbergii*, donde se alcanzan porcentajes de supervivencia de 65 %, 80% y 70 % respectivamente.
- El sustrato utilizado para el trasplante de planta in vitro a suelo fue el adecuado
- No hay antecedentes del uso de biotécnicas de las especies en estudio, por este motivo conceptuamos que este trabajo puede ser un precedente, teniendo en cuenta que la micropropagación de especies forestales permite contar con un gran número de individuos de características deseables.
- Adaptando las diferentes técnicas de micropropagación a especies arbóreas se contribuye a la conservación de los recursos genéticos forestales, mediante la instalación de bancos de germoplasma, lo que alberga una amplia gama de material genético, brindando oportunidades para estudios científicos y de investigación.

Referencias

- Agramonte D, Jiménez F, Dita M (1998) Aclimatación. p. 193-206. En: Pérez J.(Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1era edición. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba
- Aloísio X (1997) Enraizamiento *in vitro* de gemas de Eucalyptus multiplicadas e alongados. Revista Scientia Forestalis. 51: 29-26 pp.
- Brack A y Mendiola YC (2004) Ecología del Perú. PNUD. Asociación Editorial Bruño, Lima, Perú. 495 pp.
- Collado R, Barbón D, Agramonte F, Jiménez M, Pérez G, Odalys D, Ramírez D (2004) Establecimiento in vitro de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King, Universidad Central “Marta Abreu”, Cuba. Biotecnología Vegetal: 2004. 4(3): 143-146.
- González A, Vera N, Pérez M, Rodríguez E (1987) Obtención de posturas de Eucalyptus saligna Sm. En Topes de Collantes mediante el empleo de estaquillas. Centro Agrícola. XIV (1): 77 – 84.
- INRENA (2002) Manual divulgativo de las especies forestales de la Reserva de Biosfera del Noroeste. Tumbes - Perú.

Limongi R (2012) Catálogo del banco de germoplasma de bálsamo. Programa Nacional de Forestería. Estac Experimental Litoral Sur. INIAP. 8. 8.

MINISTERIO DE TURISMO (2014) El Guayacán, el árbol que despierta a la vida 2014. Disponible en <http://www.turismo.gob.ec/el-guayacan-el-arbol-que-despierta-a-la-vida/> [18-O5-2016]

Murashige T, Skoog F (1962) A revised médium for rapid growth and biossays of tobacco cultures. *Physiological Plantarum* 15: 473-497.

Pérez J, Mesén F, Aguilar M, Hilje L (2002) Desarrollo de un método demicropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. optimización de la fase de multiplicación. *Revista Forestal Centroamericana* 38:67-71.

Preece JE y Sutter EG (1991) Acclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field. In: Debergh P.C., Zimmerman, R.H. *Micropropagation technology and application*. Editorial Dordrech Kluwer Academic Press. pp. 71 – 93.

Roy SC y Sarkar A (1991) *In vitro* regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. *Scientia Horticulturae* 47:107-113.

Teixeira JB, Lemos JI, Coelhe MC (1995) Micropropagação de espécies leñosas da mata atlántica in: Congreso brasileiro de Fisiología Vegetal, 5. Editorial Lavras. Anais. 132 p.

Trindade H y Paris E (1997) *In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. "In Vitro" *Cellular and Developmental Biology Plant* 33 (1): 1 – 5.

Uribe MC, Delaveau M, Garcés R, Escobar R (2008) Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque* 29(1): 5864.

Valverde L, Dufour M, Villalobos V (1998) *In vitro* organogénesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabácea, meliácea). *Rev. Trop.* 46(2): 225-228.

Tema 12

Protocolos de desinfección de explantes durante la micropropagación de *Cedrela odorata* L.

Bertha Azucena Zhindón Ganchozo, Alfredo Jimenez González, Blanca Soledad Indacochea Ganchozo, Marcos Pedro Ramos Rodríguez.

“Si supiera que mañana se acaba el mundo, yo, hoy todavía plantaría un árbol”

Martin Luther King

Resumen

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de las especies vegetales, tanto en la investigación como en la micropropagación comercial. Tal contaminación puede ser producida por microorganismos endofíticos o microorganismos introducidos durante la manipulación de laboratorio. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar tres protocolos de desinfección de explantes para la micropropagación de *Cedrela odorata* L., en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Estatal del Sur de Manabí. La metodología aplicada se basó en el montaje de un diseño experimental en bloque completamente al azar. Se evaluaron tres tratamientos para la desinfección de explantes, obteniéndose con éxito el 95.64% de explantes establecidos en el segundo tratamiento, en el que se utilizó un protocolo de desinfección basado en Etanol al 50% (C₂H₆O), Hipoclorito de Sodio (NaClO) en el 25% de su concentración. Tiempo de inmersión de 60 segundos. Existen diferencias estadísticas altamente significativas en los protocolos utilizados para la desinfección de explantes de *Cedrela odorata*. Sólo un tratamiento, T2, fue el que presentó la mayor eficiencia durante el experimento.

Palabras clave: Propagación, especies amenazadas, madera tropical.

Abstract

Microbial contamination is one of the most serious problems in micropropagation of plant species, both in research and in commercial micropropagation. Such contamination may be produced by endophytic microorganisms or microorganisms introduced during laboratory manipulation. The present work was carried out with the objective of to evaluate a disinfection protocol of explants for the micropropagation of *Cedrela odorata* L., in the plant biotechnology laboratory of the Southern State University of Manabí. The applied methodology was based on the assembly of an experimental design in block completely at random. Three treatments were evaluated for the disinfection of explants, successfully obtaining 95.64% of explants established in the second treatment, in which a disinfection protocol based on 50% Ethanol (C₂H₆O), Sodium Hypochlorite (NaClO) in 25% of its concentration, with a time of immersion of 60 seconds. There are statistically significant differences in the protocols used for the disinfection of *Cedrela odorata* explants. Only one treatment, T2, was the one that presented the highest efficiency during the experiment.

Keywords: propagation, threatened species, tropical timber.

1. Introduccion

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) enumeró a *C. odorata* como una especie que se enfrenta a un alto riesgo de extinción en el medio silvestre a medio plazo (IUCN, 2004). Para fines de reforestación, el Ministerio del Medio Ambiente (MAE) ratifica a *C. odorata* como una de las especies nativas más utilizadas Grijalva *et al.*, (2012). La cedrela figura en el Apéndice III de la lista de especies prioritarias de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2016).

Existen pocas alternativas que permitan recuperar a corto plazo la riqueza genética de *C. odorata*, mencionada entre las especies que se encuentran en alto riesgo de extinción, razón suficiente que motiva la multiplicación por medio de la micropropagación. En las dos últimas décadas las técnicas biotecnológicas han contribuido a la generación de una metodología de cultivo *in vitro*, así como a los avances en los estudios de propagación de *C. odorata* a través de embriogénesis somática (Pérez *et al.*, 2006; García *et al.*, 2011; Muñoz, 2003; Daquinta *et al.*, 2004; Cameron, 2010). Otros autores han estudiado la propagación *in vitro* en *Cedrela fissilis* (Da Costa *et al.*, 2001). Los principales problemas que presenta la propagación *in vitro* del cedro son: contaminación de brotes apicales y segmentos nodales, hiperhidricidad, escasa disponibilidad de explantes, sensibilidad a la desinfección y lenta germinación.

En este sentido, el objetivo general del trabajo consiste en evaluar el uso de protocolos de desinfección de explantes en la micropropagación de *C. odorata* en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad del Sur del Estado de Manabí.

Se coincide con (Roca y Mroginski, 1991), con respecto a la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Otros autores (Cruz *et al.*, 2007) han informado que en la etapa de establecimiento de especies leñosas, el explante inicial constituye la principal fuente de contaminación. En el marco de las observaciones anteriores, surge el problema: ¿Cómo se puede evaluar un protocolo de desinfección de explantes para la micropropagación de *C. odorata*?

Materiales y Métodos

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, ubicada en el km 1 ^{1/2} de la carretera Jipijapa - Noboa entre las coordenadas 17 M 0548196 y UTM 9850644.

Factores en estudio

Factor A: Explantes de *C. odorata*

Factor B: Concentración de los reactivos utilizados en el tratamiento.

Tipo del diseño: Bloque completamente al azar.

Tratamientos: 4

Repeticiones: 3

Los procedimientos utilizados en la fase de establecimiento se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 1. Tratamientos utilizados en la etapa de establecimiento de *C. odorata*.

Tt	HgCl ₂	T (s)	P	T	Alcohol	T (s)	NaClO	T (s)
	Tween							
TT	0%	-	0%	-	0%	-	0%	-
T1	0.50%	180	5%	300	75%	180	50%	180
T2	0.50%	180	5%	300	50%	60	25%	60
T3	0.50%	180	5%	300	25%	300	75%	300

Tt: tratamientos; *TT*: Testigo; *T1*: Tratamiento 1; *T2*: tratamiento 2; *T3*: Tratamiento 3; *HgCl₂*: Mercury bichloride; *T(s)*: Tiempo en segundos; *P*: Povidyn; *NaClO*: Sodium hypochlorite

Diseño experimental

Longitud de los explantes: 3 cm

Explantes por tratamiento: 12 = (1 unidad experimental)

Explantes en total para cada tratamiento: 48

Repeticiones: 3

Total de explantes en la investigación: 144

La tabla que a continuación se presenta muestra cómo se diseñó el ensayo, consistente en los cuatro tratamientos y las tres repeticiones.

Tabla 2. Esquema del diseño experimental llevado a cabo en el proceso de investigación para la fase de establecimiento de *C. odorata*.

	Repeticiones		
	I	II	III
Tratamientos	1	0	3
	0	1	0
	2	3	1
	3	2	2

Obtención de explantes

Los explantes utilizados en esta investigación fueron yemas axilares y capullos apicales de plantas de *C. odorata* de seis meses de edad, seleccionadas de la zona de vivero de los árboles del laboratorio, que recibieron atención cultural apropiada (Lorsban en dosis de 2 ml/l Phyton a 2,5 ml/l), el tratamiento se aplicó dos días a la semana, durante el período de 21 días antes del corte de los explantes.

Recolección de explantes

Para la recolección de explantes se utilizó: frasco con ácido ascórbico; tijeras de disección; plantas seleccionadas; frasco de acero inoxidable con alcohol; frasco de acero inoxidable con agua destilada.

Se inició el corte de las ramas de *C. odorata* eliminando sus hojas, dejando yemas axilares y yemas apicales de 3 cm de largo, segmentados en la parte superior en forma recta y el corte en bisel por la parte inferior, estos explantes fueron sumergidos en una solución de ácido ascórbico a concentración de 1g/l para evitar la oxidación fenólica.

Protocolos de desinfección para explantes utilizados fuera del flujo laminar

Para todos los explantes se utilizó un tratamiento en general, mismo que consistió en:

1. Eliminación del ácido ascórbico producto de la recolección de explantes, realizando un enjuague con agua estéril.
2. Se sumergieron los explantes en bicloruro de mercurio al 0.50 % de concentración más dos gotas de Tween 80 durante 180 s, en la zaranda orbital a 140 rpm.
3. Posteriormente se realizó tres enjuagues con agua estéril para eliminar residuos.
4. Se reservaron los explantes en agua estéril, para posteriormente realizar el respectivo proceso dentro de la cámara del flujo laminar.

Protocolos de desinfección para explantes utilizados dentro del flujo laminar

De acuerdo con los datos presentados en la tabla 3, los tratamientos se aplicaron como sigue:

1. En la cámara de flujo laminar se colocó Povidyn al 5% de su concentración durante 300 s, luego se retiró el líquido realizando seis enjuagues para descartar los desechos.
2. Se aplicó alcohol a diferentes concentraciones y tiempos según tratamientos establecidos.
3. Eliminación de residuos, realizando tres enjuagues con agua estéril, seguido de ello se utilizó el hipoclorito de sodio en concentraciones y tiempos de acuerdo con los tratamientos, realizando tres enjuagues con agua estéril para eliminar residuos.
4. Se dejaron los explantes en ácido ascórbico hasta el momento de su siembra.

Tabla 3. Tratamientos utilizados en explantes de *C. odorata* dentro del flujo laminar del laboratorio de biotecnología de plantas UNESUM.

Tt	P	T(s)	Alcohol	T(s)	NaClO	T(s)
TT	0%	-	0%	-	0%	-
T1	5%	300	75%	180	50%	180
T2	5%	300	50%	60	25%	60
T3	5%	300	25%	300s	75%	300

Tt: Tratamientos; TT: Testigo; T1: Tratamiento 1. T2: Tratamiento 2; T3: Tratamiento 3; P: Povidyn; T(s): Tiempo en segundos

Medios de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó en este ensayo consistió en dosis de sales minerales y vitaminas descritas por Murashige y Skoog (1962). Promover la organogénesis, enriquecida con macronutrientes Nitratos a la mitad de las concentraciones; Los micronutrientes Cloruro de Calcio, Yoduro de Potasio, Sulfato de Hierro, vitamina Gamborg (Gamborg , 2002). Cisteína, Sacarosa y Agar; del mismo modo AIB, se añadió la hormona KIN. El pH se ajustó a 5.7 con Hidróxido de Sodio.

Los medios de cultivo se distribuyeron en tubos de ensayo de 15 mm x 60 mm y se esterilizaron en autoclave durante (900 s), a 120°C, a una presión de 1.5 atm (atmósferas).

Siembra in vitro

En este proceso se utilizaron materiales esterilizados como: tubos de ensayo con medios de cultivo, frasco con alcohol, vaso de Erlenmeyer, vaso de precipitación, cajas petri, pinzas, tijeras, bisturí, papel secante, papel de aluminio, mecheros. Además el personal realizó el ingreso al flujo laminar con ropa quirúrgica desinfectada utilizando guantes y mascarilla.

El proceso fue el siguiente:

1. Los explantes que se reservaron en ácido ascórbico luego del proceso de desinfección, se colocaron en cajas petri para secarlos.
2. Luego con la ayuda de una pinza se colocó el explante en el medio de cultivo procediendo así a la siembra sin seccionar los explantes, es decir que los explantes ya pasaron al flujo laminar para la siembra del tamaño deseado.
3. Se rotularon los tubos de ensayo con los explantes sembrados según el número del tratamiento aplicado pasando luego al área de crecimiento.

Los ensayos fueron evaluados a los siete días tomando en consideración: porcentaje de explantes contaminados (% EC), porcentaje de explantes fenolizados (% EF), porcentaje de explantes establecidos (% EE).

Procedimiento estadístico

Para determinar la variabilidad entre los tratamientos aplicados a los explantes utilizados en la siembra *in vitro* de *C. odorata*, se realizó un análisis de varianza. Asimismo para determinar la significación de las diferencias entre los tratamientos aplicados se utilizó la prueba de Tukey. Estos análisis se realizaron en el software InfoStat, versión 2013 para Windows.

Resultados y Discusión

A continuación se presentan los resultados del análisis de la varianza y de la prueba de Tukey realizada con los datos obtenidos después de siete días de la siembra *in vitro* de *C. odorata* (Tabla 4).

Explantos establecidos

Tabla 4. Datos de análisis de la varianza de los explantes establecidos correspondientes a la evaluación realizada siete días después de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	122.0	3	40.7	162.7	<0.0001
Tratamiento	122.0	3	40.7	162.7	<0.0001
Error	2.0	8	0.2		
Total	124.0	11			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Establecidos	12	0.98	0.98	8.33

FV: Fuentes de Variación; *SC*: Suma de cuadrados; *GL*: Grados de Libertad; *CM*: Cuadrados Medios; *F*: Estadístico F.

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza se puede evidenciar que el coeficiente de variación alcanzado, permite inferior una menor variabilidad con respecto a su media. A diferencia de lo que muestran los CV en el caso de explantes contaminados y fenolizados. Autores como Cruz *et al.*, (2007), han reportado que en la etapa de establecimiento de especies leñosas, el explante inicial constituye la fuente principal de contaminación debido a las características anatómicas específicas de la especie.

Como se muestra en la Tabla 5, la prueba de Tukey evidenció que los tratamientos fueron altamente significativos ($p > 0.05$).

Tabla 5. Prueba de Tukey de explantes establecidos correspondiente a la evaluación realizada 7 días después de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tt	Medias	n	E.E.	
T2	11.3	3	0.3	A
T3	5.3	3	0.3	B
TT	4.3	3	0.3	B
T1	3.0	3	0.3	C

Tt: Tratamientos; *N*: número de tratamientos; *TT*: Testigo; *T1*: Tratamiento 1. *T2*: Tratamiento 2; *T3*: Tratamiento 3.

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$); $DMS = 1.30735$; Error: 0.2500 gl: 8

De acuerdo con los valores mostrados en la tabla anterior, T2 refleja que cuando se utilizó alcohol al 50% con hipoclorito de sodio al 25% en un tiempo de inmersión de 60 s, el mejor resultado se obtuvo en la evaluación a los siete días. Mientras que en el protocolo T1, con una

concentración de 75% de alcohol y 50% de hipoclorito de sodio con 180 s de inmersión, alcanzó una media de 3.00.

Explantos contaminados

Los explantes contaminados en una muestra pueden usarse como indicadores de calidad en experimentos y trabajos de micropropagación. La Tabla 6 muestra los resultados del análisis de varianza realizado sobre propágulos contaminados.

Tabla 6. Datos del análisis de la varianza de los explantes contaminados correspondiente a la evaluación realizada siete días después de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	35.3	3	11.8	28.3	<0.0001
Tratamiento	35.3	3	11.8	28.3	<0.0001
Error	3.3	8	0.4		
Total	38.7	11			

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Contaminados	12	0.91	0.88	19.36

FV: Fuentes de Variación; SC: Suma de cuadrados; GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrados Medios; F: Estadístico F.

En relación con la variable de explantes contaminados el análisis de varianza (Tabla 6) muestra que alcanzó un coeficiente de variación del 19.36%.

La Tabla 7 presenta los resultados de la prueba de Tukey realizada con los valores de los explantes contaminados.

Tabla 7. Prueba de Tukey de explantes contaminados correspondiente a la evaluación realizada siete días después de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tt	Medias	N	E.E.	
TT	5.0	3	0.37	A
T1	4.7	3	0.37	A B
T3	3.0	3	0.37	B
T2	0.7	3	0.37	C

Tt: Tratamientos; TT: Testigo; T1: Tratamiento 1. T2: Tratamiento 2; T3: Tratamiento 3.

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$); DMS = 1.68779; Error: 0.4167 gl: 8

La prueba de Tukey para los explantes contaminados presentada en la tabla anterior muestra que los tratamientos TT, T1, T3 no son significativos ya que el rango de sus medias oscila entre 3.00 y 5.00, sin embargo es evidente que T2 es altamente significativo porque la media alcanzada fue 0.67, lo que explica que el número de explantes contaminados en este tratamiento fue mínimo.

Explantes fenolizados

El análisis de la fenolización de los explantes una semana después de la siembra *in vitro* se presenta en la tabla 8.

Tabla 8. Datos del análisis de la varianza de los explantes fenolizados correspondientes a la evaluación realizada a los siete días de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	32.7	3	10.9	43.6	<0.0001
Tratamiento	32.7	3	10.9	43.6	<0.0001
Error	2.0	8	0.2		
Total	34.7	11			
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Fenolizados	12	0.94	0.92	18.75	

FV: Fuentes de Variación; SC: Suma de cuadrados; GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrados Medios; F: Estadístico F.

Tabla 9. Prueba de Tukey de explantes fenolizados correspondiente a la evaluación realizada siete días después de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tt	Medias	n	E.E.	
T1	4.33	3	0.29	A
T3	3.67	3	0.29	A B
TT	2.67	3	0.29	B
T2	0.00	3	0.29	C

Tt: Tratamientos; TT: Testigo; T1: Tratamiento 1. T2: Tratamiento 2; T3: Tratamiento 3.

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$); DMS = 1,30735; Error: 0,2500 gl: 8.

En relación con los explantes fenolizados, la prueba de Tukey no muestra diferencias significativas entre los tratamientos T1, T3, TT; El rango de la media va de 2.67 a 4.33, por otra parte la media obtenida en el T2 evidencia que éste, es altamente significativo en relación a los otros tratamientos.

Los resultados del análisis de la varianza y el test de Tukey correspondiente a la evaluación del día 14 después de la siembra *in vitro* de *C. odorata* se presentan a continuación.

2.3 Explantes establecidos

En la evaluación realizada a los 14 días de la siembra *in vitro* de *C. odorata*. El coeficiente de variación superó 12 puntos porcentuales, como se indica en la tabla 10.

Tabla 10. Datos de análisis de la varianza de los explantes establecidos correspondientes a la evaluación realizada a los 14 días de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo	168.7	3	56.2	134.9	<0.0001
Tratamiento	168.7	3	56.2	134.9	<0.0001
Error	3.3	8	0.4		
Total	172.0	11			
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Establecidos	12	0.98	0.97	12.91	

FV: Fuentes de Variación; SC: Suma de cuadrados; GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrados Medios; F: Estadístico F.

Tabla 11. Prueba de Tukey aplicada a los datos de explantes establecidos correspondientes a la evaluación realizada a los 14 días de siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tt	Medias	N	E.E.	
T2	11.3	3	0.37	A
T3	4.0	3	0.37	B
TT	3.0	3	0.37	B C
T1	1.7	3	0.37	C

Tt: Tratamientos; TT: Testigo; T1: Tratamiento 1. T2: Tratamiento 2; T3: Tratamiento 3.

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$); DMS = 1,68779; Error: 0.4167 gl: 8.

De acuerdo con la tabla anterior, los resultados de la prueba de Tukey representan que los tratamientos tienen una diferencia altamente significativa evidenciando que el T2 alcanzó una media de 11.33; Esto significa un alto porcentaje de supervivencia en relación con otros tratamientos.

Explantos contaminados

El coeficiente de variación resultante del análisis de explantes contaminados 14 días después de la siembra *in vitro* de *C. odorata* representa 16.84% como se indica en la Tabla 12.

Tabla 12. Datos del análisis de la varianza de explantes contaminados correspondientes a la evaluación realizada a los 14 días de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	46.3	3	15.4	37.1	<0.0001
Tratamiento	46.3	3	15.4	37.1	<0.0001
Error	3.3	8	0.4		
Total	49.7	11			

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Contaminados	12	0.93	0.91	16.84

FV: Fuentes de Variación; SC: Suma de cuadrados; GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrados Medios; F: Estadístico F.

Los resultados de la prueba de Tukey realizada con los datos obtenidos de explantes contaminados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Prueba de Tukey de explantes contaminados correspondiente a la evaluación realizada a los 14 días de siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tt	Medias	N	E.E.	
TT	6.00	3	0.37	A
T1	4.67	3	0.37	A B
T3	4.00	3	0.37	B
T2	0.67	3	0.37	C

Tt: Tratamientos; TT: Testigo; T1: Tratamiento 1. T2: Tratamiento 2; T3: Tratamiento 3.

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$); DMS = 1,68779; Error: 0.4167 gl: 8.

Los resultados de la prueba de Tukey en la tabla anterior indican alta significación, evidenciando que el T3, T1 y el TT alcanzaron una media que está entre 4.00 y 6.00 respectivamente, mientras que el T2 resultó con baja contaminación como lo indica el valor de su media.

En el contexto de observaciones anteriores, George (1996) y Ogita (2005), coinciden en que no todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibitorios o tóxicos, pero en la mayoría de los casos el crecimiento del explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, puede morir.

La contaminación existente se debió a la presencia de microorganismos en los tejidos de los explantes, al testigo no se le aplicó ningún tratamiento, por tanto todos los explantes se contaminaron, otra de las causas fue la deficiencia en el protocolo de desinfección, al parecer la aplicación del tratamiento No. 3 no fue el más adecuado.

En relación con la contaminación microbiana Hernández y González (2010) confirmaron que es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies de plantas en todo el mundo, produce grandes pérdidas de material, tanto en investigación como en micropropagación comercial. Puede tener dos orígenes: a) microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y b) microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio.

Diferentes autores señalan que a menudo es difícil identificar la fuente de contaminación. Como se ha señalado por Leifert y Cassells (2001) y Ramírez y Santos (2000).

se han desarrollado protocolos para reducir la presencia de estos microorganismos contaminantes, que se pueden encontrar en la superficie, dentro del explante o en ambos sitios, siendo la superficie más fácil de quitar.

A diferencia del resto de los tratamientos, la aplicación del protocolo de desinfección aplicado en el tratamiento No. 2, proporcionó un equilibrio óptimo en la concentración tanto de alcohol como de hipoclorito sódico a tiempos de inmersión adecuados. Resultando en 95.64% de explantes establecidos. Otros trabajos publicados, a saber (Jiménez *et al.*, 2007), desinfectados con tres concentraciones más bajas de NaOCl 1.0; 1.5% y 2.0%, combinados con tres tiempos de exposición más elevados (300 s, 600 s y 900 s), alcanzaron un 84% de supervivencia y un 10% de contaminación de los explantes con desinfección durante 600 s por inmersión en NaClO al 1.5%.

La contaminación y la recalcitrancia de tejidos de tallo de Caoba (*Swietenia macrophylla* King) y Cedro español (*Cedrela odorata* L.) son las causas principales de su inefectiva micropropagación (Pérez *et al.*, 2012). Estos autores evaluaron concentraciones y tiempos de desinfección similares a los utilizados en esta investigación, por ejemplo usaron el NaOCl al 15% durante 1 200 s, como un desinfectante de superficie y se añadieron al medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de explantes nodales procedentes de individuos de 10 años de edad, respectivamente, con una reducción de la contaminación en ambas especies.

Explantes fenolizados

En la tabla 14 se muestra la efectividad del resultado, de acuerdo con el coeficiente de variación (CV) obtenido del análisis de la varianza de los explantes fenolizados en la evaluación tomada 14 días después de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tabla 14. Datos del análisis de la varianza de los explantes fenolizados correspondiente a la evaluación realizada a los 14 días de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	51.0	3	17.0	204.0	<0.0001
Tratamiento	51.0	3	17.0	204.0	<0.0001
Error	0.7	8	0.1		
Total	51.7	11			

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Fenolizados	12	0.9	0.9	9.1

FV: Fuentes de Variación; *SC*: Suma de cuadrados; *GL*: Grados de Libertad; *CM*: Cuadrados Medios; *F*: Estadístico F.

La fenolización de los explantes ha sido documentada por Paredes *et al.*, (2007) como la principal causa de mortalidad en un estudio con variantes de medios de cultivo y manejo de explantes en la fase de establecimiento de brotes axilares y apicales de plantas juveniles de *Amburana cearensis* (roble), que no sobrevivió en todos los tratamientos. Se argumenta que las dificultades se debieron al lento crecimiento de esta especie, además de su alta tasa de contaminación y de fenolización de laboratorio. Los resultados de la prueba de Tukey realizada con los datos obtenidos de fenolizados contaminados se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Prueba de Tukey de explantes fenolizados correspondiente a la evaluación realizada a los 14 días de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tt	Medias	N	E.E.	
T1	5.67	3	0.17	A
T3	4.00	3	0.17	B
TT	3.00	3	0.17	C
T2	0.00	3	0.17	D

Tt: Tratamientos; *TT*: Testigo; *T1*: Tratamiento 1. *T2*: Tratamiento 2; *T3*: Tratamiento 3.

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$); $DMS = 0,75480$; Error: 0.0833 gl: 8.

Según la prueba de Tukey presentada en la tabla anterior, los explantes fenolizados en la evaluación realizada a los 14 días de siembra *in vitro* de *C. odorata* son altamente significativos en todos los tratamientos.

En el mismo orden y dirección se presentan los datos del análisis de la varianza y de la prueba de Tukey. Correspondiente a la evaluación realizada 21 días después de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tanto la fenolización como la contaminación del material vegetal antes, durante y después de la micropropagación han sido consideradas por Minchala *et al.*, (2014), entre los principales problemas que dificultan el establecimiento de cultivos *in vitro*, denominados contaminación por bacterias y hongos endógenos, secreción de sustancias tóxicas tales como fenoles y sustancias volátiles, y pobre respuesta en la inducción de procesos morfogénicos, organogénesis y embriogénesis somática.

La presencia de explantes fenolizados y contaminados en esta investigación coincide con los criterios de varios autores, quienes han planteado que, especialmente la propagación *in vitro*, y particularmente en la etapa de enraizamiento se presenta a menudo como una fase crítica y difícil en la mayoría de las especies (Hartmann *et al.*, 2002). El uso exógeno de auxinas naturales o sintéticas, permite manejar esta fase problemática estimulando células indiferenciadas que promueven la iniciación del enraizamiento o surgimiento de raíces adventicias (Woodward y Bartel, 2005); Flores *et al.*, 2009).

Explantes establecidos

La tabla 16 presenta los resultados correspondientes al análisis de varianza de explantes establecido a los 21 días de la prueba, con 14 puntos porcentuales en su coeficiente de variación, valor aceptable ya que está dentro del límite.

Tabla 16. Datos de análisis de la varianza de los explantes establecidos correspondientes a la evaluación realizada a los 21 días de siembra *in vitro* de *C. odorata*.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo	223.58	3	74.53	447.17	<0.0001
Tratamiento	223.58	3	74.53	447.17	<0.0001
Error	1.33	8	0.17		
Total	224.92	11			
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Establecidos	12	0.99	0.99	14.00	

FV: Fuentes de Variación; SC: Suma de cuadrados; GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrados Medios; F: Estadístico F.

La Tabla 17 muestra los resultados de la prueba de Tukey realizada con los datos resultantes de los explantes establecidos durante el trabajo.

Tabla 17. Prueba de Tukey de explantes establecidos correspondiente a la evaluación realizada a los 21 días de siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tt	Medias	N	E.E.	
T2	10.33	3	0.24	A
T3	1.33	3	0.24	B
TT	0.00	3	0.24	C
T1	0.00	3	0.24	C

Tt: Tratamientos; TT: Testigo; T1: Tratamiento 1. T2: Tratamiento 2; T3: Tratamiento 3.

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$); DMS = 1,06745; Error: 0.1667 gl: 8.

La prueba de Tukey se realizó sobre los resultados de los explantes establecidos. La tabla 17 indica que la variable es altamente significativa de acuerdo con la media obtenida en T2, parámetro que establece que éste era el tratamiento ideal para la supervivencia de los explantes en esta etapa. Cabe destacar que este tratamiento siguió liderando durante todas las evaluaciones ya que superó las 10.00 en el valor de sus medias. Este resultado se obtuvo porque el equilibrio ideal se encontró en la concentración tanto de alcohol como de hipoclorito de sodio, optimizando así la correcta desinfección de los explantes.

Explantes contaminados

Los resultados de los explantes contaminados se muestran en la Tabla 18. El valor de su coeficiente de variación así lo indica, con un valor aceptable porque está dentro del rango establecido que puede llegar a 20 puntos porcentuales.

Tabla 18. Datos del análisis de la varianza de los explantes contaminados correspondiente a la evaluación realizada a los 21 días de la siembra *in vitro* de *C. odorata*.

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	61.6	3	20.5	49.27	<0.0001
Tratamiento	61.6	3	20.5	49.27	<0.0001
Error	3.3	8	0.4		
Total	64.9	11			
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Contaminados	12	0.95	0.93	14.62	

FV: Fuentes de Variación; SC: Suma de cuadrados; GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrados Medios; F: Estadístico F.

La prueba de Tukey realizada con los datos que resultaron de los explantes contaminados en la evaluación a los 21 días de siembra *in vitro* se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 19. Prueba de Tukey de explantes contaminados correspondiente a la evaluación realizada a los 21 días de siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tt	Medias	n	E.E.	
TT	7.3	3	0.37	A
T1	5.0	3	0.37	B
T3	4.3	3	0.37	B
T2	1.0	3	0.37	C

Tt: Tratamientos; TT: Testigo; T1: Tratamiento 1. T2: Tratamiento 2; T3: Tratamiento 3.

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$); DMS = 1,68779; Error: 0.4167 gl: 8.

De acuerdo con los valores mostrados en la Tabla 19, los resultados son altamente significativos entre el testigo y T2, con una media de 7.33 y 1.00 respectivamente. La alta contaminación en el Testigo se debe al hecho de que no tomó ningún tratamiento de desinfección, mientras que el T2 muestra un promedio relativamente bajo en relación con los otros tratamientos.

Explantos fenolizados

Los resultados del análisis de la varianza de los explantes fenolizados se muestran en la evaluación realizada a los 21 días después de la siembra *in vitro* de *C. odorata*, que refleja un 15.15% en su coeficiente de variación, según se observa en la tabla 20.

Tabla 20. Datos del análisis de la varianza de los explantes fenolizados correspondientes a la evaluación realizada a los 21 días de siembra *in vitro* de *C. odorata*.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Modelo	72.7	3	24.2	48.4	<0.0001
Tratamiento	72.7	3	24.2	48.4	<0.0001
Error	4.0	8	0.5		
Total	76.7	11			
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Fenolizados	12	0.95	0.93	15.15	

FV: Fuentes de Variación; SC: Suma de cuadrados; GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrados Medios; F: Estadístico F.

Los datos de prueba de Tukey mostrados en la tabla 21 indican que existen diferencias muy significativas entre los tratamientos aplicados, alcanzando promedios por encima de 4.00 en los tratamientos TT, T3 y T1.

Tabla 21. Prueba de Tukey de explantes fenolizados correspondiente a la evaluación realizada a los 21 días de siembra *in vitro* de *C. odorata*.

Tt	Medias	n	E.E.	
T1	7.00	3	0.41	A
T3	6.33	3	0.41	A B
TT	4.67	3	0.41	B
T2	0.67	3	0.41	C

Tt: Tratamientos; TT: Testigo; T1: Tratamiento 1. T2: Tratamiento 2; T3: Tratamiento 3.

Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$); DMS = 1,84888; Error: 0.5000 gl: 8.

Según los resultados de la tabla anterior, en el caso de T1 que alcanzó una media de 7.00 por encima de los otros tratamientos, esto puede deberse a los altos porcentajes de concentración contenidos en los reactivos utilizados (hipoclorito de sodio 50% y alcohol al 75% de su concentración, con un tiempo de exposición de 180 s), al momento de la aplicación del tratamiento, se observó una reacción negativa por parte de los explantes, que perdieron significativamente su coloración, de modo que los resultados están a la vista, considerando T1 como no apto para desinfección de los explantes.

Conclusión

Existen diferencias estadísticas altamente significativas en los protocolos utilizados para la desinfección de explantes de *Cedrela odorata*, siendo el tratamiento (T2) identificado como el más idóneo para la desinfección en la fase de establecimiento, pues este alcanzó un alto porcentaje de sobrevivencia.

Agradecimientos: Los autores expresamos un especial agradecimiento al personal técnico del laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, en particular a la Facultad de Ciencias Naturales y de la Agricultura, representada por la Carrera de Ingeniería Forestal.

Referencias

Borges, M., Estrada, E., Pérez, I., y Meneses, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agríc. Colomb. Biotecnol.

Cameron, S. (2010). Plant regeneration in spanish cedar. *Cedrela odorata* L. using zygotic embryo explants from mature seed and improvement of embryogenic nodule initiation by heat shock. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant* 46(2): 126-133.

CITES. (2016). Apéndices I, II y III Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Recuperado el 11 de 08 de 2016. De <https://cites.org/sites/default/files/eng/app/2016/S-Appendices-2016-03-10.pdf>

Cruz, M., García, Y., Sánchez, C., Alvarado, Y., Acosta, M., Roque, B. y Freire, M. (2007). Identificación y control de *Bacillus sp.* contaminante del establecimiento in vitro de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnología vegetal*. 7(1). 1:9-13. Cuba.

Da Costa Nunes, E., Volkmer de Castilho, C., Netto Moreno, F., Viana, A.M. (2001). *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 259-268.

Daquinta, M., Cid, M., Lezcano, Y., Pina, D. y Rodríguez, R. (2004). Formación de callos a partir de inflorescencias inmaduras en cedro y caoba híbrida. *Biotecnología Vegetal* 4(2): 121-124.

Flores, C.M., A. Cabañas, I. Peñalosa, R. Quintanar, J. Vázquez y M. Urzúa. (2009). Auxinas endógenas, AIA-Oxidasa y enraizamiento en *Vigna radiata* L. Wilczek inducido por auxina exógena libre y conjugada. *Revista Fitotecnia México* 32(1): 61-66.

Gamborg, O. L. (2002). Plant tissue culture. *Biotechnology, milestones*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 38(2). 84-92.

García, R., Delgado, M., Gonzáles, Y., Gonzáles, A., Garriga, M., Caligari, P., Carrasco, B., Quiroz, K. (2011). In vitro propagation of Cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71(3): 376-382.

George, E. (1996). *Plant propagation by tissue culture; part 2*. In *Practice*. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.

Grijalva, J., Checa, X., Ramos, R., Barrera, P. y Limongi, R. (2012). Situación de los Recursos Genéticos Forestales—Informe País Ecuador. Preparado por el Programa Nacional de Forestería del INIAP con aval del INIAP. FAO/MAE/MAGAP/MMRREE.

Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies y R.L., Gé Neve. (2002). *Plant Propagation: Principles and Practices*. Prentice Hall. 7th Ed. 880 pp.

Hernández, Y. y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cielo*. Recuperado el 16 de 08 de 2016.

International Union for the Conservation of Nature (IUCN) (2004). Americas Regional Workshop on Conservation and Sustainable Management of Trees (*Cedrela odorata*). In IUCN Red list of threatened species. Obtenido de <http://www.resdlist.org>.

Jiménez -Terry, F., Barbón, R., La O, M. Pérez, M., Collado, R., Acosta-Suárez, M., Alvarado-Capó, Y., Agramonte, D. (2007). Efecto de la revigorización en el establecimiento in vitro de ápices y segmentos nodales de *Cedrela odorata* L. *Biotecnología vegetal*. 7(1).

- Leifert, C. y Cassells, A. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* vol. 37. p. 133-138.
- Minchala, J., Eras, V., Angamarca, R., Yaguana, M., Muñoz, L., Delgado, G. (2014). Propagación *in vitro* de guayacán negro, *Tabebuia billbergii* (Bignoniaceae), a partir de explantes obtenidos de plántulas *in vitro*.
- Muñoz, S. (2003). Embriogénesis somática en cedro (*Cedrela odorata* Linnaeus) a partir de cotiledones, Tesis para obtener el Título de Bióloga. Universidad Nacional Agraria La Molina Perú – Lima.
- Murashige, T. y Skoog, F. A. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* vol. 15. p. 473-497.
- Nieto, V. y Valdiviso, M. (2013). Establecimiento de un protocolo de regeneración *in vitro* y Aclimatización para *Fuchsia pilaloensis* y *Fuchsia hybrida* para su conservación. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales.
- Ogita, S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant. *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology.* 22(2). 119-125.
- Paredes, K., Morales, I. y Magariños, E. (2007). Evaluación de medios de cultivo *in vitro* para *Amburana cearensis* (roble) y *Centrolobium tomentosum* (tejeyeque) en la fase de establecimiento. Documento Científico 2-2008. Proyecto de Manejo de Bosques en Bolivia (FOMABO), Programa de Investigaciones Forestales (PROINFOR). Santa Cruz, Bolivia.
- Pérez, J., Aguilar, M. E. y Roca, R. (2012). Assays for the *in vitro* establishment of *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata*. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 14(1). 20-30.
- Pérez, J., Mesén, F., Hilje, L. y Aguilar, M.E. (2006). Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata*: Fases de desarrollo y enraizamiento. *Recursos Naturales y Ambiente* 46-47:146-151.
- Ramírez, M., Santos, R. y Isea, F. (2000). Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* vol. 17. p. 217-225.
- Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (Eds.). (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones (No. 151). Cali, Colombia.
- Woodward, A.W. y B. Bartel. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.

UNIDAD 3



Selección asistida por marcadores moleculares

Tema 11

Cribado de QTLs de resistencia en cultivos con marcadores moleculares: Caso papa (*Solanum tuberosum* L.)¹

Julio Gabriel

La mejor manera de salir de una dificultad es afrontarla.

Will Rogers

Resumen

Fueron analizados y genotipados progenies resistentes a *Phytophthora infestans*, derivados del cruzamiento entre especies silvestres (*can*, *buk*, *jam* y *rap*) y cultivadas de papa (*phu*, *gon* and *dih tbr*). Diferentes niveles de resistencia en hojas y tubérculos fueron encontrados en las progenies evaluadas. El análisis de co-localización entre los marcadores SSR y QTLs publicados para resistencia a *P. infestans* reveló 28 marcadores SSR ligados y localizados en los 12 cromosomas de papa. La selección de QTLs para resistencia a *P. infestans*, en hojas a través de marcadores SSR, reveló en la progenie D (*can* x *phu*) un QTL en el cromosoma VIII, que desciende de *p h u*. Sólo uno en el cromosoma III procedente de *can*. En E (*buk* x *phu*) se ha detectado cuatro QTLs seleccionables en los cromosomas III, V, VI y X. En G (*j a m* x *g o n*) se detectaron tres QTLs seleccionables en los cromosomas III, VI y VII. QTAlelos significativos fueron observados en los cromosomas VI procedente de *gon*, y dos lugares de *jam*. La correlación de la resistencia entre hoja y tubérculo fue baja y no significativa. Esto también se reflejó en los QTLs detectados para resistencia en tubérculos. En G fueron detectados tres QTLs seleccionables, uno en el cromosoma VI que desciende de *gon*, y es común para resistencia en tubérculo y hoja. Los otros dos QTLs se encuentran en los cromosomas X y V y descienden de *jam* y *gon*. En D, el QTL de *phu* en el cromosoma VIII fue común para *P. infestans* de tubérculo y hoja. Además, fue detectado un QTL Pi-11 en el cromosoma XI a partir del gen candidato BS2.

Palabras claves: Especies silvestres, cromosomas, tubérculo, hoja, gen candidato.

Summary

Screening of QTLs resistance in crops with molecular markers: Potato case (*Solanum tuberosum* L.)

Were analyzed and genotyped progenies resistant to *Phytophthora infestans*, derived from crosses between wild diploid (*can*, *buk*, *jam* and *rap*) and cultivated species diploid potato (*phu*, *gon* and *dih tbr*). Different levels of resistance in the leaves and tubers were found in the five tested progenies tested. Co-location analyses between SSR markers and published QTLs positions for *P. infestans* resistance revealed 28 linked SSR markers located on all 12 potato chromosomes. QTL screening for *P. infestans* resistance in leaves through linked SSR markers

¹ Este tema fue sistematizado sobre la base de los documentos generados por : Gabriel (2008), Gabriel *et al.* (2009), Ritter *et al.* (2009) y Gabriel *et al.* (2011).

revealed that in progeny D (*can* x *phu*) only one QTL was detected on chromosome VIII which descends from *phu*. In progeny E (*buk* x *phu*) we have detected four selectable QTLs located on chromosomes III, V, VI and X. Only one on chromosome III descended from *can*. In G (*jam* x *gon*) were detected three selectable QTLs on chromosomes III, VI and VII. Significant QT allele effects were observed on chromosome VI for parent *gon*, and at two locations for the other parent (*jam*). Correlation between leaf and tuber infection levels was low and not significant. This is also reflected in the detected QTLs in each population. In G three selectable QTLs for late blight resistance were detected. The QTL on chromosome VI descending from *gon* was common for leaf and tuber resistance. The other two QTLs were located on chromosomes V and X and descended from *jam* and *gon*. In D the QTL from *phu* on chromosome VIII was common for tuber and leaf blight. In addition one QTL was detected on chromosome XI which showed significant QT allele difference between published QTLs for *P. infestans* resistance. Moreover, on chromosome VII an additional, significant SSR allele common to both parents was observed. Also was detected a QTL Pi-11 on chromosome XI from BS2 candidate gene.

Key words: Wild species, chromosome, tuber, leaf, candidate gene.

Introducción

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el DNA (de genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). Afortunadamente, la aparición de los marcadores moleculares está ayudando a eliminar tanto los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y repetitiva.

El estudio genómico de una especie normal-mente comienza con el desarrollo de marcadores moleculares. Los primeros marcadores de DNA descritos en papa fueron los RFLPs (Gebhardt *et al.* 1989a). Esta técnica requiere gran cantidad de ADN, es laboriosa y costosa, aunque presenta una técnica fiable. El descubrimiento y la explotación de la técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) facilitaron enormemente el desarrollo y las aplicaciones de marcadores moleculares.

Consecuentemente se desarrollaron y aplicaron en la papa otros tipos de marcadores, dominantes y codominantes, como los RAPD, AFLP (van Eck *et al.* 1995), SSR (Milbourne *et al.* 1998), ISTR, ISSR, SCAR y CAP (Oberhagemann *et al.* 1999). Entre las aplicaciones más importantes de estos marcadores moleculares, figuran la identificación y la determinación de la pureza varietal (Görg *et al.* 1992) así como el análisis de la biodiversidad y estudios filogenéticos en el género *Solanum* (Debener *et al.* 1990).

Se puede distinguir marcadores dominantes y co-dominantes. Esto implica que los marcadores dominantes pueden ser específicos para un parental o comunes a ambos parentales, segregando 1:1 y 3:1 respectivamente en una progenie. En todos los casos existen alelos nulos (ausencia del marcador dominante) que representan los otros alelos desconocidos en una progenie.

Los marcadores co-dominantes revelan cada uno de los diferentes alelos de un locus conocido hasta diferente. A estos pertenecen generalmente los SSRs, ESTs y TDFs (van Eck *et al.* 1995). Ellos también sirven para alinear los mapas genéticos individuales de cada parental y producir un mapa integrado (Ritter *et al.* 2008a).

Por otra parte hay marcadores indirectos y directos. Los marcadores indirectos son aquellos que determinan la distancia entre el marcador y un gen de interés. En cambio los marcadores directos, permiten la identificación directa de los alelos de un gen de interés, y se pueden aplicar independientes del entorno genético.

De particular interés son aquellos marcadores que mapean en diferentes entornos genéticos a la misma posición genómica, ya que permiten por ejemplo, alinear mapas de diferentes entornos genéticos. Obviamente tienen que ser “*single copy*” para evitar confusiones. Entre ellos figuran generalmente copias simples de SSRs, TDFs, EST y COS (Oberhagemann *et al.* 1999).

Para muchas aplicaciones genéticas es necesario localizar el conjunto de marcadores moleculares en el genoma. Para ello sirven los mapas genéticos. El mapa genético se deriva de procesos estadísticos y refleja la estructura física de un genoma con sus correspondientes cromosomas. Los mapas de liga-miento genético se construyen a partir de cruzamientos controlados utilizando marcadores moleculares. En papa se han construido diferentes mapas de ligamiento genético a nivel diploide y tetraploide y en diferentes entornos genéticos. El primer mapa a nivel diploide se basó en marcadores RFLPs (Bonierbale *et al.* 1988), luego el construido por Gebhardt *et al.* (1989b).

En la actualidad existen muchos mapas genéticos disponibles basados en diferentes marcadores moleculares y se encuentran alineados con otros mapas de papa y tomate mediante sondas comunes. Cabe destacar que el mapa de SSRs fue aportado por Milbourne *et al.* (1998), que contiene marcadores RFLPs mapeados también en el mapa de papa de la base de datos Gabi (Pomamo) y sondas de tomate. Este mapa pudo ser anclado al mapa de Caromel *et al.* (2003), el cual fue obtenido en una población de

S. tuberosum x *S. spegazzinii* y mapa de tomate (Tanksley *et al.* 1992). El mapa ultradenso (UHD) de papa por Isidore *et al.* (2004) y van Os *et al.* (2006), que aparte los 10.000 marcadores AFLPs contiene 40 marcadores RFLPs y SSRs que se utilizaron como marcadores directos. Por otro lado, este mapa está alineado con el mapa de tomate (Tanksley *et al.* 1992) mediante sondas RFLPs y cuenta con 66 marcadores comunes al mapa de papa de Caromel *et al.* (2003). Recientemente Ritter *et al.* (2008a) han contribuido con un mapa completo de transcriptoma constitutivo expresando genes del genoma de la papa, que se ha construido utilizando cDNA-AFLP. Los TDFs fueron anclados a las cajas del mapa UHD.

La disponibilidad de mapas genéticos permite integrar en los mismos datos fenotípicos que pueden ser causados por un gen (carácter monogénico) o por varios e incluso muchos genes.

Los caracteres monogénicos como la resistencia al virus Y de la papa (PVY) se pueden tratar estadísticamente igual que un marcador molecular (presencia vs. ausencia) para su integración en un mapa.

Sin embargo, la variación cuantitativa observada para la mayor parte de los caracteres fenotípicos en plantas, es causada por genes poligénicos, que frecuentemente interaccionan con el medio ambiente (Vargas *et al.* 2006). La acción colectiva de los loci genéticos en la expresión de un carácter se ha denominado QTL (Geldermann 1975). Los efectos cuantitativos de los QTLs no se pueden estudiar mediante el análisis mendeliano, sin embargo, cuando un marcador molecular segrega, según un patrón mendeliano, y está ligado a un QTL, la posición en el cromosoma del QTL y su contribución fenotípica puede ser estimada (Thoday 1961).

Hasta ahora hay numerosos modelos estadísticos para el análisis QTL, que determinan la posición y el efecto de cada loci que influye en el carácter cuantitativo (Lander y Botstein 1989, Knapp *et al.* 1990, Martínez y Curnow 1992, Jansen y Stam 1994, Zeng 1994).

En papa se han desarrollado diferentes análisis de caracteres cuantitativos considerando resistencias poligénicas a *P. infestans* (Leonards-Schippers *et al.* 1994) y *G. pallida* (Kreike *et al.* 1993, Caromel *et al.* 2003); también se realizaron otros análisis de QTL considerando los componentes del rendimiento (Schäfer-Pregl *et al.* 1998), la tuberización, la dormancia (van den Berg *et al.* 1996), la forma del tubérculo (van Eck *et al.* 1994), y el contenido de azúcares y almidón (Menéndez *et al.* 2002).

El presente documento es una síntesis elaborada en base al trabajo presentado por Gabriel (2008), Gabriel *et al.* (2009), Ritter *et al.* (2009) y Gabriel *et al.* (2011) y se centra en el análisis de QTLs de resistencia a *P. infestans*, utilizando SSRs y genes candidato (Hernández *et al.* 2008). Para ello los SSRs son marcadores ideales, ya que son altamente polimórficos, muestran una herencia co-dominante y sobre todo mapean en diferentes entornos genéticos a posiciones genómicas idénticas.

La estrategia que se denomina QTA Genotyping (Quantitative Trait Allele Genotyping) también se ha empleado en el presente trabajo, utilizando varias progenies con diferentes parentales como fuentes de resistencia a *P. infestans* (entornos genéticos diferentes).

Materiales y métodos

Material vegetal

Para el cribado de QTLs con marcadores SSRs se analizaron 321 genotipos de las progenies D: can310956.8 x gon703354, E: buk210042.5 x phu81, G: jam27521.48 x gon703354 y N: H88-31/34 (tbr) x rap636. Se trata de diferentes fuentes de resistencia a *Phytophthora infestans* provenientes de *Solanum canasense* (can), *S. bukasovii* (buk), *S. jamesii* (jam) y *S. raphanifolium* (rap). En los siguientes párrafos se referirá a las progenies y parentales con las abreviaciones.

Bioensayos

Para producir las infecciones de hoja de *P. infestans*, se trabajó con plantas jóvenes de las progenies mencionadas, fueron inoculadas con esporas de un aislamiento local complejo y los niveles de infección fueron evaluados en cada genotipo de acuerdo a Plata (1998). Tubérculos de papa también fueron inoculados con el mismo aislamiento siguiendo la metodología de Flier *et al.* (2001).

Métodos moleculares

El análisis de SSRs fue realizado de acuerdo a Milbourne *et al.* (1998) en parentales y progenies usando condiciones apropiadas de PCR (Ghilain *et al.* 2004 con modificaciones). Los primers de SSR fueron marcados con marcadores fluorescentes infrarojo IRD800 o IRD700 (LICOR, Lincoln, Nebraska, USA). Los productos de amplificación fueron desnaturalizados y separados en gel de poliacrilamida al 6% (19:1). Estos fueron visualizados en el analizador LICOR (DNAAnalyser Gene Reader 4200, LICOR, MWG-Biotech) utilizando su manual.

Análisis de datos

Todos los QTLs, SSRs y otros marcadores se proyectaron en bins (cajas) del mapa UHD, utilizando las proyecciones basadas en las proyecciones coseno sobre el intervalo del marcador

común en diferentes mapas tal y como fue descrito por Ritter *et al.* (1990) y Ritter y Salamini (1996).

Los marcadores SSR ligados al mapa de Milbourne *et al.* (1998) fueron utilizados para las proyecciones SSR. Los marcadores flanqueantes al QTL fueron proyectados directamente si estaba presente en el mapa de referencia o en proyecciones consecutivas utilizando mapas de QTL particulares y otros, como los mapas de Caromel *et al.* (2003) y el tomate mapa de Tanksley *et al.* (1992). Los detalles están descritos por Sánchez (2006).

Los geles fueron analizados de forma visual, utilizando una matriz de presencia-ausencia del fragmento amplificado para el QTA-genotyping. La presencia o ausencia de cada marcador segregante, tanto de la progenie como de los parentales, se anotaron según la codificación y se almacenaron en archivos con formato EXCEL para su posterior análisis estadístico. Para cada marcador ensayado se aplicó un t-test (SAS 1998), para comparar las medias de niveles de resistencia en los genotipos que pertenecen a cada clase de marcador (ausencia/presencia).

Resultados y discusión

Se ha encontrado en todas las progenies una elevada variación de la resistencia tanto en hoja como en tubérculo a *P. infestans*, como prerrequisito para poder encontrar QTLs.

La correlación entre resistencia en hoja y resistencia en tubérculo, fue baja y no significativa (-0.069 a 0.328). Esto está indicando que probablemente los genes de resistencia a *P. infestans* en hoja y tubérculo son diferentes. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Collins *et al.* (1999), que observaron una correlación negativa de la resistencia a *P. infestans* entre ambos órganos, en una población segregante diploide de papa.

Se han descrito QTLs para la resistencia a *P. infestans* en los 12 cromosomas de papa, parte de ellos validados por varios autores. Los marcadores SSRs establecido por Milbourne *et al.* (1998), permitieron asociar los marcadores SSRs para todos los loci. La proyección de los marcadores SSRs a QTLs conocidos, permite reducir los esfuerzos en el análisis de las características en un nuevo entorno genético. Todas las posiciones conocidas pueden ser analizadas para detectar la presencia de un QTL, determinando solamente la estrecha vinculación del marcador SSR en una nueva población. Se ha analizado estas posiciones de QTLs por la presencia de QT alelos diferenciados en cuatro diferentes progenies y se han detectado QTL seleccionables para resistencia de hoja y tubérculo en todos los experimentos (Figura 1). De esta manera se ha creado una “impresión genotípica” de cada uno de los parentales (QTA genotipados), indicando posiciones de QTLs seleccionables y los correspondientes marcadores para selección asistida por marcadores moleculares (SAM) en las diferentes fuentes genéticas.

En la progenie D (*can x phu*), se observó altos niveles de resistencia. Es el caso de *S. canasense*, que es una especie silvestre diploide ampliamente distribuida en Perú y Bolivia (Ochoa 2001). Esta especie ha sido descrita como valiosa fuente de resistencia a *Streptomyces scabies* (Hosaka *et al.* 2000), al nematodo-quiste (*Globodera pallida*) (Castelli *et al.* 2006) e insectos. Hawkes (1991) reportó que *can* es una especie resistente a *P. infestans*. El genotipado de la progenie D detectó un QTL en el cromosoma VIII (Pi-8) (Figura 1a). Este QTL fue reportado por Oberhagemann *et al.* (1999) en un estudio de cinco familias, obtenido del cruzamiento entre siete diferentes clones diploides de papa y Trognitz *et al.* (2002) lo reportó en un estudio de una población diploide de *phu x dih tbr* y probablemente un QTL localizado en el cromosoma X (Rber), que fue descrito por Collins *et al.* (1999), en una población segregante de papa diploide. A nivel de resistencia en tubérculo se detectó cuatro QTLs en los cromosomas VII (Pi7b), VIII

(Pi-8), XI (Pi-11), que provienen de *can* y *phu*. La presencia de estos QTLs fue reportada por Oberhagemann *et al.* (1999), Collins *et al.* (1999) y Leonards-Schippers *et al.* (1994). Es importante resaltar que en el presente estudio el QTL del cromosoma XI (Pi-11), fue detectado vía un gen candidato BS2.

En la progenie E se detectaron 4 QTLs ubicados en los cromosomas III (Pi3c, d), V (PiTFve-5b), VI (Pi-6a) y X (Rber) (Figura 1b), que provienen de *buk*. Resultados similares fueron reportados por Oberhagemann *et al.* (1999) y Collins *et al.* (1999), que describieron la presencia de estos QTLs.

El genotipado de la progenie G, detectó tres QTL seleccionables en los cromosomas III (FB-1, Pi-3a), VI (FB-6) y VII (Pi-7b) (Figura 1c). Los QTAlelos significativos fueron observados en los cromosomas VI para *gon* y dos lugares para *jam*. Estos resultados confirman lo reportado por Collins *et al.* (1999) y Oberhagemann *et al.* (1999).

Un aporte importante del genotipado de la progenie ha sido el relacionarlo con la resistencia a *P. infestans* en tubérculos, en la que se detectaron QTL seleccionables en los cromosomas III (Pi-3c,d), V (PiFTve-5b), VI (Pi-6a) y X (Rber). El locus del cromosoma III mostró efectos significativos de los alelos de los parentales *jam* y *phu*. También el locus del cromosoma V fue significativo para el parental *jam*.

En la progenie N (*dih tbr x rap*), fueron detectados tres QTLs seleccionables que se encuentran en los cromosomas V (PiFTve-5a, Pi5a, R1, PiFTve-5c), VI (FB-6) y VIII Rblc, E-6 (Figura 1c). Dos de ellos (en los cromosomas V y VIII) descienden de *rap* y una del *dih tbr* (VI). Sólo se detectó un QTL para tizón en tubérculo en el cromosoma VI (FB-6) y que proviene del *dih tbr* y no así de *rap*.

La diferencia en los QTLs seleccionables para *P. infestans* en cada progenie analizada refleja la “no correlación” de la resistencia a *P. infestans* en ambos órganos. Al respecto Oberhagemann *et al.* (1999), observaron que plantas con alelos en el QTL del cromosoma V, mostraron incremento de la resistencia a *P. infestans* en hoja, pero hubo decrecimiento en la resistencia en tubérculo.

Es importante resaltar que sólo podemos diferenciar QTL seleccionables. Esto requiere que tanto el marcador sea polimórfico, como que la configuración alélica del QTL sea apropiada.

Se debe enfatizar que lo que se mide son diferencias entre mezclas de genotipos y diferencias de efectos de alelos probables en cada parental: $q_1/q_2 \times q_3/q_4 = [(q_1q_3 + q_1q_4)] - [(q_2q_3 + q_2q_4)]$, los efectos entre q_1 y q_2 tienen que ser diferentes más las posibles interacciones desconocidas. El QTL (gen que influye en el carácter) estará en todo caso, pero no es detectable (configuración alélica desconocida), ni se conocen sus efectos.

Respecto al segundo requisito que el marcador indirecto tiene que ser polimórfico, se vio que esto no se cumple en muchos casos. Por ejemplo, no se ha podido evaluar QTLs en los genotipos en los cromosomas I, IV, IX y XII de las progenies D, E, G y N, debido a que varios SSRs no segregaban en ninguna familia.

Por otra parte, aunque los SSRs en principio funcionan en diferentes entornos de la misma región genómica, puede desaparecer su polimorfismo, sí por ejemplo el nuevo parental es homocigoto para el alelo, esto hace que no haya segregación.

En el estudio, se utilizaron novedosas fuentes de resistencia genética a *P. infestans* como fueron las especies silvestres diploides ($2n = 2x = 24$) *can*, *oka*, *buk*, *rap* y las diploides cultivadas *phu*,

gon y *dih tbr*. Las especies silvestres tienen altos niveles de resistencia a *P. infestans* que pueden ser transferidos a sus progenies; sin embargo, la primera generación filial que producen no son aptas para obtención de nuevas variedades por selección en campo, por lo que será necesario que las progenies obtenidas sean evaluadas y seleccionadas por resistencia a *P. infestans* en primera instancia, y los individuos más aptos podrían entrar en un programa de retrocruza-mientos sucesivos hacia *tbr* y/o *adg*.

De ahí que en el presente trabajo se han validado numerosos marcadores moleculares SSR y genes candidato, que fueron utilizados en otros diferentes entornos genéticos; sin embargo, con este estudio se ha podido detectar que varios de estos marcadores son válidos y podrían ayudar a la SAM, a pesar de haberse obtenido en entornos genéticos particulares.

Es de resaltar que existen marcadores indirectos y directos. En los marcadores indirectos hay ciertas distancias entre el marcador y un gen de interés y puede haber recombinaciones. A este tipo de marcadores pertenecen los SSRs que son muy polimórficos pero se pueden también seleccionar “falsos alelos”, debido a las recombinaciones. Esto requiere aumentar el número de SSRs disponibles.

En cambio los marcadores directos permiten la identificación directa de los alelos de un gen de interés y se pueden aplicar independientes del entorno genético, son normalmente derivados de regiones codificantes (coding regions) como ESTs, TDFs, utilizando diferentes técnicas moleculares.

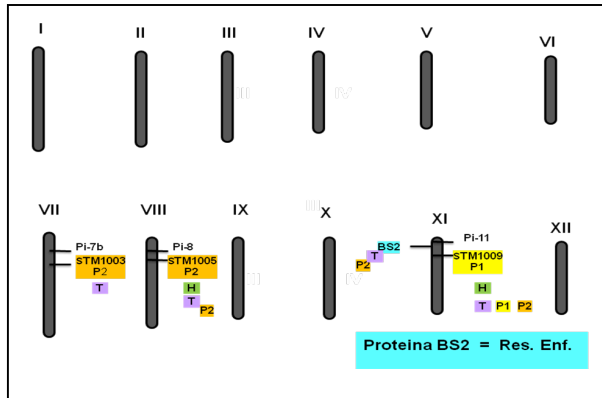
Los genes candidato son interesantes en este sentido, pero tienen la desventaja de que no son tan polimórficos como los SSRs. Así por ejemplo, se evaluó CAPs en cuatro progenies, en los cuales no se observó polimorfismo luego de la digestión con enzimas. Esto no implica que los CAPs no funcionen, sino que es probable que en el entorno genético que se evaluó no haya habido reacciones, pero será conveniente seguir afinando el método en otros entornos genéticos para ir saturando los cromosomas donde se hallan posiciones de QTL publicados en el mapa UHD para resistencia a *P. infestans*. Por otra parte, existen varias aplicaciones prácticas para genes candidatos detectados como el análisis de su diversidad alélica, transformación genética o referencias cruzadas a través de la integración en mapas de ligamiento.

Los estudios de diversidad alélica en diferentes germoplasmas pueden permitir asociar variantes alélicas específicas con un genotipo particular, detectar los alelos más efectivos y de esta manera, proporcionar marcadores útiles para la SAM. La referencia cruzada a mapas de ligamiento, permite integrar los resultados de diferentes estudios, mediante el diseño de cebadores apropiados para mapeo. Si un cDNA particular se integra en el mapa muy cercano a un QTL conocido, entonces dicho TDF puede potencialmente explicar el QTL. Así por ejemplo, Ritter *et al.* (2008b) y Hernández *et al.* (2008) reportaron polimorfismos segregantes en el caso de BS2 (TC148920). Este cDNA pudo ser mapeado en un mapa de referencia de papa en el cromosoma XI y fue colocalizado con el QTL Pi-11b. Se observó que este cDNA segregó en la progenie D (*can x phu*), y representa el mismo QTL para *P. infestans* en el cromosoma XI.

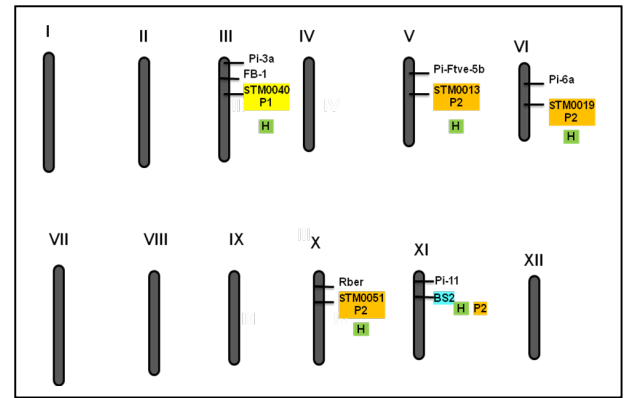
Sin embargo, un gen ligado puede ser el verdadero responsable del efecto del QTL, por lo que será necesario en el futuro, realizar experimentos de silenciación para verificar la función. Si el gen candidato representara un falso positivo, al menos podría ser utilizado como un marcador de un alelo específico para SAM.

Se debe comentar que en los últimos años, ha nacido un nuevo tipo de marcadores moleculares, denominados SNPs (polimorfismos de nucleótido simple), que es una variación en la secuencia

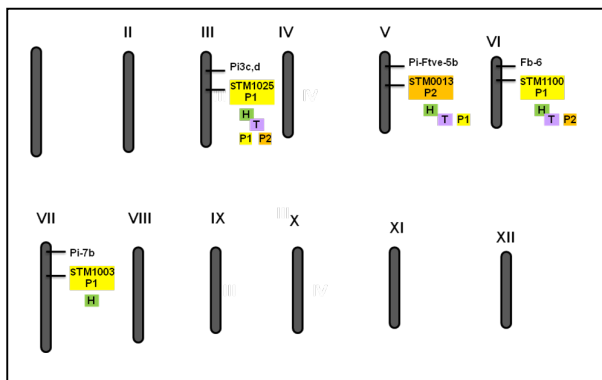
de ADN que afecta a una sola base [adenina (A), timina (T), citocina (C) o guanina (G)] de una secuencia del genoma. Esta tecnología aun está en desarrollo, pero hubo enormes avances con la ayuda de la computación moderna. Matoes detalles de los usos y nuevos descubrimientos, pueden ser encontrados en el trabajo de Mammadov *et al.* (2012).



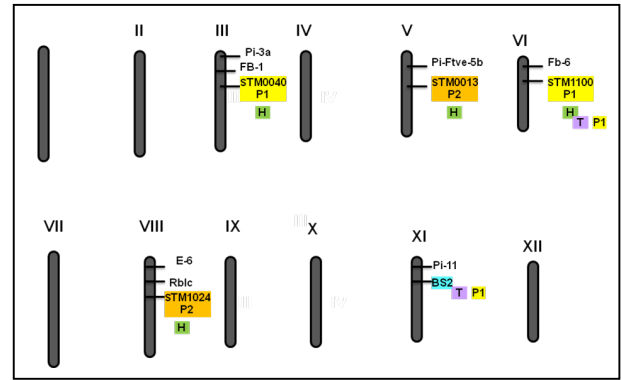
a) Cromosomas: Genotipado de QTA en la progenie D (can x phu), al $Pr < 0.05$ de probabilidad. H= hoja, T= tubérculo, P1 = Madre, P2 = Padre



b) Cromosomas: Genotipado de QTA en la progenie E (buk x phu), al $Pr < 0.05$ de probabilidad. H= hoja, T= tubérculo, P1 = Madre, P2 = Padre



c) Cromosomas: Genotipado de QTA en la progenie G (jam x gon), al $Pr < 0.05$ de probabilidad. H= hoja, T= tubérculo, P1 = Madre, P2 = Padre



d) Cromosomas: Genotipado de QTA en la progenie N (H88-31/34 x rap), al $Pr < 0.05$ de probabilidad. H= hoja, T= tubérculo, P1 = Madre, P2 = Padre

Figura 1. Resultados del genotipado de QTAs para resistencia en hoja y tubérculos para tizón en cuatro poblaciones mapeadas [Fuente: Gabriel *et al.* (2009)].

Referencias

Bonierbale M, Plaisted R, Tanksley S (1988) RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120: 1095-1103.

Caromel B, Mugniery D, Lefebvre V, Andrzejewski S, Ellisseche D, Kerlan M, Rousselle P, Rousselle-Bourgeois F (2003) Mapping QTLs for resistance against *Globodera pallida* (Stone) Pa2/3 in a diploid potato progeny originating from *Solanum spigazzinii*. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1517-1523.

Castelli L, Bryan G, Blok V, Ramsay G, Sobczak M, Gillespie T, Phillips M (2006) Investigations of *Globodera pallida* invasion and syncytia formation within roots of the

- susceptible potato cultivar Désirée and resistant species *Solanum canasense*. *Nematology* 1 (8): 103-110.
- Collins A, Milbourne D, Ramsay L, Meyer R, Chatot-Balandras C, Oberhagemann P, De Jong W, Gebhardt C, Bonnel E, Waugh R (1999) QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigour. *Molecular Breeding* 5 (5): 387-398.
- Debener T, Salamini F, Gebhardt C (1990) Phylogeny of wild and cultivated *Solanum* species based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Theor Appl Genet* 79: 360-368.
- Flier W, Turkensteen L, van den Bosch T, Vereijken P, Mulder A (2001) Differential interaction of *Phytophthora infestans* on tubers of potato cultivars with different levels of blight resistance. *Plant Pathology* 75:133-136.
- Gabriel J (2009) “Aplicación de marcadores moleculares para el cribado de QTLs en diferentes fuentes de resistencia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en papa. Tesis para optar al grado de Ph.D., Universidad Pública de Navarra (UPNA), Pamplona, España.
- Gabriel J, Ruiz de Galarreta JI, Hernández M, Plata G, Barandalla L, López R, Ritter E (2009) Aplicación de marcadores moleculares para cribado de QTLs en diferentes fuentes de resistencia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en papa. *Revista de Agricultura* (Bolivia) 45 (61): 36-43.
- Gabriel J, Ruiz de Galarreta JI, Lopez-Pardo R, Barandalla L, Alvarado C and Ritter E (2011) Short communication. Introgression of late blight (*Phytophthora infestans* L.) resistance from tuber-bearing *Solanum* wild species into cultivated potato. *Spanish J Agric Res* (España) 9 (1): 193-197.
- Gebhardt C, Blomendahl C, Schachtschabel U, Debener T, Salamini F, Ritter E (1989a) Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum* subsp., *tuberosum*) with RFLP fingerprints. *Theor. Appl. Genet.* 78: 16-22.
- Gebhardt C, Ritter E, Debener T, Schachtschabel U, Walkemeier B, Uhrig H, Salamini F (1989b) RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 78: 65- 75.
- Geldermann H (1975) Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theor. Appl. Genet.* 46: 319-330.
- Ghislain M, Spooner D, Rodriguez F, Villamón F, Nuñez J, Vasquez C, Waugh R, Bonierbale M (2004) Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor. Appl. Genet.* 108: 881-890.
- Görg R, Schachtschabel U, Ritter E, Salamini F, Gebhardt C (1992) Discrimination among 136 Tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. *Crop Science* 32: 815-819.
- Hawkes J (1991) *The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. Belhaven Press, UK.
- Hernández M, Ruiz de Galarreta J, Ritter E (2008) Detección de genes candidato de resistencia a *Phytophthora infestans*, mediante técnicas de expresión diferencial; cDNA-AFLP y microarrays. pp. 115-119. **In:** E. Ritter y J. Ruiz de Galarreta (eds): *Avances en ciencia y desarrollo de la patata para una agricultura sostenible*. III Congreso Iberoamericano Patata 2008. 5 al 10 de octubre, Vitoria-Gasteiz, Euskadi, España.

- Hosaka K, Matsunaga H, Senda K (2000) Evaluation of several wild tuber-bearing *Solanum* species for scab resistance. *Amer. J. of Potato Res.* 77: 41-47.
- Isidore E, van Os H, Andrzejewski S, Bakker J, Barrena I, Bryan GJ, Caromel B, van Eck H, Ghareeb B, de Jong B, van Koert P, Lefebvre V, Milbourne D, Ritter E, van der Voort JR, Rousselle-Bourgeois F, van Vliet J, Waugh R (2003) Toward a Marker-Dense Meiotic Map of the Potato Genome: Lessons From Linkage Group I Genetics, 165 (4): 2107 - 2116.
- Jansen R, Stam P (1994) High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447-1455.
- Knapp S, Bridges W, Birkes D (1990) Mapping quantitative trait loci using molecular marker linkage maps. *Theoretical and Applied Genetics* 79: 583-592.
- Kreike C, de Koning J, Vinke J, van Oijen J, Stiekema W (1994) Quantitatively inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one major locus in *Solanum spegazzinii*. *Theor. Appl. Genet.* 88: 764-769.
- Lander E, Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Leonards-Schippers C, Gieffers W, Schäfer-Pregl R, Ritter E, Knapp S, Salamini F, Gebhardt C (1994) Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics* 137: 67-77.
- Mammadov J, Aggarwal R, Buyyarapu R, kumpatla S (2012) SNP Markers and their impact on plant breeding. *Inter. J. Plant Genomics*: 1-12
- Martinez O, Curnow R (1992) Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking mapping. *Heredity* 73: 198-206.
- Menendez C, Ritter E, Schäfer-Pregl R, Walkemeier B, Kalde A, Salamini F, Gebhardt C (2002) Cold Sweetening in Diploid Potato: Mapping Quantitative Trait Loci and Candidate Genes. *Genetics* 162: 1423-1434.
- Milbourne D, Meyer A, Collins L, Ramsay C, Gebhardt C, Waugh R (1998) Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. Gen. Genet.* 259: 233-245.
- Oberhagemann P, Chalot-Balandras C, Bonnel E, Schäfer-Pregl R, Wegener D, Palomino C, Salamini F, Gebhardt C (1999) A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: Towards marker assisted selection. *Mol Breeding* 5: 399-415.
- Ochoa C (2001) Las papas de Sudamérica: Bolivia. Plural editores/CID. 535 p.
- Plata G (1998) Fenotipos de virulencia en Morochata y tipo sexual de apareamiento en Bolivia de *Phytophthora infestans*, que afecta al Cultivo de la papa. Tesis Ing. Agr. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 95 p.
- Ritter E, Gabriel J, Sánchez I, Ruiz de Galarreta JI, Hernández M (2008b) Detection of candidate genes for useful traits applying different molecular tools. Page 61-62. **In:** Potato for a Changing world (Abstracts of papers and posters). 17th Triennial Conference of the European Association for Potato Research (EAPR2008), July 06-10, 2008. Brasov, Rumania.

- Ritter E, Gebhardt C, Salamini F (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 224: 645-654.
- Ritter E, Ruiz de Galarreta J, van Eck H, Sánchez I (2008 a) Construction of a potato transcriptome map based on the cDNA-AFLP technique. *Theor. Appl. Genet.* (in press).
- Ritter E, Ruiz de Galarreta JI, Hernandez M, Plata G, Barandalla L, Lopez R, Sanchez I, Gabriel J (2009) Utilization of SSR and cDNA markers for screening known QTLs for late blight (*Phytophthora infestans*) resistance in potato. *Euphytica* 170: 77- 86.
- Ritter E, Salamini F (1996) The calculation of recombination frequencies in crosses of allogamous plant species with application to linkage mapping. *Genet. Res.* 67: 55-65.
- Sánchez I (2006) Construcción de un mapa genético funcional y detección de genes de resistencia frente a factores bióticos en patata (*Solanum tuberosum* L.). Tesis doctoral, Universidad del país Vasco, Dpto. de biología vegetal y ecología, Facultad de Ciencias, Vitoria-Gasteiz, España. 204 p.
- SAS Institute Inc. (1998) SAS/STAT Users Guide, Version 6, Fourth Edition, Vol. 2, SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Schäfer-Pregl R, Ritter R, Concilio L, Hesselbach J, Lovatti L, Walkemeier B, Thelen H, Salamini F, Gebhardt C (1998) Analysis of quantitative trait loci (QTLs) and quantitative trait alleles (QTAs) for tuber yield and starch content. *Theor Appl Genet* 97: 834-846.
- Tanksley S, Ganai M, Prince J, de Vicente M, Bonierbale M, Broun P, Fulton T, Giovannoni J, Grandillo S, Martin G, Messeguer R, Miller J, Miller L, Paterson A, Young N (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Thoday J. 1961. Location of polygenes. *Nature* 191: 368-370.
- Trognitz F, Manosalva P, Gysin R, Nino Liu D, Simon R, Herrera M, Trognitz B, Ghislain M, Nelson R (2002) Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* x dihaploid *S. tuberosum* hybrids. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 587-597.
- Van den Berg J, Ewing E, Plaisted R, McMurry S, Bonierbale M (1996) QTL analysis of potato tuber dormancy. *Theor. Appl. Genet.* 93: 317-324.
- Van Eck H, Jacobs E, Stam P, Ton J, Stiekema W, Jacobsen E (1994) Multiple alleles for tuber shape in diploid potato detected by qualitative and quantitative genetic analysis using RFLPs. *Genetics* 137: 303-309.
- Van Eck H, Rouppe van der Voort J, Draaistra J, van Zandvoort P, van Enckevort E, Segers B, Peleman J, Jacobsen J, Helder J, Bakker J (1995) The inheritance and chromosomal location of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol Breeding* 1: 397-410.
- van Os H, Andrzejewski S, Bakker E, Barrena I, Bryan GJ, Caromel B, Ghareeb B, Isidore E, de Jong W, Koert P, Lefebvre, Milbourne D, Ritter E, Jeroen NA, Rouppe van der Voort M, Rousselle-Bourgeois F, van Vliet J, Waugh R, Visser RGF J, Herman J (2006) Construction of a 10.000-Marker Ultradense Genetic Recombination Map of Potato: Providing a Framework for Accelerated Gene Isolation and a Genomewide Physical Map. *Genetics* 173: 1075–1087.

Vargas M, van Eeuwijk F, Crossa J, Ribaut J (2006) Mapping QTLs and QTL x environment interaction for CIMMYT maize drought stress program using factorial regression and partial least squares methods. *Theor. Appl. Genet.* 112 (6): 1009-1023.

Zeng Z (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468.

UNIDAD 4



Propuestas de Bioseguridad

Tema 12**Diseño de un programa de bioseguridad para el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí****Johann Parrales V, Raul Fernández, Blanca Indacochea G**

Estudiar no es un acto de consumir ideas, si de crearla y recreala.

Paulo Freire

Resumen

Los procesos biotecnológicos que se desarrollan en la Universidad Estatal del Sur de Manabí, por su alto riesgo biológico, generan impactos negativos al medioambiente, y no se cuenta con un programa de bioseguridad para mitigar o prevenir sus efectos. A través del presente estudio se presentó el diseño de un programa de bioseguridad para mitigar el riesgo biológico del laboratorio y sus impactos negativos. Para la materialización de la investigación, se realizó una evaluación detallada de la actividad que se desarrolla en el laboratorio de biotecnología, a fin de identificar y evaluar los impactos al medio que se generan. Se utilizó como *universo* para determinar el tamaño de la muestra al personal que trabaja en el laboratorio y el resto del personal de la UNESUM involucrados en el quehacer del mismo, se determinaron los elementos contaminantes del medio ambiente, caracterizándolos en cantidad y clases; se registraron las incidencias al personal que labora vinculado al laboratorio de biotecnología mediante encuestas con sus técnicas del cuestionario y la observación científica, cuyos resultados sirvieron de base para la elaboración de la propuesta de un programa de bioseguridad. Como resultados fundamentales de la investigación, se obtuvieron la identificación y evaluación de los impactos ambientales que provoca el referido laboratorio, la caracterización de la calidad de aguas servidas provenientes de las descargas del mismo, y el diseño de un programa de bioseguridad que permita mitigar el impacto que sobre la salud humana y el entorno generará el laboratorio de biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí. Los resultados de la presente investigación, se entregaron a la máxima dirección de la UNESUM para su validación e implementación.

Palabras clave: Biotecnología, impactos ambiental, bioseguridad, laboratorio.

Summary

Design of a Biosecurity program for the Biotechnology Laboratory of the State University of Southern Manabí

The biotechnological processes that are developed at the State University of Southern Manabí, due to their high biological risk, generate negative impacts to the environment, and there is no a biosecurity program to mitigate or prevent its effects. Through this study, the design of a biosecurity program to mitigate the biological risk of the laboratory and its negative impacts was submitted. For the research materialization, a detailed evaluation of the activity was carried out in the biotechnology laboratory, in order to identify and evaluate the impacts to the environment in which are generated. It was used as an **universe** to determine the size of the sample to the personnel working in the laboratory and to the rest of the UNESUM personnel involved in the same work; the polluting elements of the environment were determined, characterizing them in amount and types; the incidents of personnel working in the biotechnology laboratory were recorded through surveys of their questionnaire techniques and scientific observation. These results provided the basis for the preparation of a biosecurity program proposal. As fundamental results, the identification and evaluation of the environmental impacts caused by the laboratory were obtained, the characterization of the wastewater quality coming from the laboratory draining, and the design of a biosecurity program to mitigate the impact on human health and the environment, will generate the biotechnology laboratory of the State University of Southern Manabí. The results of the present research, were given to the Top Leader of UNESUM, for its validation and implementation.

Keywords: Biotechnology, environmental impacts, biosecurity, laboratory.

Introducción

La biotecnología ha sido utilizada por el hombre desde los comienzos de la historia, en actividades tales como: la preparación del pan y de bebidas alcohólicas o el mejoramiento de cultivos y de animales domésticos. Procesos como la producción de cerveza, vino, queso y yogurt implican el uso de bacterias o levaduras con el fin de convertir un producto natural como la leche, en un producto de fermentación más apetecible como el yogurt.

En términos generales, biotecnología es el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre. La biotecnología moderna está compuesta por una variedad de técnicas derivadas de la investigación en biología celular y molecular, que pueden ser usadas en cualquier industria que utilice microorganismos o células vegetales o animales. Por tanto, se puede decir que la biotecnología abarca desde la biotecnología tradicional para la fermentación de alimentos, hasta la biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas del ADN (ingeniería genética), los anticuerpos monoclonales y los nuevos métodos de cultivo de células y tejidos. Existe una cronología de descubrimientos claves para el desarrollo de la biotecnología:

- 1928-Fleming descubre la penicilina y se produce masivamente en la Segunda Guerra Mundial.
- 1953-El bioquímico americano James Watson y el biofísico Francis Crick anuncian la estructura en doble hélice del ADN o código genético.

- 1960-Severo Ochoa hace copias del material genético en laboratorio y descubre el código genético, descifra la clave en la que están escritos los mensajes del material genético.
- 1978- Se descubren las enzimas de restricción, que cortan el material genético por lugares determinados. Se clonó el gen de la insulina humana.
- 1983- Se desarrolla la primera planta mediante ingeniería genética, a partir de una planta del tabaco.

Se inventa la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa), que permite copiar genes específicos con gran rapidez. Es una técnica muy poderosa para producir millones de copias de una región específica de ADN, que permite analizarla tan rápido como se puede purificar una sustancia química. PCR ha sido el instrumento esencial en el desarrollo de técnicas de diagnóstico, medicina forense y la detección de genes asociados con errores innatos del metabolismo.

- 1988-La Universidad de Harvard patenta por primera vez un organismo producido mediante ingeniería genética, un ratón.

Se crea la organización HUGO para llevar a cabo el Proyecto Genoma Humano: identificar todos los genes del cuerpo humano.

La Declaración de la FAO (2000), sobre la biotecnología dice: «La FAO reconoce que la ingeniería genética puede contribuir a incrementar la producción y productividad en la agricultura, silvicultura y pesca. Puede dar lugar a mayores rendimientos en tierras marginales de países donde actualmente no se pueden cultivar alimentos suficientes para alimentar a sus poblaciones... No obstante, la FAO reconoce también que existe preocupación debido a los riesgos potenciales que plantean algunos aspectos de la biotecnología. Tales riesgos pueden clasificarse en dos categorías fundamentales: los efectos en la salud humana y de los animales y las consecuencias ambientales».

Como parte de las múltiples funciones de los gobiernos municipales, de los organismos del estado, de las direcciones administrativas de las empresas del sector productor de bienes y servicios, de los centros de investigaciones y de centros educacionales, en especial las universidades, tanto, estatales como privadas, se encuentra la protección y preservación del medio ambiente. En la presente investigación se propone evaluar el impacto ambiental ocasionado por el laboratorio de biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), así como los niveles de riesgo que pueden correr sus trabajadores y el personal vinculado indirectamente a estas instalaciones, con el objetivo de proponer un programa de bioseguridad adecuado a las características de este laboratorio.

El propósito de la investigación, fue evaluar el impacto ambiental que puede ocasionar al medio, así como evitar las afectaciones al personal directa e indirectamente vinculados al laboratorio de biotecnología de la UNESUM, causados por la actividad biológica que se desarrolla, y por el uso de diversos compuestos químicos normalmente utilizados en los procesos biotecnológicos que allí se ejecutan. A partir de la caracterización de los efectos negativos que puede generar esta instalación, el objetivo fue proponer un programa de bioseguridad para contrarrestar y mitigar los impactos generados por el laboratorio de biotecnología.

El presente problema, tiene sus orígenes básicamente en los niveles de riesgo que implica trabajar con organismos genéticamente modificados, así como el manejo de los procesos biotecnológicos y los residuos que en este tipo de proceso se generan. El no conocer la magnitud de los impactos

ambientales y de los niveles de riesgos presentes en este tipo de instalación y el no contar con un programa de bioseguridad para contrarrestar los efectos nocivos que se puedan generar y provocar afectaciones al medio, y a los trabajadores vinculados directamente a esta instalación, así como a otros indirectamente vinculados a la misma. El objetivo es Diseñar un programa de bioseguridad para el laboratorio de biotecnología de la UNESUM que permita su correcto funcionamiento, acorde a las normativas internacionales.

Trabajos de investigación realizados

No existen antecedentes similares al de la presente investigación en el cantón Jipijapa, ni en la provincia de Manabí, solo se cuenta con la experiencia acumulada en la literatura publicada sobre estos procesos por diversos y reconocidos autores con años de experiencia en esta temática.

Métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología (LB) de la UNESUM, ubicado en la ciudad de Jipijapa, Provincia de Manabí.

Para la materialización de la misma se ejecutaron las siguientes actividades:

- Revisión de trabajos similares realizados en el país o en otros países (Métodos teóricos, analíticos y deductivos).
- Encuestas a los trabajadores del laboratorio de biotecnología de la UNESUM, así como a otros especialistas relacionados con esta instalación, y a autoridades de la UNESUM. (Métodos empíricos).
- Identificación de los principales impactos ambientales presentes en el área objeto de estudio. (Métodos empíricos de la encuesta, a través de las técnicas de la observación y el cuestionario).
- Caracterización de los indicadores de calidad de las aguas residuales del laboratorio. (Química analítica).
- Propuesta de programa de bioseguridad para contrarrestar y mitigar los impactos que puedan producirse por los procesos biotecnológicos que se desarrollan en el laboratorio de biotecnología de la UNESUM.

Resultados

Como resultados de la investigación se obtuvieron:

- Identificación y evaluación de los principales impactos ambientales provocados por el accionar del laboratorio de biotecnología de la UNESUM.
- Clasificación y volumen de los residuos sólidos generados en el laboratorio de biotecnología de la UNESUM.
- Caracterización de la calidad de las aguas residuales del laboratorio de biotecnología.
- Propuesta de un programa de bioseguridad para el laboratorio de biotecnología de la UNESUM.

Impactos generados

- **Ambiental:** Con la propuesta de un programa de bioseguridad para el funcionamiento del laboratorio de bioseguridad de la UNESUM, así como para el manejo y control de los residuos que se generan en el mismo, se permitió incrementar la eficiencia de la gestión ambiental de la UNESUM, a la vez que se cuenta con una herramienta de trabajo eficaz para contrarrestar los efectos negativos que sobre el medio y las personas provoca el funcionamiento de este laboratorio.
- **Social:** La propuesta de un programa de seguridad biológica para el LB de la UNESUM, permitió que los procesos biotecnológicos que allí se desarrollan no sean nocivos al medio ambiente y a la salud humana, a la vez que permitió la propagación masiva de especies maderables, frutales y otros cultivos, lo cual incide positivamente en el desarrollo de la agricultura del cantón y con ello en la calidad de vida de sus pobladores.
- **Económico:** La propagación masiva de plántulas de plátano, tomate, frutales y otras especies de interés económico redundan en ingresos para los campesinos de la región, así como en ingresos para la UNESUM, los cuales pueden ser invertidos en otros programas de desarrollo de la universidad, para el cantón Jipijapa y la provincia de Manabí.

Planteamiento del problema

Los procesos biotecnológicos, de no ser manejados adecuadamente, y contar con un programa de bioseguridad para contrarrestar sus efectos, constituyen una seria fuente de contaminación y riesgo biológico que afecta no solo al medio, sino también a las personas vinculadas directa e indirectamente a estos menesteres. Las características de estos procesos implican el trabajar con organismos vivos y con una gran cantidad de productos químicos que pueden no solo generar aguas residuales contaminadas, si no también contaminar a los trabajadores vinculados a los mismos.

En el caso del laboratorio de biotecnología (LB) de la UNESUM, aunque por sus características se cataloga como una instalación con Nivel de Riesgo 1, no por ello, sus residuales, los procesos y productos que allí se manipulan dejan de constituir una fuente de contaminación, tanto para el medio ambiente como para el ser humano, lo cual implica que esos potenciales impactos deben ser rigurosamente evaluados y se debe contar con un plan de acción dirigidas a contrarrestar y mitigar los impactos que pueda ocasionar esta instalación.

Materiales y métodos

Lugar de la investigación

La presente investigación se realizó en la ciudad de Jipijapa, en la UNSUM, específicamente en su laboratorio de biotecnología y el entorno donde se encuentra ubicado.

Universo

Para el presente estudio, el universo es el laboratorio de biotecnología de la UNESUM y su entorno, donde se incluyen: el personal directa e indirectamente vinculados al laboratorio, y los residuos generados por el mismo (sólido y líquido).

Muestra

El tamaño de la muestra se halla determinada de la siguiente forma:

1.- Para la realización de la encuesta buscando información por parte del personal vinculado al laboratorio, se tuvo en cuenta lo siguiente:

Composición	Población total	Tamaño de muestra
Trabajadores directamente vinculados al LB	6	Todos encuestados
Trabajadores indirectamente vinculados al LB	7	Todos encuestados
Funcionarios vinculados al LB	3	Todos encuestados

Fuente: Dirección de Recursos Humanos de la UNESUM (Año 2012).

2.- Para la clasificación y determinación del volumen de residuos sólidos generados por el laboratorio de biotecnología, se pesaron diariamente y durante un mes todos los residuos sólidos dispuestos.

3.- Para la caracterización de las aguas residuales del laboratorio, se tomaron muestras semanales durante un mes tanto de las aguas albañales como de las aguas del proceso y las mismas fueron analizadas en los laboratorios de la Junta de Recursos Hidráulicos para los Cantones Paján – Jipijapa – Puerto López de la provincia de Manabí.

Métodos

El presente trabajo consiste en un análisis descriptivo y correlacional.

Diseño de investigación

Es una investigación no experimental. Los métodos utilizados fueron:

Métodos teóricos

- **Método inductivo:** Se hizo un análisis de la situación actual de la contaminación provocada por la realización de procesos biotecnológicos, y las consecuencias que provocan los impactos que se generan sobre el medio y sobre la salud de las personas vinculadas a estos procesos.
- **Método descriptivo:** Mediante la observación directa en la zona donde se ubica el laboratorio, se realizó un examen crítico del deterioro ambiental de ese sector, lo cual permitió sentar las pautas para diseñar un programa de bioseguridad para contrarrestar y mitigar los efectos de los impactos a generarse por este laboratorio, así como para el control y manejo de los residuos que a diario se generan en el mismo.
- **Método dialéctico:** En los momentos de contraposición de opiniones, determinación de relación causa-efecto y otros pares dialécticos que se presentó en la discusión teórica y evidencias de la práctica social.

- **Método hermenéutico - dialéctico:** El cual permitió la recolección de la información desde la documentación disponible, haciendo una interpretación en su contexto histórico, social, político y administrativo.

Métodos empíricos

- **Método de la encuesta:** Fue aplicado para evaluar los aspectos relacionados con el grado de capacitación y preparación que sobre las temáticas de biotecnología, procesos biotecnológicos, contaminación, manejo y control de residuos, impacto ambiental y otros temas relacionados con la situación problemática presente en esta investigación, y fueron encuestados los trabajadores y funcionarios directa e indirectamente vinculados con el laboratorio de biotecnología de la UNESUM. Dentro de este método se emplearon las técnicas del cuestionario y la observación. El cuestionario se dirigió a los funcionarios y trabajadores directa e indirectamente vinculados al laboratorio, con la finalidad de receptor la información necesaria para determinar, la situación ambiental del mismo, su incidencia en la calidad ambiental de la zona, así, como el nivel de aplicación de las ordenanzas establecidas por parte de las autoridades universitarias. Se empleó la técnica de la observación directa y la toma de fotos demostrativas en la recolección de la información en todos los aspectos pertinentes que permitan determinar los principales impactos ambientales, así como para corroborar los resultados del cuestionario, para su análisis más eficiente.
 - **Análisis documental:** Para identificar la incidencia de la administración, de los trabajadores del LB, así, como de los trabajadores de la UNESUM, sobre el deterioro ambiental del laboratorio y su área de influencia, se efectuó un análisis de los documentos, tales como: reportes de incidencias ambientales, y la opinión de los trabajadores y administrativos de la universidad, entre otras.
 - **Química analítica:** Para determinar la calidad del agua residual del laboratorio, se realizó la caracterización física- química y microbiológica de las mismas, con el objetivo de proponer medidas para recuperar neutralizar su grado de contaminación, antes de ser dispuestas.
 - **Métodos estadísticos:** Para tabular, presentar e interpretar los datos surgidos de la investigación, se utilizaron los métodos de recolección, descripción, visualización y resumen de datos originados, a partir de los fenómenos de estudio.

Resultados

Impactos ambientales

Para determinar las afectaciones ambientales presentes en el área donde se ubica el laboratorio de biotecnología de la UNESUM, se realizó por parte del autor y de un equipo de especialistas de la carrera de Ingeniería Ambiental de esta universidad un control exhaustivo a esa zona. El estado actual, se comparó con el estado de la zona, antes de acometerse la inversión del laboratorio (mediante el análisis de fotos del área antes del inicio del proceso constructivo y, a través de las vivencias de los fundadores de la UNESUM, amplios conocedores de las características de estas áreas).

Los principales impactos se resumen a continuación:

1. Severa erosión de los suelos: más del 70% de los suelos se encuentran erosionados producto a las excavaciones, al movimiento de tierra y, a la construcción de viales de acceso. Se han creado laderas de pendientes pronunciadas proclives al deslave en período de lluvia, lo cual incrementa paulatinamente el proceso de erosión en la zona (Figura 1).



Figura 1. Erosión y deforestación presentes en el área donde se construyó el laboratorio de biotecnología de la UNESUM.

2. Deforestación de la zona: esta área estaba anteriormente cubierta de vegetación típica de la zona. Para acometer la inversión se deforestó una extensa superficie, lo cual ha provocado la migración de la fauna de ese hábitat, fundamentalmente especies de aves y de reptiles, así como de especies de la flora típicas del sitio como la *Cordia alliodora* (Laurel) y la *Cedrela odorata* (Cedro) (Figura 2).



Figura 2. Deforestación provocada por la construcción del laboratorio de biotecnología de la UNESUM

3. Exceso de polvo y lodo: al no ser asfaltados los viales, ni reforestadas las áreas aledañas al laboratorio con especies forestales, ni establecerse áreas verdes en ese entorno fundamentalmente en las laderas de las pendientes, existe una alta contaminación atmosférica por el exceso de polvo en período seco, además cuando llueve; cosa frecuente en la zona; el lodo hace prácticamente imposible el acceso al laboratorio al encontrarse éste en una zona elevada dentro de las áreas de la UNESUM, además el peligro de deslaves hace dificultoso el acceso en época de lluvias.
4. Microvertederos de residuos sólidos: en la zona se conservan parte de los residuos de la construcción (madera, arena, gravas), así como se acumulan los desechos generados en el laboratorio, tales como cartón, papeles, nylon, plásticos, residuos vegetales; entre otros.
5. Vertimiento de residuos líquidos: tanto los residuos albañales como el agua de limpieza de la cristalería del laboratorio y las sustancias químicas utilizadas en el mismo se vierten por los desagües, siendo su destino final las cañadas y el río Jipijapa.
6. Afectaciones al medio provocadas por el vertido de productos químicos y biológicos: aunque el laboratorio se encuentra en su etapa inicial de puesta en marcha, el riesgo biológico al no contar con un programa de bioseguridad, es un impacto potencial presente que puede afectar a los trabajadores del mismo, así como a otros trabajadores que se vinculen indirectamente con estas instalaciones. A medida que el volumen de trabajo se incremente en este local, los riesgos aumentarán paulatinamente, pues el vertido de productos químicos y biológicos se acrecentará.

Esta situación ambiental general presente en el entorno donde se ubica el laboratorio de biotecnología de la UNESUM, es el fiel reflejo de la materialización de una inversión que no contó con estudio previo de impacto ambiental y, por consiguiente, adoleció de un plan de medidas para la rehabilitación ambiental de la zona de intervención.

Cuantificación de residuos

Para determinar el volumen y tipo de residuos que se generan en el laboratorio de biotecnología de la UNESUM, se pesaron y clasificaron diariamente y durante un mes los residuos sólidos derivados de los procesos cotidianos de esta instalación, así, como se midieron los volúmenes de residuos líquidos vertidos por el laboratorio, tanto los albañales como los propios de los procesos biotecnológicos y la limpieza de los locales. Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 1

Tabla 1. Volumen y tipo de residuos generados en el laboratorio de biotecnología de la UNESUM.

Tipo de residuo	Volumen diario	Volumen mensual
Residuos vegetales	3 Kg	72 Kg
Cartón	2.5 Kg	60 Kg
Papel	2 Kg	48 Kg
Nylon (bolsas y sacos)	2.5 Kg	60 Kg
Vidrio	2.2 Kg	52.8 Kg
Plásticos	0.8 Kg	19.2 Kg
Aguas albañales	230 litros	5520 litros
Aguas de los procesos	225 litros	5400 litros

Fuente: Elaboración propia

Los residuos sólidos que se generan en el laboratorio, son en su mayoría no biodegradables por lo que la incorrecta disposición de los mismos, provoca la creación de microvertederos, los cuales constituyen una fuente ideal para la proliferación de vectores de contaminación como moscas, cucarachas, ratas, entre otros, transmisores todos ellos de enfermedades para el ser humano. Con respecto, a los residuos líquidos, su nivel de contaminación contribuye a la contaminación de los suelos y de las fuentes de agua cercanas al laboratorio. Esta situación con los residuos impone de inmediato el establecimiento de un programa de manejo para los residuos sólidos generados por esta instalación, así, como un sistema de tratamiento de aguas residuales (contaminación química y biológica), ya que si en los momentos actuales, sus volúmenes no son tan significativos por encontrarse el laboratorio en la etapa inicial de puesta en marcha, en la medida en que los procesos biotecnológicos aumenten, estos residuos se irán incrementando en cantidad, por lo que la carga contaminadora que aporte este laboratorio al medio, será mucho mayor y los impactos negativos se harán más significativos y perjudiciales.

A través de las técnicas de la química analítica se caracterizaron las aguas residuales de los procesos del laboratorio de biotecnología de la UNESUM, así, como sus aguas albañales.

Estos análisis se realizaron, a partir de la implementación de la Norma de Calidad Ambiental y de descarga de Efluentes (Tabla 2). La presente norma técnica ambiental es dictada bajo el amparo de la Ley de Gestión Ambiental y del Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental del Ecuador, y se somete a las disposiciones de éstos, es de aplicación obligatoria y rige en todo el territorio nacional.

Tabla 2. Parámetros considerados para evaluación del agua.

Parámetros	Unidad	Resultados	Límites máximos permisibles
Turbiedad	NTU	42	66-110
PH		8.3	7.25 – 8.22
Temperatura	°C	28.4	≤ 40
Conductibilidad eléctrica	uS/cm	4022	1560 – 3410
Sólidos totales disueltos	mg/l	2283	746 – 1720

La presente norma técnica determina:

- Los límites permisibles, disposiciones y prohibiciones para las descargas en cuerpos de aguas o sistemas de alcantarillado;

- b) Los criterios de calidad de las aguas para sus distintos usos; y,
 c) Métodos y procedimientos para determinar la presencia de contaminantes en el agua.

Los resultados de esta caracterización física - química y microbiológica para determinar el nivel de contaminación de las aguas vertidas por el laboratorio de biotecnología de la UNESUM, ubicada en el cantón Jipijapa de la provincia Manabí, se tramitaron, a través de la Junta de Recursos Hidráulicos, institución de desarrollo de obras básicas de los cantones Jipijapa, Paján y Puerto López. Los mismos se muestran a continuación:

Tabla 3. Caracterización de las aguas residuales del proceso de los laboratorios de biotecnología de la UNESUM.

Análisis físico y químico

Parámetros	Unidad	Resultados	Límites máximos permisibles
Manganeso	mg/L Mn ²⁺	3.15	10
Sulfatos	mg/L SO ₄ ⁼	423,6	400
Nitratos	mg/L No ³⁻ _N	11.87	1.1 – 2.4
Nitritos	mg/L No ²⁻ _N	1.16	0.077 – 0.33
Cromo	mg/L Cr ²⁺	0.35	0.004 – 0.042
Cadmio	mg/L Cd ²⁺	0.1	0 – 0.0277
Plomo	mg/L Pb ²⁺	0.64	0 – 0.522
Cobre	mg/L Cu ²⁺	0.04	0.163 – 0.439
Hierro total	mg/L Fe ³⁺	0.36	≤ 25
Aceites y grasas	Sustancias solubles en hexano (mg/L)	0.21	0.3
DQO	mg/L O ₂	932	116 – 450
DBO 5	mg/L O	394	75 – 262

Análisis microbiológico

Coliformes totales	NMP/100ml	32	Remoción al 99.9%
Coliformes fecales	NMP/100ml	Ausencia	Remoción al 99.9%

Fuente: Laboratorio de agua de la JRH, 2012.

En amarillo rojo se resaltan los parámetros cuyos valores se encuentran por encima de los límites máximos permisibles y que son los responsables del impacto ambiental que genera al medio el vertido de aguas residuales del laboratorio de biotecnología

Tabla 4. Caracterización de las aguas albañales del laboratorio de biotecnología de la UNESUM.**Análisis físicos**

Parámetros	Unidad	Resultados	Límites máximos permisibles
Turbiedad	NTU	245	66 - 110
Olor		Materia orgánica	-
PH		7,5	7.25 – 8.22
Temperatura	°C	26,2	≤ 40
Conductibilidad eléctrica	uS/cm	2019	1560-3410
Sólidos totales disueltos	mg/L	2409	746-1720

Análisis químicos

Parámetros	Unidad	Resultados	Límites máximos permisibles
Manganeso	mg/L Mn ²⁺	1.17	10
Sulfatos	mg/L SO ⁴⁼	323.6	400
Nitratos	mg/L No ³⁻ _N	11.7	1.1 – 2.4
Nitritos	mg/L No ²⁻ _N	0.17	0.077 – 0.33
Cromo	mg/L Cr ²⁺	0.026	0.004 – 0.042
Cadmio	mg/L Cd ²⁺	0.001	0 – 0.0277
Plomo	mg/L Pb ²⁺	0.01	0 – 0.522
Cobre	mg/L Cu ²⁺	0.03	0.163 – 0.439
Hierro total	mg/L Fe ³⁺	0.35	≤ 25
DQO	mg/L O ₂	412	116 - 450
DBO 5	mg/L O	668	75 - 262

Análisis microbiológicos

Coliformes totales	NMP/100 mL	2023	Remoción al 99,9%
Coliformes fecales	NMP/100 mL	1308	Remoción al 99,9%

Fuente: Laboratorio de agua de la JRH, 2012

En amarillo se resaltan los parámetros cuyos valores se encuentran por encima de los límites máximos permisibles y que son los responsables del impacto negativo causado al medio por la disposición de estas aguas.

Por lo que se observa de los resultados de la caracterización físico-química y microbiológica de las aguas residuales generadas en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, tanto, las aguas de los procesos biotecnológicos unidas a las aguas de limpieza del local (contaminación química), como las aguas albañales generadas (contaminación biológica), ambas están contaminadas sobrepasando los límites máximos permisibles establecidos para diversos parámetros (señalados en amarillo en las tablas 3 y 4) según la TABLA 11 “LÍMITES DE DESCARGA AL SISTEMA DE ALCANTARILLADO PÚBLICO”, lo cual alerta a las autoridades de la UNESUM, sobre la conveniencia de implementar sistemas de tratamiento

para residuales líquidos en este laboratorio, máxime teniendo en cuenta que la tendencia es al incremento de los procesos biotecnológicos a desarrollar en esta instalación.

En este análisis de impactos ambientales no se han tenido en cuenta aún los impactos al medio por la actividad biotecnológica, que son los daños que esta actividad a desarrollar en el laboratorio puede causar, tanto, al medio físico (suelo, agua, aire), como al ser humano, a otros seres vivos y a la sociedad, no sólo en aspectos de salud, si no, también en aspectos económicos; lo cual requerirá del establecimiento de un programa de seguridad biológica (conjunto de medidas y normas preventivas, destinadas a mantener el control de factores de riesgo laborales procedentes de agentes biológicos, físicos o químicos, logrando la prevención de impactos nocivos frente a riesgos propios de su actividad diaria) que es el objetivo principal del presente estudio.

Resultados de la encuesta

Los resultados de la aplicación de la encuesta, se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Respuestas a las preguntas de la encuesta aplicada a los funcionarios y trabajadores del laboratorio de biotecnología de la UNESUM.

Pregunta	Si	No	No sé	Total	% si	% no	% no sé
1	10	6	-	16	62.50	37.50	0.00
2	7	6	3	16	43.75	37.50	18.75
3	4	3	9	16	25.00	18.75	56.25
4	4	4	8	16	25.00	25.00	50.00
5	2	14	-	16	12.50	87.50	0.00
6	14	-	2	16	87.50	0.00	12.50
7	12	4	-	16	75.00	25.00	0.00
8	7	9	-	16	43.75	56.25	0.00
9	16	-	-	16	100.00	0.00	0.00
10	16	-	-	16	100.00	0.00	0.00

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de la pregunta No. 1 del cuestionario muestran que aunque el 62.5% de los encuestados identifican correctamente los factores que dificultan la gestión ambiental en la Universidad Estatal del Sur de Manabí, un 32.5 no reconoce que existan dificultades en la gestión ambiental, lo que denota desconocimiento en materia ambiental o el temor a declarar aspectos negativos que afectan el quehacer de la institución. En la Figura 1, se muestran los principales factores señalados por los encuestados que reconocen dificultades en la gestión medioambiental de la UNESUM.

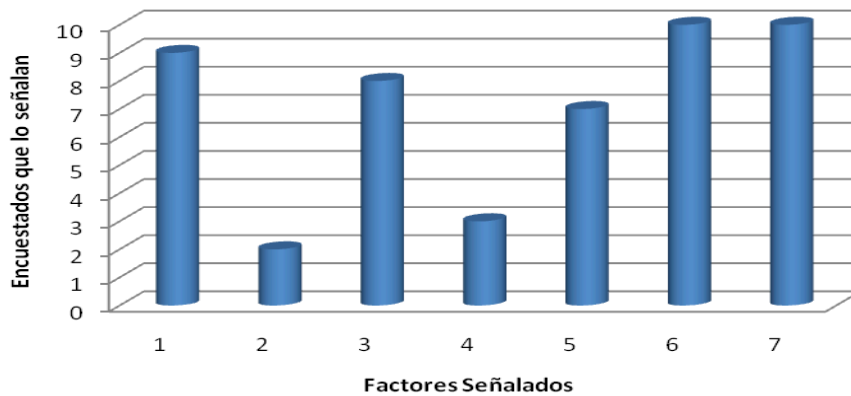


Figura 1. Principales factores que dificultan la gestión ambiental en la UNESUM.

Factores señalados

1. Falta de planificación en la construcción de los edificios en la UNESUM y carencia de los estudios de impacto medioambiental correspondientes.
2. Poca participación del departamento de áreas verdes y de la Carrera Ambiental en la planificación constructiva.
3. Insuficiente conocimiento ambiental en la UNESUM.
4. Falta de profesionales con altos conocimientos en materia medioambiental.
5. La componente ambiental no se tiene en cuenta en la UNESUM.
6. Inexistencia de planes de manejo ambiental en la UNESUM.
7. Insuficientes recursos económicos en función de la gestión ambiental.

Con respecto a las respuestas brindadas por los encuestados al referirse a la pregunta No. 2, sólo siete de ellos (43.7%) identifican adecuadamente los impactos ambientales presentes en la zona donde se ubica el laboratorio; seis, plantean la no existencia de afectaciones ambientales y; tres, desconocen el tema o eludieron responder sobre el mismo. Para este caso, se manifiesta igualmente el desconocimiento existente en cuanto a materia medioambiental o la falta de compromiso, con este aspecto tan sensible, por parte del 56.3% de los encuestados. Los impactos reconocidos por los que respondieron “Si” a esta pregunta, coinciden con los resultados obtenidos por el autor y un grupo de especialistas en el levantamiento que se realizó de la zona estudiada. Los impactos reconocidos por los encuestados se muestran en la Figura 2.

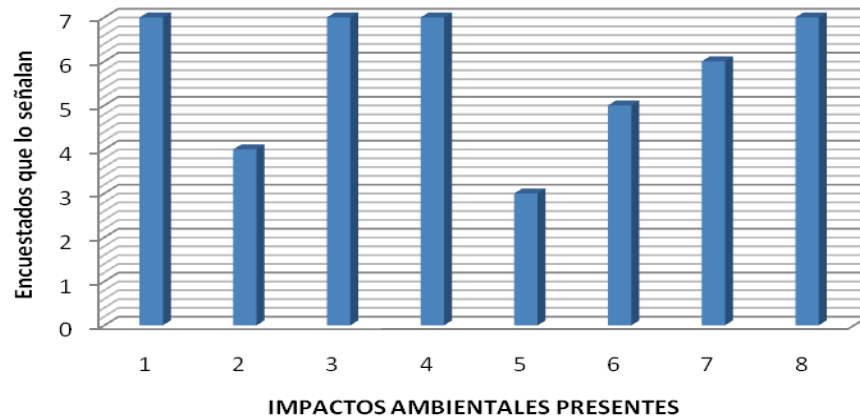


Figura 2. Impactos ambientales señalados por los trabajadores y funcionarios encuestados.

Impactos ambientales señalados

1. Afectaciones al medio provocadas por el vertido de productos químicos y biológicos.
2. Migración de especies animales nativas de la zona (aves y reptiles).
3. Pérdida en el lugar de especies de plantas típicas de la zona como *Cordia alliodora* y *Cedrela odorata* (deforestación).
4. Contaminación por mal manejo de residuos sólidos.
5. Afectaciones paisajísticas.
6. Contaminación por polvo y lodo (cuando llueve) por la no pavimentación de las vías de acceso y la no reforestación de la zona.
7. Severa erosión de los suelos.

En la pregunta No. 3, el 66.6% de los trabajadores directamente vinculados al laboratorio (25% del total de encuestados), conocen el tipo y cantidad de volumen de residuos que genera esta instalación. De estos resultados se infiere que la implementación de un plan de manejo de residuos y la capacitación en materia medioambiental resulta indispensable para el correcto desempeño del laboratorio, sin que ocurran afectaciones al medio y a las personas, en general.

En la respuesta a la pregunta No. 4, los cuatro trabajadores directamente vinculados a los procesos que se desarrollan en el laboratorio de biotecnología, manifiestan conocer posibles usos para los residuos que se generan en esta instalación.

El 87.5% de las personas encuestadas manifiestan en sus respuestas a la pregunta No. 5 del cuestionario, que el personal que se vincula al laboratorio de biotecnología no se encuentra debidamente capacitado en materia medioambiental, y mucho menos en la temática correspondiente a bioseguridad. La respuesta a esta pregunta coincide con lo registrado en la pregunta No. 1, donde varios de los factores señalados como aspectos que dificultan la gestión ambiental en la UNESUM, están directamente relacionados con la deficiente cultura ambiental existente en el lugar.

Los beneficios que un programa de bioseguridad puede aportar para conservar la salud de los trabajadores del laboratorio de biotecnología de la UNESUM, así como la calidad ambiental de la zona donde se ubica el mismo, es reconocida por el 87.5% de los encuestados en sus respuestas a la pregunta No. 6 del cuestionario, aspecto muy significativo, a pesar de la insuficiente cultura ambiental existente entre el personal que se vincula de una forma u otra al quehacer de esta instalación en la UNESUM.

El 75% de los encuestados manifiestan en sus respuestas a la pregunta No. 7 del cuestionario que un deficiente manejo de los procesos biotecnológicos en el laboratorio de biotecnología de la UNESUM, afectará sensiblemente a la calidad ambiental del entorno y, a la salud de las personas donde se encuentra ubicado el mismo, motivado fundamentalmente a los tipos de procesos y a las sustancias que en este tipo de instalación se utilizan. El 25% de los encuestados no creen que esta instalación pueda afectar ni al medio físico, ni a las personas.

Sólo el 43.7% de los encuestados manifiestan en sus respuestas a la pregunta No. 8 del cuestionario, conocer cómo lograr la rehabilitación de la zona donde se ubica el LB de la UNESUM, y de hecho proponen acciones dirigidas a este fin. El 56.3% de los encuestados restantes, reportan no saber cómo mitigar el deterioro ambiental presente en la zona estudiada y de hecho coinciden con sus respuestas a la pregunta No.2 donde no reconocen deterioro ambiental en dicha zona. Las acciones propuestas se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Propuestas para rehabilitar la zona de estudio por parte de los encuestados.

Propuestas para rehabilitar la zona	Encuestados que lo proponen
Reforestar el área con las especies nativas de la zona	7
Implementar un programa de bioseguridad para el funcionamiento del laboratorio	7
Aplicar planes de manejo ambiental en la UNESUM	6
Implementar sistemas de tratamiento de residuales para los residuos que se generan en el laboratorio especialmente los residuos líquidos	7
Reciclar o reutilizar los residuos que sean factibles para ello	5
Ejecutar programas de educación ambiental en la UNESUM	6
Pavimentar las vías de acceso e implementar áreas verdes en la zona para controlar la erosión de los suelos	7

Fuente: Elaboración propia

El 100% de los encuestados, coinciden en señalar en sus respuestas a las preguntas No. 9 y No. 10 del cuestionario, que con la puesta en marcha del laboratorio de biotecnología de la UNESUM, mejorará la calidad de vida de los pobladores de la zona, a partir de la producción masiva de vitroplantas como producto de los procesos biotecnológicos que allí se desarrollan, así, como coinciden en señalar la importancia de implementar un programa de educación ambiental dirigido a los trabajadores del laboratorio de biotecnología, igualmente al resto de la comunidad universitaria de la UNESUM, para elevar la cultura ambiental y lograr el reconocimiento de las ventajas que para la referida universidad, trae contar con este tipo de instalación

Propuesta de un programa de bioseguridad

Como resultado principal de la investigación se propone un programa de bioseguridad para mitigar el riesgo biológico que a la salud humana y al medio físico, en general puede generar el laboratorio de biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, ubicada en la ciudad de Jipijapa, cantón Jipijapa, provincia de Manabí.

Programa de bioseguridad

Introducción

La seguridad biológica o bioseguridad es la aplicación del conocimiento, las técnicas y el equipamiento para prevenir la exposición del personal, el laboratorio y el medio ambiente a agentes potencialmente infecciosos o biopeligrosos. El riesgo biológico puede producirse en los laboratorios donde se trabaja con microorganismos, con cultivos celulares o se experimenta con animales, también existe este riesgo biológico cuando se efectúan actividades médicas y paramédicas con seres humanos.

La bioseguridad define las condiciones de contención, bajo las cuales los agentes infecciosos se pueden manipular con seguridad. El objetivo de la contención es confinar los peligros biológicos y reducir la exposición, de las personas que trabajan en el laboratorio, las personas que están fuera del laboratorio y el medio ambiente a agentes infecciosos en potencia.

La contención se puede llevar a cabo mediante los siguientes medios:

Contención Primaria: protección del personal y del ambiente del laboratorio, mediante la utilización de buenas técnicas microbiológicas (práctica en el laboratorio), y el uso de equipos de seguridad apropiados.

Contención Secundaria: protección del ambiente exterior al laboratorio de la exposición a materiales infecciosos, mediante la combinación de:

- el diseño de las instalaciones y
- los hábitos de trabajo seguros.

Se puede hacer una combinación de hábitos de trabajo seguros, equipos de contención y un diseño especial del laboratorio para conseguir diferentes niveles de contención física.

De forma general existen cuatro niveles de bioseguridad, cada uno de los cuales definen la contención necesaria para proteger al personal y al medio ambiente:

Nivel de Bioseguridad 1 (NB-1): es el menos restrictivo de todos. Es aquel que corresponde a las actividades desarrolladas en un laboratorio básico, por personal adiestrado en los procedimientos que se ejecutan en él.

Nivel de Bioseguridad 2 (NB-2): es aquel que corresponde a las actividades desarrolladas en un laboratorio básico, por personal adiestrado en el manejo de agentes de riesgo moderado para el personal y el ambiente.

Nivel de Bioseguridad 3 (NB-3): es aquel que corresponde a las actividades desarrolladas en el laboratorio de contención. El personal debe contar con adiestramiento específico para el manejo de agentes de alto riesgo.

Nivel de Bioseguridad 4 (NB-4): es aquel que corresponde a las actividades desarrolladas en el laboratorio de contención máxima. El personal debe estar específica y acuciosamente adiestrado en el manejo de agentes extremadamente de alto riesgo o ajenos a la flora habitual del país.

Criterios preventivos básicos

Los criterios fundamentales a tener en cuenta para el presente plan de bioseguridad son los siguientes:

- Identificación de los riesgos y evaluación de los mismos, determinando la índole, el grado y la duración de la exposición de los trabajadores.
- Sustitución de los agentes biológicos peligrosos por otros que no lo sean, o lo sean en menor grado.
- Implementación de planes de medidas para lograr la reducción de riesgos
- Reducir al mínimo posible el número de trabajadores expuestos a un agente biológico patógeno.
- Establecer procedimientos de trabajo y medidas técnicas adecuadas de protección, de gestión de residuos, de manipulación y transporte de agentes biológicos en el lugar de trabajo y de planes de emergencia frente a los accidentes que incluyan agentes biológicos.
- Adopción de medidas seguras para la recepción, manipulación y transporte de los agentes biológicos y residuos, incluyendo los recipientes seguros e identificables.
- Adopción de medidas de protección colectiva o, en su defecto, de protección individual, cuando la exposición no pueda evitarse por otros medios.
- Utilización de medidas de higiene que eviten o dificulten la dispersión del agente biológico, fuera del lugar de trabajo. Existencia de servicios sanitarios apropiados, en los que se incluyan productos para lavarse los ojos y/o antisépticos para lavarse la piel.
- Utilización de la señal de peligro biológico y otras señales de aviso pertinentes, así, como lograr acreditación del laboratorio, según las normas nacionales e internacionales vigentes, mostrando el sello correspondiente.



- Verificación, cuando sea necesaria y técnicamente posible, de la presencia de los agentes biológicos utilizados en el trabajo fuera del confinamiento físico primario.
- Formación e información a los trabajadores y/o a sus representantes en relación con: los riesgos potenciales para la salud, las disposiciones en materia de seguridad e higiene, la

utilización de los equipos de protección, las medidas que se han de adoptar en caso de incidente y para su prevención.

- Establecimiento de un control sanitario previo y continuado.

Propósito del programa de bioseguridad

Lograr que en el laboratorio de biotecnología de la UNESUM, se cumpla con el manejo correcto de residuos sólidos, con las normas de bioseguridad vigentes y con el sistema de vigilancia del riesgo biológico adecuadamente implementados, tanto para el laboratorio como para el resto de las instalaciones de la UNESUM.

Objetivo general

Asegurar el cumplimiento adecuado de las normas y procedimientos de manejo de residuos, bioseguridad, control y prevención de las infecciones y de la contaminación ambiental en el desempeño de los procesos biotecnológicos, mediante un plan de acciones dirigidas a la bioseguridad, de un programa de capacitación medioambiental, y del seguimiento, monitoreo y evaluación periódica de la efectividad del programa de bioseguridad que se propone.

Objetivos específicos

- Gestionar y conocer las normas nacionales e institucionales de manejo de residuos sólidos, residuos líquidos y de bioseguridad.
- Aplicar de manera permanente las normas de manejo de residuos sólidos, y líquidos y de bioseguridad en todos los procesos del laboratorio de biotecnología de la UNESUM.
- Asegurar, a través del control permanente el cumplimiento de las normas establecidas, obteniendo mayor calidad en la ejecución de los procesos.
- Implementar un programa de educación continua para la capacitación sobre manejo de residuos, bioseguridad y mitigación de impactos ambientales.
- Sensibilizar al personal del laboratorio, sobre la necesidad de denuncia obligatoria de accidentes laborales.
- Promover en el personal del laboratorio, el uso correcto de las barreras de protección.
- Informar a la comunidad universitaria, y a la población en general, acerca del manejo adecuado de residuos y de normas de bioseguridad, a través de personal del laboratorio como replicadores de la norma.

Alcance del programa de bioseguridad

El programa propuesto comprende acciones dirigidas, tanto a la mitigación de los impactos presentes en la zona, a la eliminación del riesgo biológico y sus posibles efectos sobre las personas y el medio físico, así, como a la educación ambiental de los trabajadores y funcionarios de la UNESUM vinculados directa e indirectamente a las labores del laboratorio de biotecnología, al resto de la comunidad universitaria y a la población de la ciudad de Jipijapa, en su contexto. Para lograr la máxima eficiencia en la implementación del programa de bioseguridad propuesto, resulta necesaria la participación directa de las autoridades universitarias, de los

trabajadores del laboratorio y de todo el personal que radica en el área de influencia del laboratorio.

Costo de implementación

Para lograr un sistema eficiente de control y manejo de los residuos sólidos y líquidos, así, como del riesgo biológico en el laboratorio de biotecnología de la UNESUM y su área de influencia, deberán diseñarse e implementarse diversos planes de acciones durante un período de 2 a 4 años. Cada programa está dirigido a un fin determinado y su costo aproximado se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7. Costo indicativo y alcance del programa de bioseguridad propuesto para el laboratorio de biotecnología de la UNESUM.

Alcance del sistema	Rubros	Costo indicativo
1.- Mitigación del impacto ambiental presente:	Trabajadores del laboratorio de biotecnología, Carrera de Ingeniería Medioambiental de la UNESUM, Dirección de Salud del cantón Jipijapa, Autoridades de la UNESUM.	440.000.00 USD
– Plan para el manejo de los residuos sólidos y líquidos en el laboratorio.		
– Programa de bioseguridad para la mitigación del riesgo biológico en el laboratorio y su entorno.		
– Construcción del sistema de alcantarillado en el laboratorio.		
– Construcción de un sistema de tratamiento para las aguas residuales generadas en el laboratorio.		
2.- Educación ambiental del personal vinculado a las actividades del laboratorio de biotecnología, y, a la comunidad universitaria de la UNESUM en general.	Carrera de Ingeniería Medioambiental de la UNESUM, Autoridades de la UNESUM.	60.000 USD
Costo total		500.000.00 USD

Fuente: Elaboración propia

Acciones generales

Como parte del programa para evitar los efectos contaminantes y el riesgo biológico del laboratorio de biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, el presente programa propone un grupo de acciones o actividades de obligatoria implementación en estas instalaciones. Dentro de las mismas se cuentan:

1. Delimitar y señalar las zonas de trabajo dentro y fuera del laboratorio.
2. No comer, beber o fumar en el laboratorio. Bajo ningún concepto se guardarán alimentos o bebidas en refrigeradores del laboratorio.
3. Extremar la higiene personal, lavándose las manos, antes y después de cada tarea.
4. En caso de que un trabajador presentara heridas en las manos, cubrir las heridas cutáneas con guantes.
5. No emplear anillos, pulseras, etc.
6. La manipulación de cualquier muestra, se efectuará siempre con guantes y con gafas o pantallas anti salpicaduras.
7. Toda muestra se transportará siempre en recipiente con tapa ajustable y cierre correcto que impida la salida de fluidos.
8. Todas las tareas deben realizarse cuidadosamente para evitar la formación de gotas y aerosoles. Utilizar cabinas de seguridad biológica (clases I y II) en procedimientos de homogeneización y mezcla vigorosa.
9. En el caso de que durante una operación de centrifugación se produjese la ruptura de los tubos en el interior del equipo, se esperará al menos 5 minutos para abrir la tapa del mismo. Posteriormente, se desinfectará equipos, materiales y superficies de trabajo con un producto de efectividad contrastada.
10. Desechar de ser usadas, las jeringas y agujas de un solo uso, en contenedores especiales (indeformables, no perforables, sin fisuras para evitar derrames) sin ser encapsuladas después de la utilización.
11. Todo material de desecho o residuo biológico, debe ser sometido a un programa de gestión de residuos.

Actividades para el control

Para prevenir y/o mitigar las afectaciones al medio o a los seres humanos, se implementarán tres niveles de medidas:

1. Medidas de control administrativas.
2. Medidas de control ambientales.
3. Protección personal.

1.- Medidas de control administrativas para evitar los riesgos biológicos

- ✓ Controlar la exposición.
 - Establecimiento de procedimientos de trabajo adecuados, para evitar o minimizar el contacto con agentes biológicos.

- ✓ Evaluación médica.
 - Pre empleo.
 - Examen médico ocupacional. Examen médico específicos a los trabajadores expuestos a los contaminantes biológicos.
 - Inmunizaciones
- ✓ Cada trabajador debe recibir instrucción apropiada, para cada categoría de trabajo.
 - Recomendaciones de medidas para el control de la contaminación y del riesgo biológico
 - Cronograma y presupuesto (por ejemplo, costos de materiales y personal)
 - Difundir entre los trabajadores el programa de bioseguridad e higiene para el uso, manejo, transporte almacenamiento y desecho de materiales contaminados por agentes patógenos, que en especial deberá contener las medidas preventivas de desinfección, esterilización y limpieza del equipo e instrumental utilizado.

2. Medidas de control ambientales

- Reducir la contaminación de agentes infecciosos.
- La implantación de medidas de limpieza y desinfección, de mantenimiento de equipos e instalaciones y de gestión de los residuos generados.
- Utilizar ropa de trabajo adecuada (batas de laboratorio, protectores de calzado, gorros, gafas de ser necesarias, guantes, tapabocas, etc., de color verde o blanco).
- Tener abundante agua a disposición de los trabajadores.
- Implementar sistemas de tratamientos para los residuales líquidos y planes de manejo para los residuos sólidos que genera el laboratorio.
- Reutilizar o reciclar siempre que sea posible los residuos sólidos que se generen.

3. Medidas de protección personal

- El elemento más importante para mantener un ambiente de trabajo seguro, es adquirir unos buenos hábitos de trabajo microbiológico y de laboratorio, y en la utilización de las técnicas.
- Todos los que trabajan con agentes infecciosos, o con materiales posiblemente infectados, deben ser conscientes de los riesgos posibles.
- Todos los trabajadores deben estar entrenados en las prácticas y técnicas que se requieren para la manipulación de dichos materiales.

Normas para la utilización segura del laboratorio biológico

- Cualquier persona que entre al laboratorio, debe entender los riesgos biológicos y otros riesgos con los que se pueden encontrar durante su trabajo normal en el mismo y estar entrenados en las precauciones de seguridad y procedimientos apropiados.
- Se debe preparar y colocar en un lugar visible un manual de bioseguridad en el laboratorio, que contendrá un plan de respuesta ante emergencias. El personal del laboratorio deberá conocer, entender y seguir los hábitos y procedimientos establecidos.
- El laboratorio debe estar pulcro, ordenado y limpio, y se debe minimizar el almacenamiento de materiales innecesarios para el trabajo.
- Todo el personal debe llevar perfectamente abrochada la ropa de protección de laboratorio (batas, delantales), incluyendo a los visitantes, y a cualquiera que entre al laboratorio.
- La ropa protectora del laboratorio no debe llevarse en otras áreas fuera del laboratorio.
- Debe llevarse calzado apropiado, cerrado y de suela antideslizante en todas las áreas del laboratorio.
- Se debe utilizar guantes, para realizar cualquier procedimiento en el que la piel pueda entrar en contacto con material biológico o con sustancias químicas peligrosas.
- No se debe usar joyas en el laboratorio. Antes de ponerse los guantes, se deben quitar los anillos y demás joyas que se lleven en las manos.
- Los guantes deben quitarse cuidadosamente y descontaminarse junto con el resto de residuos del laboratorio antes de tirarlos.
- Los guantes reutilizables (aislantes, resistentes a las sustancias químicas), sólo deben utilizarse en caso necesario y deben descontaminarse adecuadamente.
- Se deben lavar las manos después de quitarse los guantes, antes de salir del laboratorio y siempre después de manejar materiales que se sabe o se sospecha que son contaminantes.
- Se debe llevar protección en la cara y ojos (gafas protectoras, escudos para la cara u otros dispositivos protectores) cuando sea necesario proteger la cara y los ojos de salpicaduras, impacto de objetos, sustancias nocivas, luz UV u otras radiaciones.
- No se permite comer, beber, fumar, almacenar comida, efectos personales o utensilios, aplicar cosméticos ni poner o quitar lentes de contacto, en ningún área del laboratorio.
- En este tipo de laboratorio está terminantemente prohibido pipetear sustancias con la boca. Debe utilizarse cualquiera de los utensilios mecánicos para pipetear. Si es posible, se debe efectuar el pipeteado de sustancias biopeligrosas y fluidos tóxicos en una cabina de bioseguridad. Si se pipetea en la bancada del laboratorio, se debe

utilizar papel absorbente sobre la bancada. Para la actividad de pipetear utiliza siempre las siguientes precauciones:

- Utilizar **SIEMPRE** pipetas taponadas con algodón cuando trabajes con líquidos biopeligrosos o tóxicos.
- No preparar **NUNCA** ninguna mezcla biopeligrosa mediante succión y expulsión con pipeta.
- Los materiales biopeligrosos no se deben descargar a la fuerza de las pipetas. Utiliza pipetas dispensadoras, en lugar de las que requieren soplado para su descarga.
- No descargues materiales biopeligrosos desde la pipeta al recipiente a distancia. Cuando sea posible, deja que la pipeta se descargue sobre la pared del recipiente.
- Las pipetas reutilizables contaminadas deposítalas horizontalmente en una bandeja que contenga suficiente líquido desinfectante para cubrirlas.
- Antes de lavar estas pipetas para reutilizarlas, esterilízalas en el autoclave junto con la bandeja.
- Tirar las pipetas Pasteur contaminadas en un contenedor para utensilios punzantes de tamaño adecuado.

- Cuando se trabaja dentro de una cabina de bioseguridad, se debe tener dentro de ella, todas las bandejas y recipientes para utensilios punzantes contaminados durante su utilización.
- Los lentes de contacto se pueden llevar solamente cuando no sea posible utilizar otra forma de corrección adecuada.
- El cabello largo debe llevarse sujeto.
- Las superficies de trabajo deben estar limpias y descontaminarse con un desinfectante adecuado al final de la sesión, y siempre que se haya producido un derrame de materiales potencialmente peligrosos.
- Cualquier procedimiento técnico, debe realizarse de tal forma, que se minimice la formación de aerosoles.
- Todos los materiales, líquidos o sólidos, contaminados o infecciosos, deben descontaminarse antes de reutilizarlos o desecharlos. El exterior de los recipientes que contengan los materiales contaminados que tengan que llevarse al autoclave, o ser incinerados, lejos del laboratorio, debe descontaminarse químicamente o colocar el recipiente dentro de otro recipiente.
- El acceso a los laboratorios debe estar estrictamente limitado. Los niños menores de 16 años no deben entrar en el área del laboratorio.
- Las mujeres embarazadas y las personas inmunodeprimidas que trabajen, o entren, en el laboratorio deben estar informadas de los riesgos asociados.

- Se deben utilizar señales de precaución indicando el nivel de riesgo de los agentes que se utilizan en el exterior de cada laboratorio.
- Cuando los agentes infecciosos que se utilizan en el laboratorio requieren una protección especial antes de entrar, se debe incluir información específica de las mismas en las señales.
- Deberá existir un listado con el agente patógeno, el nombre del profesor responsable del laboratorio y otra(s) persona(s) responsable(s), así, como de cualquier condición especial para entrar (Nivel de acceso autorizado).
- La utilización de agujas, jeringas y otros objetos punzantes debe estar limitada de forma estricta. Las agujas y jeringas, deben usarse solamente para aspiración de fluidos en animales de laboratorio y frascos con diafragma.
- Se deben extremar las precauciones cuando se utilizan agujas y jeringas, para evitar la auto inoculación y la generación de aerosoles durante su utilización y desechado. Los procedimientos se deben realizar en campañas de seguridad biológica.
- No se debe doblar o romper las agujas. Inmediatamente después de su uso, no se deben volver a colocar en la funda o protector, sino, en un contenedor a prueba de pinchazos y descontaminarse, preferiblemente por incineración o en autoclave, antes de desecharlas.
- Todos los derrames, accidentes y roturas del sellado de los recipientes, o potenciales exposiciones, se deben informar por escrito al responsable del laboratorio o, alternativamente, actuar lo más rápidamente posible que permitan las circunstancias.

Control y monitoreo de la implementación del programa

Es fundamental que este laboratorio de biotecnología cuente con una política integral de seguridad, un manual de seguridad y programas de apoyo para su aplicación. La responsabilidad de todo ello, incumbe normalmente al Rector o al Vicerrector General de la UNESUM, los que podrán delegar ciertas funciones en un funcionario de bioseguridad o en otros especialistas apropiados.

La seguridad de laboratorio incumbe asimismo a todos los supervisores y trabajadores del laboratorio; cada trabajador deberá ser responsable de su propia seguridad y de la de sus colegas. Se espera que los empleados lleven a cabo su trabajo en condiciones de seguridad y comuniquen a sus superiores cualesquiera actos, condiciones o incidentes que atenten contra la seguridad. Resulta conveniente que personal interno o externo realice evaluaciones periódicas de la seguridad.

Siempre que sea posible, se designará un funcionario de bioseguridad, cuya misión consistirá en cerciorarse de que en todo el laboratorio se apliquen los planes y programas de bioseguridad. Este funcionario desempeñará esas funciones en nombre del Rector o del funcionario designado para atender el laboratorio. En el caso de la UNESUM, el funcionario de bioseguridad puede ser un microbiólogo o un técnico, miembro del personal, que se encargue a tiempo parcial de las funciones de seguridad. Sea, cual sea, el grado de participación en las labores de bioseguridad, la persona designada deberá poseer la competencia profesional necesaria para sugerir, revisar y aprobar actividades concretas que sigan los procedimientos apropiados de contención biológica y bioseguridad.

El funcionario de bioseguridad aplicará las normas, los reglamentos y las directrices nacionales e internacionales pertinentes, además de ayudar al laboratorio a elaborar procedimientos normalizados de operación. La persona designada deberá tener formación técnica en microbiología y bioquímica, así, como en ciencias físicas y biológicas básicas. También es conveniente que tenga conocimiento de las prácticas de laboratorio y de la seguridad en esos entornos, incluido el equipo de contención, así, como de los principios de construcción técnica relacionados con el diseño, el funcionamiento y el mantenimiento de las instalaciones. También debe tener capacidad para comunicarse de manera eficaz con el personal administrativo, técnico y de apoyo.

Entre las actividades del funcionario de bioseguridad figuran las siguientes:

1. Atender consultas sobre protección biológica, bioseguridad y cumplimiento de las condiciones técnicas.
2. Realizar auditorías internas periódicas en materia de bioseguridad, en particular de los métodos, procedimientos y protocolos técnicos, los agentes biológicos, el material y el equipo.
3. Examinar las infracciones de los protocolos o los procedimientos de bioseguridad, con las personas apropiadas.
4. Verificar que todo el personal haya recibido la capacitación apropiada en materia de bioseguridad.
5. Impartir formación continua en materia de bioseguridad.
6. Investigar incidentes que entrañen la posible fuga de material potencialmente infeccioso o tóxico, y comunicar los resultados y las recomendaciones al director del laboratorio y al comité de bioseguridad.
7. Coordinar con el personal médico, la atención a posibles infecciones adquiridas en el laboratorio.
8. Asegurar una descontaminación apropiada, tras los derrames u otros incidentes con materiales infecciosos.
9. Garantizar la correcta manipulación y eliminación de los desechos.
10. Velar por una descontaminación apropiada de cualquier aparato, antes de su reparación o revisión.
11. Conocer las actitudes de la comunidad universitaria y de la comunidad en general, en relación con consideraciones sanitarias y ambientales.
12. Establecer procedimientos apropiados para la importación y exportación de material patógeno por el laboratorio, de acuerdo con la reglamentación nacional.

13. Revisar los aspectos de bioseguridad de todos los planes, protocolos y procedimientos de operación para el trabajo de investigación con agentes infecciosos, antes de la puesta en práctica de esas actividades.
14. Instituir un sistema para hacer frente a las emergencias.

Comité de bioseguridad

Debe constituirse un comité de bioseguridad, encargado de formular las políticas y elaborar los códigos de prácticas de la institución, en materia de bioseguridad. Ese comité, también examinará los protocolos de investigación para los diversos procesos a implementarse en el laboratorio. Otras funciones del comité pueden ser la evaluación de riesgos, la formulación de nuevas políticas de seguridad y la solución de controversias sobre cuestiones relativas a la seguridad.

La composición del comité de bioseguridad, debe reflejar las distintas esferas ocupacionales de la organización, así, como su experiencia científica. La composición de un comité de bioseguridad básico puede incluir a los siguientes especialistas:

1. Funcionario(s) de bioseguridad.
2. Personal científico de la UNESUM.
3. Personal médico.
4. Veterinarios (si se llegara a trabajar con animales).
5. Representantes del personal técnico del laboratorio.
6. El director o un representante de la dirección del laboratorio.

El comité de bioseguridad, debe recurrir al asesoramiento de distintos especialistas en seguridad y funcionarios de otros departamentos (protección radiológica, seguridad industrial, prevención de incendios, etc.). A veces, puede ser necesario solicitar asesoramiento a expertos independientes en distintos campos afines, así, como a las autoridades locales, y a los organismos nacionales de reglamentación. Los miembros de la comunidad, también pueden ser de ayuda si se trata de protocolos particularmente polémicos o delicados.

Reglas de seguridad para el personal de apoyo

El buen funcionamiento y la seguridad de un laboratorio de biotecnología dependen en gran medida del personal auxiliar, por lo que es indispensable que ese personal esté correctamente capacitado en materia de seguridad.

Mecánicos y personal de mantenimiento del edificio: este personal, dedicado al mantenimiento y reparación de la estructura, las instalaciones y el equipamiento, debe tener algunos conocimientos sobre el tipo de trabajo que se realiza en el laboratorio, así como de las normas y los procedimientos en materia de seguridad biológica. Las pruebas a las que hay que someter el equipo después de las revisiones, así, como la verificación de la eficiencia de las cámaras de seguridad biológica (CSB), tras la instalación de nuevos filtros, debe ser realizada por el funcionario de bioseguridad o efectuarse bajo la supervisión de éste.

Los laboratorios o instituciones que no cuenten con servicios técnicos de mantenimiento internos, deben entablar buenas relaciones con los proveedores locales de servicios para que se familiaricen con el equipo y el trabajo que se hace en el laboratorio.

Los mecánicos del personal de mantenimiento, solamente deben acceder a los laboratorios con la aprobación y la supervisión del funcionario de bioseguridad o del director del laboratorio.

Personal de limpieza: los laboratorios de los niveles de bioseguridad 3 y 4 deben ser limpiados por el personal del laboratorio. Para el caso del laboratorio de biotecnología de la UNESUM, que cae dentro del nivel de bioseguridad 1, el personal de limpieza sólo debe entrar en esas instalaciones con la aprobación y bajo la supervisión del funcionario de bioseguridad o del director del laboratorio.

Conclusiones

- La construcción del laboratorio de biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí, no conto con un estudio de impacto ambiental y, por consiguiente, no se diseñó e implementó un plan de acciones para la mitigación de los impactos que esta inversión provocaría en la zona donde se encuentra ubicado. Igualmente, no se diseñó un plan de manejo para los desechos sólidos, un sistema de tratamiento para los residuales líquidos, ni se previó la implementación de un programa de seguridad biológica acorde a las actividades a desarrollar en una instalación de este tipo, lo cual puede llegar a incrementar el deterioro ambiental de esa zona y afectar la salud del personal vinculado a este laboratorio.
- La severa erosión de los suelos, el incremento del polvo, la deforestación, la pérdida y migración de especies de la flora y la fauna endémicas de la zona y la acumulación de desechos sólidos en el entorno, son las principales afectaciones ambientales presentes en el área estudiada.
- Como resultado a destacar de la encuesta aplicada a funcionarios y trabajadores directa e indirectamente vinculados al quehacer del laboratorio de biotecnología en la UNESUM, se obtuvo un deficiente conocimiento en educación ambiental, fundamentalmente en materia de riesgo biológico y bioseguridad.
- Como principal resultado de la investigación se propone un programa de bioseguridad, para eliminar o mitigar el riesgo biológico, y con ello contribuir decisivamente a la calidad ambiental, y a la salud humana en el área de influencia del laboratorio de biotecnología de la UNESUM.

Recomendaciones

A partir de los resultados del presente trabajo se recomienda lo siguiente:

- Presentar por parte de la dirección del laboratorio de biotecnología al Honorable Consejo Universitario de la UNESUM, el programa de bioseguridad desarrollado para su aprobación e implementación.
- Sugerir al Honorable Consejo Universitario de la UNESUM, la designación del funcionario de bioseguridad y la creación del comité de bioseguridad, para facilitar la

implementación y el control periódico de la eficiencia del programa de bioseguridad propuesto.

- Realizar periódicamente monitoreos de los residuos generados por el laboratorio de biotecnología, así, como a la calidad ambiental del área de influencia de dicha instalación.

Referencias

Alonso M (2009) Riesgos Biológicos. Tecnológico de Monterrey. Monterrey, México. Consultado en septiembre de 2011. Disponible en: <http://www.slideshare.net/MARIELAALONSO66/riesgos-biologicos-4411826>.

Alonso Roldán M. (2009) Aplicaciones de la Biotecnología. Junta Ambiental de Andalucía. Andalucía, España. Consultado en septiembre de 2011. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/manantiales/BIOGEO/trabajos/AplicBiotec.htm>.

Ballesteros, J., Fernández Ruiz-Gálvez, M. E. (2007) Biotecnología y posthumanismo. Editorial Aranzadi. ISBN 978-84-8355-095-3.

Barrere Rodolfo (2009) La biotecnología en Iberoamérica: Situación actual y tendencias. Publicado en: Estado de la Ciencia 2009 - Principales Indicadores de Ciencia y Tecnología- Iberoamericanos/Interamericanos

Bioconstrucción (2009) Predecir el impacto ambiental de la construcción de edificios. Consultado en Julio de 2011. Disponible en: http://bioconstruccion.blogspot.com/2009/02/predecir-el-impacto-ambiental-de-la_23.html.

Biotecnología - Bioprocesos II (2000) “Introducción a los procesos biotecnológicos: Separación y purificación en Biotecnología (Downstream processing). Consultado en Agosto/ 2011. Disponible en: bioprocesos.unq.edu.ar/Bioseparaciones%20Teoria.pdf.

Blázquez B (2008) Consecuencias medioambientales de las actividades económicas. Consultado en Mayo de 2011. Disponible en: http://www.slideshare.net/beatriz_blazquez77/consecuencias-medioambientales-de-las-actividades-economicas-1094536.

Canter LW (1997) Manual de Evaluaciones de Impacto Ambiental. Ediciones Mc Graw- Hill. México, 1997.

Castejón Montijano R (2010) Impactos ambientales. Desarrollo del Turismo. (WiKilibros). Consultado en julio de 2011. Disponible en: http://www.wikibooks.org/Impactos_ambientales/desarrollo_del_Turismo.

Cisneros F (2007) Bioseguridad. Universidad del Cauca - Facultad Ciencias de la Salud.

Fernández-Vítora V (1997) Guía Metodológica para la Evaluación del Impacto Ambiental. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 1997. 3ª Edición. Referencia de la biblioteca de Filosofía: FL/ TD 194.6.C66. 1997.

Crompton T, Wakeford T (1998) Socioeconomics and the protocol on biosafety. *Nature Biotechnology* 16: pags. 697-698.

Crompton T (1999) Feeding the world, harmoniously. *Nature Biotechnology* 17: pag. 208.

- del Val A (1997) La Construcción de la Ciudad Sostenible. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España. Disponible en: <http://habitat.aq.upm.es/cs/p3/a014.html>. Consultado en julio de 2011.
- Díaz-Barriga F (1996) Los residuos peligrosos en México: Evaluación del riesgo para la salud. Salud Pública. México. 38: Pags. 280-291.
- Domenech X (1997) Química Ambiental. El impacto ambiental de los residuos. Editorial Madrid: Miraguano Ediciones, 1997. Disponible en: <http://www.sma.df.gob.mx/sma/ubea/educacion/aire/menu.htm>. Consultado en junio de 2011.
- Echenique V, Rubistein C, Mroginski L (2004) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. INTA, Buenos Aires, Argentina..
- Elizalde AH (2004) Algunos apuntes respecto al estado del arte en el conocimiento de la sostenibilidad. Boletín CF+S 32. IAU+S: La sostenibilidad en el Proyecto arquitectónico y urbanístico. Disponible en <http://habitat.aq.upm.es/boletin/n32/aadi.html>. Consultado en septiembre 2010.
- Espinosa G (2001) Fundamentos de Evaluación de Impacto Ambiental. Banco Interamericano de Desarrollo (BID) - Centro de Estudios para el Desarrollo (CED). Santiago – Chile, 2001.
- FAO (2000) Declaración de la FAO sobre Biotecnología. Consultado en Mayo de 2012. Disponible en: <http://www.fao.org/biotech/fao-statement-on-biotechnology/es/>
- FAO (2011) Biosafety Resource Book. Disponible en: [http://www.fao.org/biotech/biotech-add-edit-section/biotech-add-edit-news/biotech-news-detail/en/?dyna_fef\[backuri\]=%2Fbiotech-%2Fen%-2F&dyna_fef\[uid\]=81783](http://www.fao.org/biotech/biotech-add-edit-section/biotech-add-edit-news/biotech-news-detail/en/?dyna_fef[backuri]=%2Fbiotech-%2Fen%-2F&dyna_fef[uid]=81783)
- Fernández Sánchez L (2001) Definición de contaminante biológico: En Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, INHT, Ministerio Trabajo y Asuntos Sociales, España, 2001.
- Fernández Concepción. RR (2009) Tratamiento de residuales líquidos. Puyo – Pastaza – Ecuador. Febrero de 2009.
- Fukuyama F (2002) El fin del hombre: consecuencias de la revolución biotecnológica. Ediciones B. ISBN 978-84-666-0874-9.
- Galperín C, Fernández L, Doporto I (2000) Los productos transgénicos, el comercio agrícola y el impacto sobre el agro argentino. Centro de Economía Internacional y Departamento de Investigación, Universidad de Belgrano (Argentina). Publicado en: Panorama del Mercosur, N°4, pp.135/168, Buenos Aires: Centro de Economía Internacional. Centro de Economía Internacional - CEI, Secretaría de Comercio y Relaciones Económicas Internacionales y Asuntos Consulares (Argentina).
- Genoma España (Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica) (2004) La biotecnología española: Impacto económico, evolución y perspectivas. Referencia: GEN-ES05006. ISBN: 84-609-6532-5.
- Gómez D (1999) Evaluación del Impacto Ambiental. Ed. Mundi-Prensa y Editorial Agrícola Española, S.A. Madrid. 1999. 1ª Edición. Referencia de la biblioteca de Filosofía: FL/TD 194.4. G6. 1999.

- Hernández MC (2008) Propuesta de apoyo para una gestión eficiente de la Biotecnología. Revista "Escuela de Administración de Negocios", Núm. 62, enero - abril, 2008, pp. 5-25. Universidad EAN. Colombia.
- Hernández Fonseca H (2010) Biotecnología. Rev. Científica Maracaibo. [online]. jun. 2010, Vol.20, No.3 Consultado en Septiembre 2011], p.225-226. Disponible en la World Wide Web: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300001&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0798-2259.
- Ibáñez J, Corroppoli C (2002). Valorización de residuos sólidos urbanos. Disponible en: <http://www.economicasunp.edu.ar/06publicaciones/informacion/anuario%2002/Iba%F1ez-43.PDF>. Consultado en agosto de 2011.
- Izquierdo Rojo M (1999): Ingeniería genética y transferencia génica. Madrid: Ediciones Pirámide (ISBN: 84-368-1312-X).
- Know K, Robinson HD, van Santen A, Tempany RR (2000) The occurrence of trace organic components in landfillleachates and their removal during on – site treatment. IWM Scientific and Technical Review. November 5 – 10. IWM Bussiness Services Ltd. Northampton.
- Machado Palafox A (2004) La Contaminación Ambiental. Disponible en: [http://www.tecnun.es/asignaturas/Ecología/Hipertexto/15 Hor](http://www.tecnun.es/asignaturas/Ecología/Hipertexto/15%20Hor). Consultado en agosto de 2011.
- Mara D, Pearson H (1998) Design manual for waste stabilization ponds in Mediterranean countries. University of Leeds. United Kingdom, 1998.
- Medina Chávez R (2009) Riesgos Biológicos. CENSOPAS – INS. Medicina del Trabajo. Disponible en: <http://www.ila.org.pe>. Consultado en septiembre de 2011.
- Mellon M (1991) An Environmentalist Perspective en Davis, B. D., ed., 1991, the genetic revolution. Scientific prospects and public perceptions, Baltimore and London, The Johns Hopkins University Press.
- Ministerio de la Presidencia, Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, BOE n.º 124 de 24-5-1997, España.
- Moncada Palafox A (2004) La contaminación ambiental. Publicado en <Http://www.monografias.com>. Consultado en julio de 2011.
- Muñoz Rustep E (1997) Biotecnología, Medio Ambiente y Sociedad. Unidad de Investigación sobre Políticas Científicas y Tecnológicas, (IESA-CSIC), España. Disponible en: <http://www.oei.es/salactsi/tef05.htm>. Consultado en agosto de 2011.
- Muñoz E (1999) Biotecnología y sociedad: una revisión crítica para el Simposio sobre Animales y Plantas Transgénicos. *Documentos de Trabajo del IESA-CSIC*, nº 99-02.
- NAS (National Academy of Sciences) (1987) Introduction of Recombinant DNA- Engineered Organisms into the Environment: Key issues, Washington (DC), National Academy Press.
- OCDE (2005) Inventario diagnóstico de las biotecnologías en MERCOSUR y comparación con la Unión Europea / BIOTECH ALA-2005-017-350-C2
- Ochoa George PA (2007) Las Producciones más Limpias en la Gestión Empresarial. Universidad de Cienfuegos. Cienfuegos, Cuba. 2007.

- OMS (2005) Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3era Edición. ISBN 92 4 354650 3 (Clasificación LC/NLM: QY 25). Ginebra, 2005.
- Orozco L (2006) Manejo y gestión de la biotecnología agrícola apropiada para pequeños productores: Estudio de caso, Colombia. Disponible en: http://www.redbio.org/e_casos/colombia.pdf. Consultado en septiembre de 2011.
- Pareja E (2005) Introducción a la Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad de Granada. Consultado en agosto de 2011. Disponible en: <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/introbiotec.htm>.
- Parlamento Europeo (2000) Directiva 2000/54/CE, de 18 de septiembre de 2000, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, DOCE L 262 de 17-10-2000, p. 21/45.
- Pineda L (2005) Tecno globalización y biotecnología: retos y oportunidades para Colombia. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. VII No. 2 Diciembre 2005.
- Quintero Ruiz AF (2005) Plan de manejo ambiental. Instituto Tecnológico Metropolitano para la Gestión Ambiental (ITMGA). Medellín, Colombia, 2005.
- Ruiz A (2001) Residuos Sólidos Municipales. [on line]. Disponible en: http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/estadisticas_2000/compendio_2000/03dim_ambiental/03_06_Residuos/index.shtml#residuos. Consultado en agosto de 2011.
- Scott M (1995) Ecología. Colección Oxford Joven. Ediciones EDEBE. Barcelona, 1995.
- SEBIOT (Sociedad Española de Biotecnología) (2004) “Biotecnología y Medio Ambiente”.
- Seoánez Calvo M (2000) Residuos: problemática, descripción, manejo, aprovechamiento y destrucción. Madrid: Mundi-Prensa, 2000.
- Smith JE (1996) Biotechnology. (3ª edición). Cambridge: Cambridge University Press. (ISBN: 0-521-44911-1).
- Solís Gómez M, Ramírez Beltrán A, Pumacayo Sánchez Z (2000) Revista Biotecnología y Manipulación Genética Ed. UNE. Perú.
- Tchobanoglous G, Theisen H, Vigil S (1994) Gestión Integral de Residuos Sólidos. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España. ISBN: 0-07-063237-5
- Tchobanoglous G, Theisen H, Vigil S (1996) Gestión integral de residuos sólidos. Madrid. Ed. Mc Graw-Hill, 1996.
- Tchobanoglous G y Crites G (2000) Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones. Ediciones Mc Graw- Hill. México, 2000. Págs. 73 – 79.
- UA (Universidad de Alicante) (2007) Manual de supervivencia en el laboratorio. Facultad de Ciencias de la Universidad de Alicante. Febrero de 2007. Consultado en septiembre de 2011. Disponible en: http://www.ua.es/va/centros/facu.ciencias/seguridad/hab_seg_lab_biol.htm.

Tema 13**Propuesta de una guía de manejo de desechos en el laboratorio de biotecnología para la determinación del impacto ambiental****Carlos Castro P, Blanca Indacochea G**

Todos somos ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas.

Albert Einstein

Resumen

El problema identificado en el laboratorio de Biotecnología de la UNESUM es que no cuenta con una gestión integral de residuos, reactivos, hormonas vegetales, desinfectantes y similares por lo que se debe diseñar e implementar buenas prácticas de gestión orientadas a la prevención de los efectos perjudiciales que ocasionan estos residuos para la salud y el ambiente. El objetivo de esta investigación fue desarrollar una Propuesta de Guía para el manejo de desechos en el laboratorio de Biotecnología de la UNESUM para determinación de su Impacto Ambiental. La metodología que se implementó fue sacar línea base del laboratorio, aplicar matriz de Leopold para identificar efectos que causan el mal manejo de los desechos al ambiente y desarrollar una guía de manejo de los desechos para evitar contaminación al ambiente y el posterior plan de divulgación de esta guía. Las muestras obtenidas (estadísticamente) sirvieron para determinar el número de personas que trabajan en el laboratorio y que realizan prácticas y/o investigaciones en reproducción *in vitro* y *ex vitro* de plantas. Las medidas propuestas son proponer al Director del laboratorio un plan de capacitación para las personas que laboran en laboratorio para mejorar el manejo y eliminación de desechos que se generan en el laboratorio. Los resultados de esta Investigación fueron tener Línea base de los desechos que se generan, conocer el Impacto ambiental producido por los desechos; desarrollar guía de Manejo Ambiental para prevenir, controlar, eliminar o mitigar los impactos negativos y maximizar los positivos y divulgar la guía de Manejo Ambiental.

Palabras clave: Desechos, ambiente, capacitación, guía.

Summary

Proposal of a Waste Management Guide for the determination of the environmental impact in the biotechnology laboratory

The problem identified in the UNESUM Biotechnology laboratory is that it does not have a comprehensive management of waste, reagents, plant hormones, disinfectants and the like, so good management practices should be designed and implemented to prevent harmful effects caused by these residues for health and the environment. The objective of this research was to develop a Guide Proposal for Waste Management in the Biotechnology Laboratory of UNESUM and to determine its Environmental Impact. The methodology implemented was to draw laboratory baseline, apply Leopold matrix to identify effects causing the mismanagement of waste to the environment and to develop a waste management guide to avoid contamination to the environment and the subsequent diffusion plan of this guide. The samples obtained (statistically) were used to determine the number of people who work in the laboratory and who carry out practices and/or researches on *in vitro* and *ex vitro* reproduction of plants. The proposed measures are to propose to the Director of the Laboratory a training plan for those who work in the laboratory to improve the handling and disposal of wastes generated in the laboratory. The results of this research were to have baseline of the wastes that are generated, to know the environmental Impact produced by the wastes; to develop an Environmental Management Guide to prevent, control, eliminate or mitigate negative impacts and maximize the positive ones and diffuse the Environmental Management Guide.

Keywords: Waste, environment, training, guide.

Introducción

La propia complejidad de la biotecnología, determina que la aproximación a los problemas que plantea su desarrollo y aplicación debe realizarse sectorialmente, acotando lo que suponen tales aplicaciones de coste y beneficio para cada sector industrial agrario, agroalimentario, farmacéutico, químico, de aplicación medioambiental, energético y para cada proceso – selección de un organismo; cultivo del mismo y en qué condiciones; bioprocesos industriales que originan productos y desechos. En una situación ideal, convendría empezar a hablar de aplicar el concepto de bioseguridad al análisis de casos concretos y específicos, una vez que se ha avanzado en la formulación de mecanismos de regulación de corte general.

Los avances en los requisitos de seguridad son, a su vez, dependientes de la tradición. En este contexto, es evidente que la seguridad de los productos en el ámbito de la industria farmacéutica está cubierta por una contrastada experiencia en la práctica de ensayos de calidad, seguridad y eficacia. El sector agroalimentario posee también una amplia tradición respecto, pero con criterios obviamente menos restrictivos y presenta, por lo tanto, más margen para el debate social, a la par que ofrece mayor terreno a la participación de las organizaciones de consumidores. Por último, y no menos importante, el control del riesgo medioambiental es más reciente en sus prácticas, lo que añade dificultades a su puesta en práctica.

Es un hecho ya comúnmente aceptado que la biotecnología, y en particular la llamada "nueva" biotecnología, es una tecnología emergente, horizontal, con la capacidad de revolucionar los procesos productivos en cualquiera de los sectores económicos. La relación entre el soporte

científico y técnico que requiere la biotecnología y sus usos y aplicaciones en los diversos sectores económicos ha sido analizada y proyectada en modelos relacionales arboriformes.

Sin embargo, las grandes expectativas en que se mueve la biotecnología tropiezan con un contexto de debate y conflicto social y político. En este contexto, las relaciones entre biotecnología y medio ambiente, con sus eventuales repercusiones en alteraciones de la naturaleza y la salud humana, son particularmente conflictivas. Los modelos relacionales no han tenido en cuenta estos factores dialécticos, que condicionan el desarrollo de la biotecnología. (Muñoz s.f.)

Con las técnicas de la biotecnología moderna, es posible producir más rápidamente que antes, nuevas variedades de plantas con características mejoradas, produciendo en mayores cantidades, con tolerancia a condiciones adversas, resistencia a herbicidas específicos, control de plagas, cultivo durante todo el año. Problemas de enfermedades y control de malezas ahora pueden ser tratados genéticamente en vez de con químicos. La ingeniería genética (proceso de transferir ADN de un organismo a otro) aporta grandes beneficios a la agricultura a través de la manipulación genética de microorganismos, plantas y animales.

Desde una perspectiva ética, la evaluación de las aplicaciones y usos de la investigación tecnológica y de su normativa debe tomar en cuenta los beneficios que aportan, los riesgos que puedan involucrar, los derechos de las personas y el respeto a los seres vivos en su conjunto. La acelerada producción y la ampliación del alcance de las innovaciones tecnológicas tanto en el tiempo, por sus proyecciones sobre las generaciones futuras, como en el espacio, por sus efectos sobre la biosfera en su conjunto, constituyen un nuevo imperativo de responsabilidad para quienes intervienen en la toma de las decisiones que afectan a la sociedad

El plan para la gestión integral de residuos, reactivos, hormonas vegetales, desinfectantes y similares debe enfocarse a diseñar e implementar buenas prácticas de gestión orientadas a la prevención de los efectos perjudiciales para la salud y el ambiente por el inadecuado manejo de los residuos al igual que al mejoramiento de la gestión.

Esta gestión comprende la totalidad de las acciones correspondientes a la generación, separación, movimiento interno, almacenamiento intermedio y/o central, desactivación, recolección, transporte, tratamiento y/o disposición final. (Betancur Pulgarin y Tamayo Arenas s.f.)

En el contexto actual de preocupación por las consecuencias sanitarias y medioambientales de los usos de la (moderna) biotecnología, las regulaciones que rigen en el mundo para cumplir con el concepto de bioseguridad en el desarrollo (industrial) de la biotecnología son ricas y variadas. Pretenden suministrar protección al trabajador y al medio ambiente, completando con este nuevo enfoque, la protección que han merecido, de modo tradicional, los consumidores y usuarios.

La adopción de las agrobiotecnologías se ha visto reflejada en el aumento de la productividad agrícola, la reducción de costos y el mejoramiento de la conservación y el manejo sustentable del medio ambiente, así como alimentos más sanos. Sin embargo, el comercio de productos desarrollados con nuevas herramientas biotecnológicas, como es el caso de los organismos vivos modificados (OVM), ha dado origen a preocupaciones relacionadas no solo con la producción, sino también con la bioseguridad, la reglamentación, el análisis y manejo de riesgo, así como la propiedad intelectual y el desarrollo de capacidades. Se reconoce ampliamente, hoy por hoy, que la biotecnología podría constituirse en una importante alternativa para contribuir a la seguridad en

la alimentación, a la conservación y aprovechamiento sostenible de la diversidad biológica, y la protección de la salud humana.

Es viable esta investigación porque se cuenta con todas las facilidades para obtener los datos del Laboratorio como docente de la UNESUM también docente investigador en el Centro de Transferencia y Desarrollo Tecnológico.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar una Propuesta de Guía para el manejo de desechos en el laboratorio de Biotecnología de la UNESUM para determinación de su Impacto Ambiental.

Objetivos específicos

- Levantar la línea base de los desechos que se producen en el Laboratorio de biotecnología de la UNESUM.
- Evaluar el Impacto Ambiental, mediante la matriz de Leopold para conocer los tipos de residuos que se generan y donde afectan principalmente en el entorno.
- Formular una guía de Manejo Ambiental que permita la prevención, control, y mitigación de los impactos negativos y maximización de los positivos.
- Divulgar la guía de Manejo Ambiental de los desechos que se generan en el laboratorio de Biotecnología a la Universidad Estatal del Sur de Manabí.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en la ciudad de Jipijapa, en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí UNESUM. Se realizó una propuesta de una guía que diagnostique la situación actual, señale los obstáculos existentes, identifique las necesidades, establezca las prioridades para el desarrollo rural y la seguridad alimentaria y plantee las acciones y los recursos necesarios para fomentar la aplicación segura y sostenible de la biotecnología agropecuaria y forestal como alternativa frente a la globalización y competitividad de los mercados de consumo.

Por esta razón se tomó en cuenta un abundante marco normativo internacional, con sistemas regulatorios basados en la ciencia, que incide en estas nuevas agrobiotecnologías.

Se destacan el Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología (PCB), en vigencia desde septiembre del 2003; los acuerdos en el marco de la Organización Mundial del Comercio, tales como el Acuerdo sobre Medidas Sanitarias y Fitosanitarias y el Acuerdo sobre los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio (ADPIC); las normas en el marco de la Convención Internacional para la Protección de Plantas (IPPC) y los principios y pautas que están surgiendo en el ámbito del Codex Alimentarius.

El laboratorio de Biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí UNESUM va a estar destinada en primera instancia a la reproducción de plantas hortícolas, leñosas y forestales. Dada la importancia del sector agro alimentario en la economía local la biotecnología comienza a ser considerada una necesidad estratégica para el futuro económico del país. La investigación se realizó desde septiembre del 2013 a febrero del 2014.

Para el desarrollo del proyecto, se buscó la información que a continuación se detalla:

Capacitación:

Para determinar si las personas que laboran en el laboratorio tiene la suficiente capacitación para estar en ese lugar desempeñando actividades dentro del laboratorio.

Cuantificación e identificación de los desechos:

Para determinar qué tipo de desechos manejan y poder tomar medidas correctivas si fuera preciso a la hora de eliminar sus residuos.

Sistema de inventarios:

Para determinar si el laboratorio cuenta con un inventario de los insumos y reactivos que posee para realizar las labores de trabajo en reproducción de plantas.

Métodos de tratamiento:

Para determinar si se le está dando el tratamiento adecuado a los desechos o no y que daño pueden causar al ambiente y a los humanos.

Normativa:

Esto permitirá si el laboratorio está cumpliendo con la normativa nacional o internacional para su funcionamiento según su fin que es de reproducción de plantas.

Materiales

La Investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Estatal del Sur de Manabí ubicado en el cantón Jipijapa, provincia de Manabí

Unievrso

Población

La población fueron los estudiantes de Ingeniería Agropecuaria y Forestal que tienen acceso al laboratorio, los egresados – tesisistas que están desarrollando la Tesis de Grado y el personal que trabaja en el laboratorio de planta y el Director del Departamento que suman un total de 49 personas.

Estudiantes de Ing. Agropecuaria	25
Estudiantes de Ing. Forestal	10
Egresados-Tesisistas	5
Personal de trabajo	8
Directora del Laboratorio	1
TOTAL	49

Métodos

Tipo de investigación

En este estudio de investigación se emplearon los métodos: Hipotético Deductivo, Cuasi-Experimental, Bibliográfico, De Campo, Exploratorio, Descriptivo, Sintético y Propositivo.

Hipotético deductivo: Se utilizó este método porque se partió de un caso en particular planteando un problema a través de un proceso de inducción y mediante el razonamiento deductivo se intentó validar la hipótesis.

Cuasi-experimental: Se aplicó este método porque es una investigación cualitativa y cuantitativa y se trabajó con grupos ya formados en la Universidad Estatal del Sur de Manabí de la ciudad de Jipijapa.

Bibliográfico: Este método permitió conocer, comparar, ampliar y deducir teorías para la fundamentación del debate teórico desarrollado con los resultados de la investigación.

De campo: Fue fundamental para esta investigación, ya que permitió un estudio sistemático al tratamiento de las variables, garantizando efectividad en la investigación con la aplicación de encuestas, entrevista y la observación directa en el laboratorio de biotecnología de la UNESUM.

Exploratorio: Permite describir el escenario que se investigó, determinando el espacio de acuerdo a la problemática.

Descriptivo: Permite detallar o describir la temática.

Sintético: Este método evidenció en la redacción de las conclusiones de la investigación desarrollada.

Propositivo: Permite formular la propuesta como alternativa de solución al problema planteado.

Todos estos métodos y técnicas se utilizaron bajo la debida organización y aplicación, lo cual permitió obtener resultados veraces en la presente investigación.

Técnicas e instrumentos

Las técnicas que se utilizaron para la recopilación de información fueron:

- a. Entrevista al Jefe del laboratorio de Biotecnología.
- b. Encuestas a estudiantes y docentes de las carreras de Ingeniería Forestal, Ambiental y Agropecuaria de la UNESUM que tienen acceso al laboratorio.
- c. Matriz de Leopold

Diseño de investigación

OE1.- Levantar la línea base de los desechos que se producen en el Laboratorio de biotecnología de la UNESUM.

Proceso de recopilación de la información

Para la realización de las encuestas se contó con la autorización del Rector de la Universidad Estatal del Sur de Manabí UNESUM y del Coordinador del Laboratorio de Biotecnología.

Durante el proceso de recolección de la información se trabajó con el soporte en los análisis de los datos obtenidos de los instrumentos de investigación, información que es muy variable. En el caso de las encuestas a los estudiantes, se realizaron en forma anónima para que tuvieran libertad y certeza para responder con la verdad en cada una de las preguntas.

Procesamiento de la información

Este proceso de investigación se la realizó de la siguiente manera:

- Codificación de la información
- Tabulación de la información
- Recuento de la información
- Clasificación de la información
- Ordenamiento de la información
- Tablas y cuadros de la información

OE2.- Evaluación del Impacto Ambiental, mediante la matriz de Leopold para conocer los tipos de residuos que se generan y donde afectan principalmente en el entorno.

La matriz de Leopold es un método de identificación de impactos, en las columnas presenta las acciones resultantes de una actividad productiva y en las filas los componentes del medio y sus características. Cada acción debe ser considerada sobre cada uno de los componentes del entorno de manera de detectar su interacción, es decir los impactos.

Cada acción se evalúa en términos de la magnitud del efecto sobre las características y condiciones medioambientales que figuran en el eje vertical. Se coloca una barra diagonal (/) en cada casilla donde se espera una interacción significativa. Las casillas marcadas son evaluadas colocando un número entre 1 y 10 en la esquina superior izquierda para indicar la magnitud relativa de los efectos (1 representa la menor magnitud, y 10 la mayor), con un signo + si el impacto es positivo y un signo – si es negativo. Asimismo, se coloca un número entre 1 y 10 en la esquina inferior derecha para indicar la importancia de los efectos.

Para la valoración de magnitud y de importancia en cada interacción se emplean los siguientes criterios:

Tabla 1. Criterios para la valoración de la magnitud en la Matriz de Leopold.

Calificación	Magnitud	
	Intensidad	Afectación
1	Baja	Baja
2	Baja	Media
3	Baja	Alta
4	Media	Baja
5	Media	Media
6	Media	Alta
7	Alta	Baja
8	Alta	Media
9	Alta	Alta
10	Muy Alta	Alta

Fuente: Fernández-Vitoria CV (1997) Guía Metodológica para la Evaluación del Impacto Ambiental. Mundi Prensa, 3era. ed. Madrid, España.

Tabla 2. Criterios para la valoración de la importancia en la Matriz de Leopold.

Calificación	Importancia	
	Intensidad	Afectación
1	Temporal	Puntual
2	Media	Puntual
3	Permanente	Puntual
4	Temporal	Local
5	Media	Local
6	Permanente	Local
7	Temporal	Regional
8	Media	Regional
9	Permanente	Regional
10	Permanente	Regional

Fuente: Fernández-Vitoria CV (1997) Guía Metodológica para la Evaluación del Impacto Ambiental. Mundi Prensa, 3era. ed. Madrid, España.

El valor de la sumatoria del producto de la magnitud e importancia de cada interacción, tanto en filas como en columnas, da como resultado la agregación de impactos, la cual indica cuáles son las actividades más perjudiciales o beneficiosas para el ambiente, y cuáles son las variables ambientales más afectadas tanto positiva como negativamente.

Para determinar la calificación ambiental, de acuerdo al valor numérico total obtenido, se aplica la fórmula:

$$Ca = \sqrt{|(A/N)|}$$

Dónde:

Ca= Calificación ambiental

A= Agregación de impactos

N= Número de interacciones

El resultado es comparado con la siguiente tabla:

Tabla 3. Rangos de valor para determinar la calificación ambiental de los impactos

Rangos de valor para determinar la calificación ambiental de los impactos	
Rangos	Significado
0 a 2,5	Bajo o Compatible
2,6 a 5,5	Moderado
5,6 a 7,5	Severo
7,6 a 10	Crítico

Fuente: pulgar-vidal (2012).

Matriz de Importancia.

Una vez identificados los factores ambientales más afectados, ya sea positiva o negativamente, y las actividades más desfavorables y más ventajosas dentro de la cadena de producción de derivados lácteos, se procede a caracterizar la importancia de los impactos a través de esta matriz.

La importancia del impacto se mide en función, tanto del grado de incidencia o intensidad de la alteración producida, como de la caracterización del efecto, que responde a su vez a una serie de atributos de tipo cualitativo tales como extensión, tipo de efecto plazo de manifestación, persistencia, reversibilidad, recuperabilidad, sinergia, acumulación y periodicidad.

A continuación se describen los atributos de los impactos:

Naturaleza. Los impactos pueden ser beneficiosos o perjudiciales.

Efecto. El impacto de una acción sobre el medio puede ser “directo”, es decir impactar en forma directa, o “indirecto” si se produce como consecuencia del efecto primario el que, por tanto, devendría en causal de segundo orden.

Magnitud/Intensidad. Representa la incidencia de la acción causal sobre el factor impactado en el área en la que se produce el efecto.

Extensión. A veces la incidencia del impacto está circunscrita; en otros casos se extiende disminuyendo sus efectos hasta que los mismos no son medibles. En algunos casos sus efectos pueden manifestarse más allá del área del proyecto y de la zona de localización del mismo.

El impacto puede ser localizado (puntual) o extenderse en todo el entorno del proyecto o actividad (se lo considera total).

Momento. Se refiere al tiempo transcurrido entre la acción y la aparición del impacto. La predicción del momento de aparición del impacto, será mejor cuanto menor sea el plazo de aparición del efecto. Además, la predicción es importante en razón de las medidas de corrección de los impactos que deban realizarse.

Persistencia. Se refiere al tiempo que el efecto se manifiesta hasta que se retorne a la situación inicial en forma natural o a través de medidas correctoras.

Reversibilidad. La persistencia y la reversibilidad son independientes. Este atributo está referido a la posibilidad de recuperación del componente del medio o factor afectado por una determinada acción. Se considera únicamente aquella recuperación realizada en forma natural después de que la acción ha finalizado. Cuando un efecto es reversible, después de transcurrido el tiempo de permanencia, el factor retornará a la condición inicial.

Recuperabilidad. Mide la posibilidad de recuperar (total o parcialmente) las condiciones de calidad ambiental iniciales como consecuencia de la aplicación de medidas correctoras.

Sinergia. Se refiere a que el efecto global de dos o más efectos simples es mayor a la suma de ellos, es decir a cuando los efectos actúan en forma independiente.

Acumulación. Se refiere al aumento del efecto cuando persiste la causa.

Periodicidad. Este atributo hace referencia al ritmo de aparición del impacto.

Para determinar la importancia de los impactos se valora cada atributo en función de los siguientes criterios (6).

Tabla 4. Criterios para determinar la importancia de los impactos ambientales.

Naturaleza	Positivo	(+)
	Negativo	(-)
Efecto	Efecto secundario	1
	Efecto directo	4
Magnitud / intensidad	Baja	1
	Media baja	2
	Media alta	3
	Alta	4
	Muy alta	8
	Total	12
Extensión	Impacto puntual	1
	Impacto parcial	2
	Impacto extenso	4
	Impacto total	8
Momento	Inmediato	4
	Corto plazo (menos de 1 año)	4
	Mediano plazo (1 a 5 años)	2
	Largo plazo (más de 5 años)	1
Persistencia	Fugaz	1
	Temporal (entre 1 y 10 años)	2
	Permanente (duración mayor a 10 años)	4
Reversibilidad	Corto plazo (menos de 1 año)	1
	Mediano plazo (1 a 5 años)	2
	Irreversible (más de 10 años)	4
	Si la recuperación puede ser total e inmediata	1

Recuperabilidad	Si la recuperación puede ser total a mediano plazo	2
	Si la recuperación puede ser parcial (mitigación)	4
	Si es irrecuperable	8
Sinergia	Si la acción no es sinérgica sobre un factor	1
	Si se presenta un sinergismo moderado	2
	Si es altamente sinérgico	4
Acumulación	No existen efectos acumulativos	1
	Existen efectos acumulativos	4
Periodicidad	Si los efectos son continuos	4
	Si los efectos son periódicos	2
	Si los efectos son discontinuos	1

Fuente: Fernández-Vitoria CV (1997) Guía Metodológica para la Evaluación del Impacto Ambiental. Mundi Prensa, 3era. ed. Madrid, España.

Jerarquización de los impactos ambientales.

La jerarquización se fundamenta en los resultados derivados de las matrices de Leopold.

Los resultados de la agregación de impactos de la Matriz de Leopold deben ser ordenados desde el más negativo hasta el más positivo, priorizando de este modo los impactos más desfavorables que requieren mayor e inmediata atención.

De todo este análisis resulta la estructuración de los Programas que van a conformar el Plan de Manejo Ambiental para El laboratorio de Biotecnología de la UNESUM.

Matriz de calificación de leopold para impactos ambientales

	Componente	Factor	Acciones seleccionadas					
			1	2	3	4	5	
Biotico	Flora	Bosque secundarios						
		Cultivos						
		Pastizales						
		Manglares						
		Humedales y lagunas						
	Fauna	Habitad						
		Aves						
		Mamiferos						
		Reptiles						
		Especies acuaticas						
Fisico	Suelo	Erosion						
		Prodt. Del suelo						
		Estruct del suelo						
		Forma relieve						
		Estabilidad taludes						
		Usos de suelo						
	Agua	Caudales						
		Calidad del agua						
		Nivel freatico						
		Aguas subterranas						
	Aire	Emision de gases						
		Emision sólidos						
		Ruidos						
	Paisaje	Recur paisajisticos						
			Empleo/ingreso					

Socio economico s	Poblacion	Acent humano					
		Migracion					
	Uso del suelo	Areas productivas					
		Prodt/produccion					
		Valor de la tierra					
		Fracc de la tierra					
	Infraestructura	Demandas bienes y servicios					
		Accesibilidad					
		Const e infraestruct					
	Economia	Tribuutacion					
		Actividad economicas					
	Humanos	Aceptacion social					
		Nivel de vida					
		Accidente / seguridad					
		Salud/enfermedad					
	Cultural	Vestigios arqueologi					

OE3.- Formular una guía de Manejo Ambiental que permita la prevención, control, y mitigación de los impactos negativos y maximización de los positivos.

Se realizó la formulación de un Plan de Manejo Ambiental PMA porque este constituye el principal instrumento para la gestión ambiental, en la medida en que reúne el conjunto de criterios, estrategias, acciones y programas necesarios para prevenir, mitigar y compensar los impactos negativos y potencializar los positivos y porque existe una relación de correspondencia entre los impactos ambientales y las medidas incluidas en el PMA; el alcance de la medida está en relación con la magnitud e importancia del impacto ambiental.

Además porque las medidas de manejo ambiental, son todas aquellas acciones orientadas a prevenir, mitigar, corregir o compensar los impactos ambientales generados por el desarrollo de una actividad, es decir, atenúan o eliminan el valor final del impacto ambiental, y/o eliminan o controlan los procesos desencadenados por el mismo. Las medidas de manejo ambiental, se formularon para las etapas de construcción y operación y/o funcionamiento del laboratorio de Biotecnología, dependiendo del impacto ambiental, se establecieron medidas de: prevención, mitigación, corrección y compensación.

OE4.- Divulgar la guía de Manejo Ambiental de los desechos que se generan en el laboratorio de Biotecnología a la Universidad Estatal del Sur de Manabí.

La Divulgación de la guía de Manejo Ambiental se debe realizar porque actualmente la problemática ambiental se ha convertido en una de las principales preocupaciones para el hombre moderno ya que afecta a todos por igual. A pesar de la preocupación, no todos reconocen qué hacer y cómo hacer para mejorar la calidad ambiental y muchos continúan manifestando una actitud hostil e irresponsable ante el manejo de los recursos naturales de toda índole.

La protección del medio ambiente y la concepción del desarrollo sostenible, que implican un tipo de desarrollo en todos los campos productivos y sociales que satisfaga las necesidades básicas de la actual generación humana, sin poner en peligro las posibilidades de las sociedades venideras, requieren de voluntades, decisiones y puesta en práctica de acciones políticas, económicas, científicas y educativas, entre otras.

Es necesario que las personas que laboran en el laboratorio de Biotecnología o lo utilizan frecuentemente reciban una enseñanza y, fundamentalmente, una educación ambiental, que forme y desarrolle una personalidad que les permita realizar una manifestación práctica de la política, el desarrollo científico, técnico, económico y social, para que tengan en cuenta la protección del medio ambiente.

Resultados esperados

- Línea base de los desechos que se generan en el laboratorio de biotecnología de la UNESUM.
- Impacto ambiental producido por los desechos que se generan en el laboratorio de biotecnología de la UNESUM.
- Guía de Manejo Ambiental que permita prevenir, controlar, eliminar o mitigar los impactos negativos y maximizar los positivos.
- Guía de Manejo Ambiental divulgada de los desechos que se generan en el laboratorio de Biotecnología a la Universidad Estatal del Sur de Manabí.

Conclusiones

- La línea base de los desechos que se producen en el Laboratorio de biotecnología de la UNESUM indica que el laboratorio está funcionando desde octubre del 2011 y se inició con siembra de tejidos de especies forestales y agrícolas; las áreas que tiene el laboratorio son Invernadero, área de cuarentena, área de limpieza de material vegetal, bodega o almacén de reactivos y cristalería, laboratorio, área de preparación de medios, almacén de medios, cuarto de siembra, área de crecimiento, área de microscopio, sala de recepción, sala de proyección y las oficinas don estas ubicados los cubículos de los investigadores que laboran en el laboratorio. Está dotado con equipos para la siembra de explante, esterilización de reactivos y material en general, además cuenta con instrumentos de precisión para el pesaje de los reactivos.
- Los docentes y estudiantes realizan prácticas de laboratorio y trabajos de investigación en el área de biotecnología vegetal de las carreras de Ingeniería Agropecuaria, Forestal y Ambiente. La capacidad instalada actual es para 6 estudiantes por grupo para docencia y dos para investigación. Actualmente el laboratorio cuenta con 2.000 plantas forestales, frutales y de café en el invernadero que sirven para la capacitación integral y plantas donadores de explante para la micro propagación. Ahora se está trabajando en dos parcelas agroforestales y un huerto clonal con cinco parcelas de plantas de *Cordia alliodora* reproducidas por estaquillas y de diferentes procedencias.
- El 100 % de los profesionales en formación indican que si realizan actividades prácticas en el laboratorio de Biotecnología de la UNESUM, el 31 % indicaron Manejo de materiales y equipos de laboratorio, el 51 % coincidieron que en todas las áreas hay personal capacitado, el 51 % indicaron que cada 21 días realizan prácticas, el 51 % menciona que realizan la aplicación de reactivos, el 71 % indicaron que los lavados de reactivos e insumos son llevados a una poza que está ubicada a un costado del vivero a cielo abierto, el 31 % manifestaron que los reactivos que más utilizan son las hormonas, al 51 % coincidieron que el tipo de material vegetal que usan son las varetas, el 57 % indicaron que realizan reproducción de plantas invitro y exvitro y el 63 % indica que si usan protección adecuada en el laboratorio.

- Los egresados indican que el 100 % realizan actividades investigativas en el laboratorio, el 80% dijo reproducción de plantas exvivo, el 80 % manifestaron que en todas las áreas existe personal capacitado, el 60 % manifestaron cada realizan cada 14 días actividades investigativas, el 60 % indico que realizan aplicación de reactivos, el 60 % indica que el agua utilizada en labores lavado de materiales, equipos y herramientas va al suelo a una poza hecha a cielo abierto cerca del invernadero, el 80 % indicaron que el reactivo que más usan son las hormonas vegetales, el 60 % manifiesta que usa rizomas en los trabajos, el 60 % manifestaron que usan reproducción de plantas exvivo y el 80 % manifestaron que si poseen protección adecuada.
- El 100 % de las personas que laboran en el laboratorio de biotecnología indicaron que este sirve para que los estudiantes y egresados realicen trabajos de investigación, al 25 % indican que las actividades que se realizan son manejo de materiales y equipos de laboratorio, reproducción de plantas invitro y reproducción de plantas exvivo, el 50 % indicaron en todas las áreas hay personal capacitado, el 50 % indicaron cada 21 días se realizan actividades de investigación, el 38 % indicaron que hacen aplicación de reactivos y el 37 % dosificación de reactivos, el 63 % indicaron que no se le hace ningún tratamiento a los residuos obtenidos por el desecho y lavado de insumos y reactivos químicos, el 25 % indicaron que lo que más usan son las hormonas, el 80 % indican que usan varetas, el 63 % manifestaron Reproducción de plantas invitro y exvivo, el 75 % manifestaron que si tienen protección adecuada.
- Al evaluar el impacto ambiental con la matriz de Leopold para conocer los tipos de residuos que se generan y afectan al entorno se identificó que las afectaciones se presentaron en el medio biológico, su componente flora y su parámetro estructura y composiciones debido a que cierta cantidad de insumos que se utilizan en el laboratorio son eliminados a campo abierto, son liberados en el suelo a un costado del invernadero que posee el laboratorio. Otro medio afectado es el fisico en su componente agua y su parámetro toxicidad debido a que parte de los insumos que se utilizan y son desechados van directamente a la tubería de aguas servidas de la ciudad de Jipijapa. También en el componente suelo y su parámetro fertilidad debido a que el laboratorio está construido en una zona alta y a medida que se acumula los insumos en la poza a cielo abierto que tiene y el suelo a través del arrastre del agua en el periodo lluvioso puede llegar a afectar en la parte baja que da directamente al río Jipijapa y contaminar sus aguas.
- En la formulación de la guía que permita la prevención, control, y mitigación de los impactos negativos y maximización de los positivos, se consideró principalmente las normas de bioseguridad que se deben considerar en el laboratorio de biotecnología de la UNESUM, Identificación de las medidas en caso de emergencia por accidentes dentro del laboratorio y estableciendo fichas técnicas para la prevención y mitigación de impactos ambientales causados por mala eliminación de residuos generados en el laboratorio y se tomó en consideración las fases de reproducción de plantas como son la Fase 0: Preparación de la Planta Madre; la Fase 1: Desinfección del Material Vegetal; la Fase 2: Introducción del material in vitro; la Fase 3: Multiplicación de los brotes; la Fase 4: Elección de un medio de enraizamiento de los explantos y la Fase 5: Aclimatación de los explantos enraizados.
- En la divulgación de la guía de Manejo Ambiental de los desechos que se generan en el laboratorio de Biotecnología a la Universidad Estatal del Sur de Manabí, se consideró

una matriz donde se considera el Objetivo Específico, contenido, las partes involucradas capacitador y capacitando, el tiempo de duración, la metodología, los recursos utilizados y la evaluación de cada una de las capacitaciones para determinar el grado de aprendizaje que tiene las personas que asisten a las capacitaciones de la guía de manejo ambiental de los desechos que se generan en el laboratorio.

Recomendaciones

- Se debe considerar que la totalidad de los trabajadores posean equipos de protección adecuados para realizar las actividades de investigación dentro del laboratorio, ya que lo que más realizan son reproducción de plantas utilizando técnicas invitro y exvitro y usando hormonas vegetales para la reproducción de plantas.
- Es necesario realizar una evacuación de las aguas residuales previo un tratamiento para evitar que estas contamine el ambiente especialmente el suelo.
- Es importante que se realicen capacitaciones permanentes para que todo el personal del laboratorio esté capacitado en bioseguridad y evitar accidentes por mal uso o manipulación de materiales, equipos, insumos o reactivos en la producción de plantas de manera invitro o exvitro.
- Se debe realizar una evaluación permanente del personal asignado al laboratorio para determinar el índice de conocimiento que posee en manejo de insumos, reactivos y/o manipulación de materiales y equipos de laboratorio para la multiplicación invitro y exvitro de plantas

Referencias

AgroBioMexico (2013) Bioseguridad. Seguridad e inocuidad de los alimentos. Beneficio y aplicaciones de la biotecnología agrícola en México y en el Mundo. Martes 15 de Enero de 2013. p. 1-3.

Betancur Pulgarin CL y Tamayo Arenas ML (s.f.) Manual para el manejo integral de los residuos Biológicos”. Universidad Tecnológica de Pereira. Adaptado para el plan de manejo ambiental por: Laura Villegas

Belza. J y Branca J (s.f). Marco Normativo Ambiental. Ecuador. Disponible en: <https://sites.google.com/site/marconormativoambiental/ecuador>

bioext (2007) BioExt S.A., una empresa de biotecnología vegetal creada por egresados de la carrera de biotecnología de la Universidad Nacional de Quilmes. © Copyright 2007 - BIOEXT. Todos los derechos reservados. Disponible en: <http://www.bioext.com/bioext>. 2007. CULTIVOS INTENSIVOS / Micro propagación. Normas de Trabajo. Normas prácticas de trabajo e higiene para laboratorios de micro propagación de especies vegetales que se practican en Bioext. © COPYRIGHT 2007 - Bioext todos los derechos reservados. Disponible en: http://www.bioext.com/cultivos_intensivos3.php

Bifani P (1992) Implicaciones internacionales de la biotecnología: la guerra de las patentes. Consideraciones tras la Ronda de Uruguay. Agricultura y Sociedad, 64 (julio-septiembre), 193-233.

Briceño E (2008) Estudios de Impacto Ambiental a Empresas. Disponible en: <http://www.ecuadorambiental.com/estudios-impacto-ambiental.html>

CECTE (2001) Bioseguridad en la aplicación de la biotecnología agropecuaria. Ingreso. 27 de agosto de 2001. Origen. Comisión de Ciencia y Tecnología. Honorable Cámara de Diputados de la Nación. Aprobación. 3 de diciembre de 2001. Comité Nacional de Ética en la Ciencia y la Tecnología. Pdf. p. 1-6.

Cedeño M (2005) Normas de bioseguridad en los laboratorios clínicos. Trabajo de Grado. Dpto. de Bioanálisis. Esc. Cs. Salud. Bolívar U.D.O. pp 54 (Multígrafo).

Corzo F (2009) La Biotecnología. Biotecnología Vegetal ZAOS. Viernes, 22 de mayo de 2009. Disponible en: <http://biotecnologiavegetalzaos.blogspot.com/>

Chilebio (2014) Biotecnología tradicional y moderna. Chile Bio - Providencia, Santiago, Chile. Martes, 21 de octubre de 2014. Disponible en: http://www.chilebio.cl/biotec_trad_moderna.php

De García E (2005) La Biotecnología Agrícola en Venezuela (Septiembre de 2005). Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. egarcia@reacciun.ve. Disponible en: <http://www.ciens.ucv.ve/biotecnologia/>

Ecologismo (2010) Definición de impacto ambiental. Disponible en: <http://www.ecologismo.com/2010/09/16/definicion-de-impacto-ambiental-2/>

El universo (2009) En América del Sur, Ecuador causa mayor impacto ambiental. Domingo 29 de agosto del 2010. © Copyright 2009. Compañía Anónima EL UNIVERSO. Todos los derechos reservados. Disponible en: <http://www.eluniverso.com/2010/08/29/1/1430/america-sur-ecuador-causa-impacto-ambiental.html>

FAO (s.f.) La biotecnología en la alimentación y la agricultura FAO

Fári MG y Kralovánszky UP (2006) The founding father of biotechnology: Károly (Karl) ErekyOrsósOttó Laboratory, University of Debrecen, Centre of Agricultural Sciences, Department of Vegetable. Publicado en International Journal of Horticultural Science. Con acceso el 2008-01-15.

García Noguera N (2005) Biotecnología. Biotecnología ambiental y Biotecnología vegetal. Portaley.com © 2000-2005. Disponible en: <http://www.portaley.com/biotecnologia/bio3.shtml>

Gabii-biotecnologia (2010) Biotecnología Ambiental y Vegetal. Octubre del 2010. Disponible en: <http://gabii-biotecnologia.blogspot.com/p/biotecnologia-ambiental-y-vegetal.html>

GRN (2010) Impactos Ambientales. Gestión en Recursos Naturales. Consultoría Ambiental. info@grn.cl. Santiago de Chile. Disponible en: <http://www.grn.cl/impacto-ambiental.html>

INFOAGRO (2013) Aplicaciones de la biotecnología agraria. © Copyright Infoagro Systems, S.L. Disponible en: http://www.infoagro.com/semillas_viveros/semillas/biotecnologia.htm

IWU MM (1996) Implementing the Biodiversity Treaty: how to make international co-operative agreements work. Trends in Biotechnology, vol. 14, 78-83.

Lañes Pareja E y Moreno M (1998) Promesas y conflictos de la I. G. Vegetal. Versión modificada de un capítulo del volumen 7 de la colección Eirene de la Universidad de Granada,

titulado Ciencia, Tecnología y Sociedad. Contribuciones para una cultura de la paz (ed: Rodríguez Alcázar, Medina Doménech y Sánchez Cazorla) pp. 315-348. Año 1997 (ISBN: 84-338-2370-1). Para más información, consultar <http://www.ugr.es/~eirene>. Disponible en: <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/eirene.htm>

Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE) (2014) Calidad Ambiental. Unidad de Producción y consumo sustentable. Disponible en: <http://www.ambiente.gob.ec/el-ministerio/>

Mellon M (1996) Rippen-on-command: in a society with ample food, why bother? *Nature Biotechnology*, vol. 14, 800.

Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE) (2014) Valores, Misión y Visión. Disponible en: <http://www.ambiente.gob.ec/el-ministerio/>

Monsanto (2014) Biotecnología. ©2002–2014 Monsanto Company - Todos los derechos reservados. Disponible en: <http://www.monsanto.com/global/ar/productos/pages/biotecnologia.aspx>

Murphy DJ (1996) Engineered oil production in rapeseed and other oil crops. *Trends in Biotechnology*, vol. 14, 206-213.

Muñoz. E (s.f.) Biodiversidad y bioseguridad: su relación con la biotecnología. Instituto de Estudios Sociales Avanzados (CSIC). Pdf. p. 1- 24.

Proaño K (2013) Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Disponible en: <http://biotecnologia.espe.edu.ec/laboratorios-investigacion/79-2/>

Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Montreal, 2000.

Pulgar-Vidal M (2012) Pulgar-Vidal pide abrir debate técnico sobre inclusión de componentes sociales en estudios de impacto ambiental. SPDA Actualidad Ambiental. Información que genera cambios. 31 enero 2012. Disponible en: <http://www.actualidadambiental.pe/?p=13806>

Rissler S y Mellon M (1996) *The Ecological Risks of Engineered Crops* (2ª edición), Cambridge (MA), MIT Press y Union of Concerned Scientists.

Salas Jiménez J y Quesada Carvajal H (2006) Manejo de desechos peligrosos. (II fase). Vol. 19-4 2006. Primera fase publicada en la Revista Tecnología en Marcha 17-4-2004. Costa Rica. Pdf. p.1- 12.

Shimoda S (1994) Agbiotech will vertically integrate agribusiness. *Biotechnology*, vol. 12, 1062-1063

Convenio sobre la Diversidad Biológica (1992) Artículo 2 de Convenio sobre diversidad biológica. Río de Janeiro, 1992.

Semarnat (2012) Impacto Ambiental y Tipos. Modificado: 22/10/2012 07:31 p.m. por Dirección General de Impacto y Riesgo Ambiental. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/transparencia/transparenciafocalizada/impactoambiental/Paginas/impactoambiental.aspx>

Semarnat (2014) Impacto Ambiental y Tipos. Modificado: Mar, 2014-10-07 10:01 por Dirección General de Impacto y Riesgo Ambiental. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales

SEMARNAT - Algunos derechos reservados © 2012 - políticas de privacidad Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/transparencia/transparenciafocalizada/impactoambiental>

usinfo.state.gov (2008) Cronología de la biotecnología vegetal en usinfo.state.gov. Con acceso el 2008-01-15

Will W (2012) Biotecnología Ambiental y Vegetal. Escrito por Wil el jul 2, 2012 en Biotecnología. Disponible en: <http://agropecuarios.net/biotecnologia-ambiental-y-vegetal.html>

