



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO *IN VITRO* PARA EL
INCREMENTO DE BIOMASA DE LOS CALLOS DE PLÁTANO (*Musa spp.*
AAB) VARIEDAD BARRAGANETE

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos

Profesora Guía

Ms. Ana Belén Parra Andagana

Autora

Paola Verónica López Viteri

Año:

2015

DECLARACIÓN PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Ana Belén Parra Andagana
Magister en Dirección de Proyectos
C.I.: 1715005276

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Paola Verónica López Viteri

C.I.: 1714166301

AGRADECIMIENTOS

“Le agradezco a Dios, por ser mi roca de refugio. A mis padres y a mi hermano, por ser mi fuente inagotable de amor, sabiduría y compromiso.

Un profundo agradecimiento al Ing. Pedro Romo-Leroux, por la confianza depositada y los conocimientos compartidos. Agradezco también al Ing. Juan Pazmiño, al Ing. Andrés Herrera y al Ing. Diego Molina por la colaboración desmedida.”

DEDICATORIA

“A mis padres, Edwin López y Nina Fernanda Viteri, quienes han sido mi apoyo absoluto y serán siempre esa luz que me motiva e impulsa a sacar lo mejor de mí para contribuir con el mundo. Los amo más allá de las palabras.”

RESUMEN

El cultivo *in vitro* es una herramienta invaluable que promueve una serie de ventajas, por ejemplo, dar soluciones a los inconvenientes que conlleva la propagación de cultivos estériles debido a su condición de triploides, como es el caso del Barraganete. Por consiguiente, el objetivo de este proyecto es estandarizar un protocolo de cultivo *in vitro* para producir eficientemente la biomasa del plátano (*Musa spp. AAB*) variedad Barraganete, con el propósito de dejar una puerta abierta para las diferentes aplicaciones que se puedan generar a futuro como la clonación de plantas con características agronómicas muy deseables durante todo el año, la producción de nuevos híbridos y la obtención de plantas transgénicas, entre otras. En el proceso de desinfección, los explantes fueron sujetos a 12 tratamientos. Todos estos se generaron a partir de 3 concentraciones de hipoclorito de sodio (2%, 10% y 20%); 2 rangos de tiempo (45 min y 90 min) y 2 niveles en cuanto al número de lavados (2 y 3). Posteriormente, se procedió a sembrar los explantes en un nueve medios de cultivo MS diferentes, enriquecidos con 3 concentraciones de sacarosa (20; 30; 40 g/L), ácido naftalenacético (ANA) (2.30; 13.95; 46.50 mg/L) y N6-benciladenina (BA) (2.5; 6; 10 mg/L). Los explantes introducidos en el medio suplementado con 6 mg/L de BA; 13.95 mg/L de ANA y 30 g/L de sacarosa, generaron un peso del callo de 6.90 g, convirtiéndose en el mejor tratamiento.

ABSTRACT

In vitro cultivation is an invaluable tool that promotes a range of benefits, the primary is provide solutions to the problems which involves propagation of sterile cultures due to their status as triploid, as the case of Barraganete variety. Therefore, the objective of this project is to standardize a protocol for *in vitro* culture to efficiently produce biomass plantain (*Musa* spp. AAB), with the aim of leaving an open door for different applications that can generate on the future such as cloning with highly desirable agronomic characteristics during the whole year, production of new hybrids and obtaining transgenic plants, among others. In the disinfection process, the explants were subjected to 12 treatments. These were generated from 3 concentrations of sodium hypochlorite (2%, 10% and 20%); 2 ranges of time (45 min and 90 min) and levels in regard of the number of washes (2 and 3). Then, the explants were planted in 9 different MS culture medium, enriched with 3 concentrations of sucrose (20; 30; 40 g/L), naphthalene acetic acid (NAA) (2.30; 13.95; 46.50 mg/L) and N6-benciladenina (BA) (2.5; 6; 10 mg/L). The explants introduced in medium supplemented with 6 mg/L of BA; 13.95 mg/L NAA and 30 g/L of sucrose, generated a callus of 6.90 g weight, becoming the best treatment of the experiment.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
HIPÓTESIS.....	4
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Importancia económica de la especie en estudio.....	5
1.2. Origen y Distribución geográfica.....	5
1.3. Cultivo <i>in vitro</i>	6
1.4. Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i> de Barraganete.....	8
1.4.1. Material vegetal.....	8
1.4.2. Componentes químicos	8
1.4.2.1. Sales inorgánicas	8
1.4.2.2. Vitaminas.....	9
1.4.2.3. Reguladores de crecimiento	9
1.4.2.4. Carbohidratos	9
1.4.2.5. Agente gelificante	9
1.5. Calogénesis	9
2. DESCRIPTORES DEL PLATANO.....	11
2.1. Plátano (<i>Musa</i> spp. AAB) variedad Barraganete.....	11
2.1.1. Clasificación taxonómica	12
2.1.2. Descriptores del Barraganete	13
2.2. Materiales y métodos	14
2.2.1. Localización del ensayo.....	14
2.2.2. Selección de plantas madre, colecta y transporte del material vegetal	15

3. PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN.....	18
3.1. Principio	18
3.2. Equipos y materiales especiales	18
3.3. Reactivos.....	18
3.4. Procedimiento	19
3.5. Tratamientos.....	21
4. PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN EFICIENTE DE BIOMASA	23
4.1. Principio	23
4.2. Equipos y materiales especiales	23
4.3. Reactivos.....	24
4.4. Procedimiento	25
4.5. Tratamientos.....	26
5. RESULTADOS	28
5.1. Desinfección de explantes	28
5.1.1. Contaminación	28
5.2. Producción de biomasa	33
5.2.1. Peso de la biomasa	33
6. DISCUSIÓN.....	41
6.1. Desinfección de explantes	41
6.2. Producción de biomasa	43
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
7.1. Conclusiones	46
7.2. Recomendaciones	47
REFERENCIAS	48
ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descriptores del Barraganete	16
Tabla 2. Componentes del medio de Cultivo Murashige y Skoog	21
Tabla 3. Tratamientos de desinfección para los explantes de plátano (Musa spp. AAB) variedad Barraganete	22
Tabla 4. Tratamientos para producción eficiente de biomasa de plátano (Musa spp. AAB) variedad Barraganete	27
Tabla 5. Tabla de contingencia para contaminación basada en la sobrevivencia de las repeticiones a la quinta semana	29
Tabla 6. Tabla de contingencia para generación de biomasa en función del promedio del peso de los tratamientos.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plátano (<i>Musa spp.</i> AAB) variedad Barraganete.....	12
Figura 2. Material vegetal cortado en forma de rectángulo.	17
Figura 3. Explantes introducidos en los tratamientos de desinfección respectivos.	20
Figura 4. Elaboración de medios previo a la dispensación en los frascos de vidrio.....	25
Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia de explantes en la quinta semana, con respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio, tiempos de inmersión y número de lavados.....	29
Figura 6. Prueba de normalidad de Skewness/Kurtosis en función de la variable sobrevivencia.	30
Figura 8. Prueba de Fisher para comparación entre medias de tratamientos evaluados en función del tiempo de viabilidad del explantes.	31
Figura 11. Promedio del peso de biomasa generada en los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T7, T8, T9 y T10.	34
Figura 12. Prueba gráfica de histograma para la normalidad de la variable biomasa.	35
Figura 13. Prueba gráfica de normalidad de p-plot para la variable biomasa.....	35
Figura 14. Prueba de normalidad de Skewness/Kurtosis en función de la variable biomasa.	36
Figura 15. Análisis de la varianza de la variable biomasa.	36
Figura 16. Prueba de significación de Scheffé al 5% para la interacción de las variables biomasa*sacarosa en la evaluación del peso.....	37
Figura 17. Prueba de significación de Scheffé al 5% para la interacción de las variables biomasa*complejo hormonal en la evaluación del peso.	38
Figura 18. Prueba de significación de Scheffé al 5% para la interacción de las variables biomasa*tratamientos en la evaluación del peso.....	39

INTRODUCCIÓN

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El cultivo de plátano (*Musa spp.* AAB) variedad Barraganete, además de perfilar como uno de los cimientos más representativos en la socioeconomía del país, se ha convertido en un soporte para la seguridad alimentaria del mismo. Basados en un paradigma económico y social, se puede afirmar que este cultivo ha venido generando una amplitud significativa en cuanto a las plazas de trabajo y a su vez, proporcionando a la población campesina una fuente alimentaria energética permanente. Según los informes del INEC en el 2011, se reportó en el país un total de 144. 981 hectáreas de plátano, de las cuales, 86. 712 hectáreas están bajo el sistema de monocultivo y 58. 269 hectáreas se encuentran asociadas con otros cultivos. La superficie donde se obtiene más productividad de esta musácea es aquella conocida como el triángulo platanero correspondiente a las provincias de Manabí, Santo Domingo y los Ríos con 52. 612, 14. 249 y 13. 376 hectáreas, respectivamente (INIAP, s.f.).

De acuerdo con la información del año 2011 manifestada por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), el rendimiento promedio de plátano no cumplió con las expectativas esperadas para ese periodo; con todos los esfuerzos empleados apenas se consiguió producir 5 toneladas por hectárea al año. La baja productividad registrada se vio ligada al sinnúmero de problemas bióticos, abióticos y tecnológicos presenciados en aquel entonces. Tal fue la magnitud del caso, que se llegó a la conclusión de que más del 60% de la superficie nacional no tiene acceso a la tecnología (INIAP, s.f.).

Posteriormente y de conformidad con las estadísticas dadas por el Ministerio de Comercio Exterior (MCE) en el 2013, los datos ya eran alentadores. Las exportaciones de banano y plátano habían incrementado el 13.13% comparado con el mismo periodo del año anterior (Dirección de Inteligencia Comercial e Investigaciones, s.f.-a).

Al siguiente año, en el acumulado a abril del 2014, el sector de banano y plátano ya se constituyó en la principal división de exportación con un 22.14% de participación del total no petrolero, según el boletín de junio/julio de 2014 de PRO Ecuador (Dirección de Inteligencia Comercial e Investigaciones, s.f.-b).

Con estos datos en mente, se establece que el Barraganete es la variedad de preferencia para la exportación hacia destinos como Estados Unidos y Europa. Sin embargo, como consecuencia del ataque de plagas y/o enfermedades virales ya sea el caso del virus del estriado del banano, el cual compromete el buen estado de la nervadura principal, el pseudotallo y el fruto; los agricultores terminan eliminando miles de unidades productivas o en su defecto, optando por densidades bajas de siembra, lo que ocasiona que el área sembrada en el país no responda a los valores reales de producción para cubrir la demanda exigida (Armijos, 2004).

Una alternativa para solucionar este problema es la micropropagación *in vitro* de Barraganete mediante meristemas apicales, razón por la cual se pretende realizar este estudio. De tal manera que se pueda asegurar y promover la producción de dichos clones con características agronómicas específicas y sobretodo, libre de patógenos.

Por otra parte, un motivo de gran significancia para la elaboración de este proyecto es brindar a los productores una solución para optimizar el tiempo y demás recursos que se invierten en ampliar, renovar o iniciar las plantaciones de Barraganete con el método de propagación habitual, el cual es de tipo vegetativo a partir de cormos. Con la reproducción vegetativa tradicional es muy probable que se genere una transmisión de patógenos sistémicos, sin contar con el hecho de que no siempre se dispone del material para la siembra, mientras que al realizar una producción masiva de plantas mediante la técnica de cultivo *in vitro*, se puede asegurar que el crecimiento de las plantas, su comportamiento fisiológico y la cosecha de los frutos sea uniforme debido a que poseen el mismo material genético, y por ende se facilitarán las prácticas culturales en grandes extensiones (Roca y Mroginski, 1991, p. 498).

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

De acuerdo con la información proporcionada por el INIAP, las principales variedades de musáceas explotadas en el país son el banano, destinado principalmente para el autoconsumo y el plátano que se destina en su mayor parte a la exportación, cumpliendo con envíos anuales de alrededor de 90000 toneladas de este cultivar (INIAP, s.f.). Por lo tanto, el incentivo de este proyecto es producir eficientemente la biomasa del cultivo *in vitro* de Barraganete mediante yemas apicales con el objetivo de dejar una puerta abierta para las diferentes aplicaciones que se puedan generar a futuro como la clonación de plantas con características agronómicas muy deseables durante todo el año, la producción de nuevos híbridos y la obtención de plantas transgénicas, entre otras.

Por otra parte, la aplicación de metodologías existentes como las que propone Roca y Mroginski (1991, p. 505-506) para las fases de colección de material inicial, aislamiento, cultivo de meristemas y propagación masiva de brotes; en las condiciones de laboratorio de la Universidad de las Américas también es de gran importancia en este proyecto debido al surgimiento de posteriores investigaciones como la producción de metabolitos secundarios orientados a cumplir actividades biológicas específicas. Cabe recalcar que este proyecto tendrá una continuación destinada a la producción de catalasa para su aplicación como antioxidante alimentario.

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar un protocolo de cultivo *in vitro* para el incremento de biomasa de los callos de plátano (*Musa* spp. AAB) variedad Barraganete.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar las plantas madre a partir de los descriptores del plátano (*Musa* spp. AAB) variedad Barraganete de modo que se garantice la calidad del explante.

- Estandarizar los protocolos de desinfección de tal manera que se asegure el máximo porcentaje de prendimiento del explante extraído de yemas apicales.
- Generar una producción eficiente de biomasa mediante la formulación de un medio de cultivo en la fase dos (desarrollo) cuya correlación entre azúcar y hormonas, permita el desarrollo de biomasa en menor tiempo.

HIPÓTESIS

H1: Utilizando yemas apicales de plátano (*Musa* spp. AAB) variedad Barraganete es posible establecer un protocolo de cultivo *in vitro* para el incremento de biomasa de los callos.

H0: Utilizando yemas apicales de plátano (*Musa* spp. AAB) variedad Barraganete no es posible establecer un protocolo de cultivo *in vitro* para el incremento de biomasa de los callos.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Importancia económica de la especie en estudio

El Barraganete se perfila como un producto básico en la dieta de países tropicales, incluyendo Ecuador, donde además de generar fuentes de divisas debido a la gran cantidad de mano de obra, bienes y servicios que se emplean, se ha perfilado como uno de los mejores recursos permanentes y energéticos, promoviendo de esta manera la seguridad alimentaria en el país.

Basados en el enfoque económico y según la información proporcionada por Trade Map, Ecuador se encuentra abasteciendo el 17% de las importaciones de plátano a nivel mundial, información que concuerda con los datos estadísticos del Banco Central del Ecuador (BCE) al afirmar que en el periodo del 2010 al 2014, la tasa de crecimiento promedio anual fue de 5.83% (Dirección de Inteligencia Comercial e Investigaciones, s.f.-c).

1.2. Origen y Distribución geográfica

El género *Musa* contiene una gama de 30 a 40 especies, las cuales se caracterizan por ser diploides en su totalidad. Entre las más comerciales se encuentran *Musa acuminata* (AA) y *Musa balbisiana* (BB). Todas estas tienen su origen en el continente asiático, pasando desde India y Tailandia hasta Nueva Guinea y Australia (Martínez, 1998, p. 9).

De la especie silvestre *Musa acuminata* (AA), por restitución cromosómica en la fase de meiosis, se formaron los triploides AAA, convirtiéndose en uno de los clones con más importancia económica puesto que se trata de los híbridos de bananos que en la actualidad se comercializan a nivel mundial. Con el paso del tiempo, optaron por realizar el cruce de la especie *Musa acuminata* (AA) con *Musa balbisiana* (BB), obteniendo así mayor resistencia a las condiciones ecológicas adversas y por supuesto, a enfermedades, lo que generó que su rango de distribución fuese mayor (Martínez, 1998, p. 9).

Según Alfonso Martínez (1998, p. 10), a pesar de ser un género cuya historia se remonta hace miles de años atrás, la distribución a nivel mundial empezó

hace apenas 2000 años aproximadamente, cuando después de ser sembrado en África fue trasladado a la zona oriental mediante los inmigrantes indonesios y consecuentemente, llevado a la costa occidental por los portugueses. Sobre la introducción en América, se puede intuir que en un inicio fue llevado por los árabes a España y finalmente transportado al continente americano.

En cuanto a Ecuador, es ampliamente conocido que las provincias que más cultivan Barraganete son Manabí, Guayas, Los Ríos y Esmeraldas, dado que gozan de una zona tropical húmeda.

1.3. Cultivo *in vitro*

El uso de cultivos *in vitro* es una herramienta efectiva que se caracteriza especialmente por el hecho de realizar propagaciones masivas de plantas libres de patógenos mediante la utilización de un medio de cultivo nutritivo y aséptico en condiciones ambientales controladas.

Este suceso se esclarece en 1838, cuando Schleiden y Schwann, afirman con su teoría que la célula es la unidad básica de la vida e implícitamente se puso de manifiesto la autonomía vital de la misma y debido a esto, su totipotencia (Dorris, 2010).

Para el año de 1853, Trécul describió un proceso de cicatrización de heridas y formación de callos en numerosas especies. Posteriormente, Vochting en 1878 realiza experimentos sobre la polaridad celular. Dos años después, Sachs continúa con el estudio que revelaba que las plantas contenían sustancias de órganos de formación los cuales están distribuidos polarmente, y de ahí parte el concepto de que la diferenciación estaba en función de la posición relativa de la célula en la planta, corroborando el hecho de que no era permanente (Pospíšilová, 1997).

Un avance importante ocurre en 1893 por el cuasi pionero en este campo, Rechinger, quien trató de determinar experimentalmente el límite permitido de proliferación de tejidos. Sin embargo, el medio de cultivo no contempló los parámetros de asepsia ni de nutrición requeridos por lo que dificultó sobremanera su trabajo. Este principio fue formulado nueve años después con

un toque más avanzado por Haberlandt en 1902, quien, en vez de preguntarse cuál es el límite de proliferación, asumió que no habría ninguno a causa de su creencia absoluta en la teoría celular. Por estos años, se logró que la célula permaneciera viva de 20 a 27 días e incrementara su volumen once veces más que el original. El éxito de su estudio lo consigue al descubrir finalmente que la división celular ocurre casi sin excepción alguna, siempre y cuando existan fragmentos de tejido vascular. Desafortunadamente, no se pudo demostrar su hipótesis puesto que los medios de cultivo utilizados no contenían los reguladores de crecimiento que vienen implícitos en materiales como la zanahoria (Gautheret, 1983).

No fue sino hasta inicios del siglo XX que empezaron los estudios usando medios de cultivo muy simples como avena cocida, para hacer crecer plantas con la intención de analizar su fisiología. Con el paso del tiempo, sustancias extraídas del plátano, las papas y el agua de coco fueron brindando características interesantes para ser utilizadas como tales. Actualmente, al hablar sobre los medios de cultivo, se encuentra desde uno propuesto en 1925 denominado Krudson B para la familia de las Orchidaceae; hasta aquel generado a mediados del siglo XX por Murashige & Skoog, el cual constituyó la base para un sinnúmero de plantas (Dorris, 2010).

Después de Haberlandt, recién en los años 30 y gracias a White en Estados Unidos y Gautheret en Francia, se hizo factible la posibilidad de cultivar células y tejidos vegetales de manera absoluta mediante la herramienta de cultivo *in vitro*. No transcurrió mucho tiempo hasta que en esta misma temporada, se registraron dos acaecimientos que repercutieron de forma trascendental sobre el desarrollo de esta técnica: primero, la identificación de las auxinas como reguladoras naturales del crecimiento vegetal, y segundo, el reconocimiento de la importancia de las vitaminas del complejo B en el crecimiento de las plantas (Calva *et al*, 2005).

En 1970, comenzó la micropropagación de las Bromelias, debido a sus bajas probabilidades de reproducirse por semillas y de la misma manera, esta industria empezó a tomar fuerza (Dorris, 2010); esta vez, cumpliendo con

estándares más específicos que involucraban la obtención de metabolitos secundarios, la clonación de plantas con características agronómicas muy deseables durante todo el año, la producción de nuevos híbridos y la obtención de plantas transgénicas, entre otros, aplicaciones que hoy en día, describen claramente la función de esta técnica.

Diez y nueve años después, en Ecuador, empieza a desarrollarse la industria de la propagación *in vitro* en laboratorios como Agrogenotec, quienes se especializaban en la germinación de orquídeas obtenidas por hibridación con el objetivo de desarrollar nuevos colores en los géneros *Cattleya* y *Phalaenopsis* (Romo-Leroux, 2012). En la actualidad, el enfoque de esta industria está en los cultivos de mayor importancia económica para el país como el cacao, el plátano, el café, las rosas, entre otros.

1.4. Factores que influyen en el cultivo *in vitro* de Barraganete

1.4.1. Material vegetal

Para llevar a cabo este proyecto de investigación se utilizaron los cormos de Barraganete, cuyo desarrollo se potencializa en la etapa de diferenciación floral y producción de la planta. Al realizar el primer corte transversal es posible apreciar como las bases de las vainas de las hojas están ubicadas de tal manera que forman un revestimiento superficial para la yema central o meristemo apical. El objetivo final es obtener un cilindro de 3 a 5 cm de alto sin dañar el punto de crecimiento puesto que es el responsable del dinamismo vegetativo de la planta (Martínez, Tremont y Hernández, 2004).

1.4.2. Componentes químicos

1.4.2.1. Sales inorgánicas

Están presentes en la mayoría de fertilizantes y se encargan de cubrir las necesidades específicas de la planta. Se clasifican en macronutrientes como el nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio, hierro; y en micronutrientes como el boro, molibdeno, manganeso, cobalto, zinc, cobre, cloro e iodo (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994, p. 9).

1.4.2.2. Vitaminas

Son nutrientes orgánicos que potencializan las funciones enzimáticas de las células generando así, el crecimiento óptimo de los explantes (Toledo, Espinoza, Golmirzaie, 1998, p. 2).

1.4.2.3. Reguladores de crecimiento

Son las hormonas que controlan y regulan los procesos de crecimiento, desarrollo y diferenciación en el reino Plantae. Cabe recalcar que las condiciones ambientales están estrechamente relacionadas con su evolución. Los grupos básicos de hormonas vegetales son las auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico. En este proyecto de investigación se ha empleado la auxina ANA y la citoquinina BA (Montiel, 1995, p. 30).

1.4.2.4. Carbohidratos

Debido a que la minoría de cultivos *in vitro* se caracterizan por ser autótrofos, nace la necesidad de adicionar una fuente de carbono. En este caso de estudio se utilizó sacarosa, sin embargo se conoce que la glucosa actúa con la misma efectividad mientras que la fructosa en menor medida (Roca y Mroginski, 1991, p. 30).

1.4.2.5. Agente gelificante

Está comprobado científicamente que la gelrita o la agarosa son más efectivos como agentes gelatinizadores. Sin embargo, por cuestión de costos se decidió emplear agar, el cual debe ser empleado con las concentraciones adecuadas para descartar cualquier posible alteración en la eficiencia de los cultivos de tejidos vegetales (Mafia et al., 1991, p.80).

1.5. Callogénesis

Callogénesis es el proceso de formación de callo, el cual es un tejido tumoral no organizado y poco diferenciado cuyas células están compuestas de tejido parenquimático. Al ser observado microscópicamente, se puede notar que no

se trata de una masa compuesta de células homogéneas, debido a que predominan ambos tipos de tejido: el diferenciado y el desdiferenciado (Chawla, 2002, p. 33).

Para la producción de biomasa de plantas monocotiledóneas, como es el caso del Barraganete, lo ideal es empezar con un explante juvenil que contenga células meristemáticas, de esta manera se puede garantizar que la inducción a callo no será un inconveniente. Varios autores señalan que el cultivo de yemas apicales aporta serias ventajas en la micropropagación *in vitro* debido a que mantiene la estabilidad genética y asegura plantas con alta calidad fitosanitaria al presentar escasez de patógenos en su estructura; razón por la cual se decidió utilizar yemas apicales como propágulo inicial en este estudio. Se atribuyen diversas suposiciones por las cuales es poco probable que los explantes compuestos por el meristemo apical presenten virus o bacterias, entre ellas perfila la presencia natural de auxinas o citoquininas, la ausencia de tejidos vasculares y la presencia de inhibidores víricos (García et al., 2004, p. 76 y Martínez y Agustí, 2006, p. 75).

El siguiente factor esencial a considerar, es la presencia de un regulador de crecimiento que cuente con una alta actividad de auxinas, las cuales están encargadas de la activación y división de las células no diferenciadas. Por lo general, la más utilizada es la hormona 2,4-D cuya concentración dependerá netamente del tipo de explante a utilizarse (Bajaj, 2013, p. 304).

2. DESCRIPTORES DEL PLÁTANO

2.1. Plátano (*Musa spp. AAB*) variedad Barraganete

Este grupo de híbridos triploides son originarios de India, país caracterizado por haber realizado un sinnúmero de mutaciones somáticas. Entre los cultivares correspondientes al arreglo cromosómico AAB, se encuentran aquellos frutos que no se pueden apreciar sin un previo proceso de cocción como es el caso del Barraganete (Figura 1), así como también, aquellos que poseen un sabor dulce (Robinson, Saúco, 2010, p. 2).

El cultivo de Barraganete se desarrolla en una temperatura alrededor de 20 °C a 32 °C. Si la temperatura supera el límite inferior es probable que suceda un retraso en el desarrollo fisiológico de la planta, lo que traería como consecuencia la tardía emergencia del brote, la muerte prematura de las hojas, la pérdida de turgencia del tallo, el nacimiento deforme de las manos, entre otras. Otro factor ambiental determinante es el agua. Debido a que el 87.5% del peso de la planta corresponde a la misma, el Barraganete debe ser cultivado en una región cuya precipitación pluvial sea de 1800 a 3000 mm durante todo el año (Rodríguez, Morales y Chavarría, 1985, p. 6).

En cuanto al viento, empiezan a surgir problemas desde que sobrepasan los 20 km/h; ocasionando el debilitamiento de la planta, así como, la pérdida de manos por el doblamiento del pseudotallo. Por otra parte, la intensidad apropiada de luz es de gran importancia para el cultivo, puesto que como toda planta, si crece bajo la sombra de otra, tendrá un porte más bajo y tomará más tiempo la obtención de sus frutos. El pH óptimo del suelo es de 6.5 y debe caracterizarse especialmente por ser fértil, poseer un buen drenaje interno, tener una buena estructura y de preferencia contar con una textura franco-arenosa o franco-arcillosa (Dávila et al., 1983, p. 2).



Figura 1. Plátano (*Musa* spp. AAB) variedad Barraganete.

2.1.1. Clasificación taxonómica

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Subdivisión:** Angiosperma
- **Clase:** Liliopsida (Monocotiledónea)
- **Orden:** Escitaminales
- **Familia:** Musáceas
- **Subfamilia:** Musoideae
- **Género:** *Musa*

- **Ploidía:** AAB
- **Cultivar:** Barraganete

2.1.2. Descriptores del Barraganete

El Barraganete es una planta monocotiledónea que se desarrolla eficazmente en el clima tropical, alcanzando una altura aproximada de 4 m. Morfológicamente hablando, consta de un tallo verdadero conocido como cormo, el cual se caracteriza por permanecer soterrado y poseer una disposición asimétrica. En su estructura interna se diferencian dos zonas separadas por una capa de haces vasculares. Mientras que en la parte superior se encuentra el punto de crecimiento, material vegetal que se ha utilizado en este proyecto de investigación para lograr su desdiferenciación (Rodríguez et al., 1985, p. 2).

Las raíces se desarrollan en la fase vegetativa la cual empieza desde el establecimiento del cormo en el suelo hasta la culminación de los posteriores seis meses. La mayoría poseen una orientación horizontal llegando a superar los 3.5 m de largo, como es el caso de las raíces superiores. En tanto que los pelos absorbentes que se han ramificado de las raíces secundarias, se encuentran de 10 a 15 cm de profundidad. Es importante mencionar que el momento de la parición es un indicador para saber que la diferenciación de las mismas ha concluido (Dávila et al., 1983, p. 3).

La unión de las vainas envolventes de las hojas es lo que se conoce como pseudotallo. Su altura aproximada es de 403 cm y se caracteriza por tener una estructura muy vigorosa, capaz de mantener ligeramente inclinada a la planta a pesar del peso que conlleva su sistema foliar y el racimo en formación. Debido a que en esta zona se encuentran las reservas de almidón y de agua del Barraganete, el perímetro del pseudotallo de la mayoría de variedades no es menor a los 80 cm, para el caso del Barraganete se estima que alcanza 86 cm. En cuanto al tallo verdadero, se conoce que inicia su crecimiento en la fase floral cuya duración es de 3 meses aproximadamente (Dávila et al., 1983, p. 3 y Rodríguez et al., 1985, p. 2).

Belalcazar (1991, p. 275), señala que durante el ciclo vegetativo, el número de hojas emitidas es de 38 aproximadamente tomando en cuenta un periodo de 5.5 a 6.1 meses, llegando así a estimar un promedio de 9.1 días/hoja en la tasa de emisión foliar. La hoja ancha o verdadera está conformada por cinco estructuras: las vainas foliares que están formando el pseudotallo, el peciolo que constituye el canal conductor de agua, la lámina foliar cuya representación gráfica es ovado-oblonga, la nervadura central que es la prolongación del ápice y el apéndice cuya función es permitir que la hoja emerja adecuadamente por el pseudotallo.

La inflorescencia posee entre 5 a 8 cm de diámetro y se genera a continuación del tallo. En esta fase las hojas son reemplazadas por las brácteas las cuales se encargan de recubrir las flores. La bellota, en el quinto día de su aparición, empieza a inclinarse debido a su geotropismo positivo, en tanto que al catorceavo día ya se puede apreciar las flores femeninas y masculinas (Rodríguez et al., 1985, p. 4)

Tomando en cuenta todas las fases de desarrollo, se establece que el ciclo vegetativo del Barraganete es de 11.4 meses aproximadamente, destacándose por su longitud, circunferencia y espesor de los dedos del racimo, si se lo compara con el dominico (INIAP, s.f.).

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Localización del ensayo

El proyecto de investigación se lo llevó a cabo en dos fases. Gracias a la colaboración de la empresa Agricultor Guaynero, ubicada al Noroccidente de Manabí, se pudo disponer del material vegetal para la fase de campo. La plantación de Barraganete de donde se recolectaron los cormos, está localizada en El Carmen. Su latitud es de 0° 16' 11" Sur y su altitud mínima y máxima es de 2000 m.s.n.m. y 3000 m.s.n.m., respectivamente.

La fase de experimentación se ejecutó, en un principio, en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias de la

Universidad de las Américas – UDLA, localizada en Quito, calle José Queri y Av, De Los Granados, provincia de Pichincha, a una altitud media de 2800 m.s.n.m. Posteriormente y gracias al apoyo del Ing. Pedro Romo-Leroux, se trasladó el material al Laboratorio BIOGREEN C.A, ubicado en el sector de Amaguaña.

2.2.2. Selección de plantas madre, colecta y transporte del material vegetal

Las plantaciones de la empresa Agricultor Guaynero cuentan con sistemas de siembra triangulares, también conocidos como tresbolillo, por lo que en cada hectárea se dispone de 1392 plantas. Este número se obtiene aplicando la Ecuación 1., descrita por Baraona y Sancho (1991, p. 112).

$$N = \frac{ha}{d^2 \cos 30^\circ}$$

(Ecuación 1)

Donde:

N = número de plantas por ha

ha = 10.000 m²

d² = 8.2944 m² siendo la distancia entre siembra 2.88 m x 2.88 m

De manera que al tratarse de una población finita, se empleó la Ecuación 2., para calcular la muestra constituida por 301 plantas que se utilizaron para registrar la información en cuanto a los descriptores del Barraganete (Fernández, 2004, p. 165).

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2 N}{e^2(N - 1) + Z^2 \sigma^2}$$

(Ecuación 2)

Donde:

N = 1392 plantas de Barraganete por ha

Z = 1.96 para un nivel de confianza del 95%

σ = 0.5

e = 0.05

Como consecuencia, se recopilaron los datos descritos en la Tabla 1., los cuales coinciden en su mayoría, con los descriptores expuestos anteriormente, pertenecientes a especificaciones manifestadas por diferentes autores.

Tabla 1. Descriptores del Barraganete

DESCRIPTORES DEL BARRAGANETE	
PARÁMETROS	ASPECTOS AGRONÓMICOS
Días desde siembra hasta floración	224
Días desde floración hasta cosecha	91
Cosecha	9 a 12 meses después de la siembra
Altura de la planta (cm)	430
Perímetro del pseudotallo (cm)	85
Peso del racimo (Kg)	18
Número de manos	6 a 8
Calibre del fruto	23 cm de largo y 4.5 cm de ancho

Una vez seleccionadas las plantas madre, se distinguieron los hijuelos de cada una que poseían de 1.8 m a 2 m de altura, los cuales estaban entre 3 y 4 meses de edad. Estas son conocidas como hijo de espada y las características agronómicas similares a las plantas madre que poseen, las hacen propicias para garantizar el éxito de una plantación cuya propagación sea vegetativa, puesto que son consideradas como las semillas de mejor calidad.

Debido a que Agricultor Guaynero es una empresa con fines de exportación, sus prácticas culturales demandan de mayor exigencia para la obtención de certificaciones internacionales, por lo que en este caso, no fue necesario incluir un tratamiento fitosanitario en campo ya que contaba con el mismo.

Se retiró la parte aérea y se dio la forma de un rectángulo de 15 cm x 10 cm, procurando mantener intacto el meristema central, como se indica en la Figura 2. Una vez recolectados todos los cormos, fueron lavados con agua potable y colocados en un cooler con hielos, con la finalidad de frenar de cierta manera el proceso de oxidación. Finalmente, se los transportó vía terrestre hacia el laboratorio de la Universidad de las Américas – UDLA, donde se realizó la extracción y desifección del explante.



Figura 2. Material vegetal cortado en forma de rectángulo.

3. PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN

3.1. Principio

3.1.1. El tiempo que transcurre desde la recolección de los cormos hasta la siembra debe ser el menor posible. Una vez acopiado el material, se procedió a desinfectar y realizar la siembra en un periodo no mayor a 15 h.

3.1.2. El proceso de desinfección es crítico para poder continuar con la propagación del material vegetal, por lo que se optó por realizar la extracción de los explantes en un área diferente al lugar donde se encuentra la cámara de estabilización.

3.1.3. La extracción de material vegetal se la debe realizar con mucha precaución, de tal manera que el punto de crecimiento no sufra ningún riesgo físico, químico, ni biológico.

3.2. Equipos y materiales especiales

3.2.1. Mecheros de alcohol

3.2.2. Cuchillos

3.2.3. Recipientes de plástico correctamente etiquetados

3.2.4. pH-metro

3.2.5. Medidor multiparamétrico

3.2.6. Balanza analítica

3.2.7. Cámara de flujo laminar

3.2.8. Cámara de estabilización

3.2.9. Autoclave (0.15 MPa de presión, 121 °C durante 21 min)

3.3. Reactivos

3.3.1. Durante la desinfección, se utilizó cloro al 2%, 10% y 20%, alcohol al 95% y agua destilada.

Cloro al 2%.

Aplicando la fórmula

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

C_1 = concentración inicial

V_1 = volumen inicial

C_2 = concentración final

V_2 = volumen final

Se determina que se debe pesar 380,9 mL de cloro comercial, cuya concentración es de 5,25%, en un vaso de precipitación y se debe aforar a 1 L con agua destilada.

Alcohol al 95%.

Aplicando la Ecuación 2., se determina que se debe pesar 989.6 mL de cloro comercial, cuya concentración es de 96%, en un vaso de precipitación y se debe aforar a 1 L con agua destilada.

3.4. Procedimiento (basado en la metodología presentada por Roca y Mroginski, 1991)

3.4.1. Se colocó en la mesa cada corno en forma de cubo, de tal manera que se facilitó el siguiente corte a realizar.

3.4.2. Se realizó el primer corte en la cara frontal para obtener un mejor ángulo de visualización del punto de crecimiento.

3.4.3. Se extrajo el explante de manera circular cuya longitud no superaba los 5 mm, tal como se muestra en la siguiente Figura 3., con el objetivo de no ocasionar ningún daño físico en el meristema central.



Figura 3. Explantes introducidos en los tratamientos de desinfección respectivos.

3.4.3. Se ubicó cada explante en una tarrina previamente etiquetada, dependiendo del tratamiento a trabajar, tomando en cuenta que se manejaron 12 tratamientos, los cuales se detallan en la Tabla 1.

3.4.4. Después del antepenúltimo lavado, se trasladó el material a la cabina de flujo laminar con el fin de realizar la última inmersión y el último lavado en condiciones de absoluta asepsia.

3.4.5. Se colocó los explantes en tubos de ensayo de 28 x 200 mm, los cuales contenían las respectivas dosis de cloro.

3.4.6. Trascurridos los 45 y 90 min de la inmersión final, se traspasó a nuevos tubos de ensayo, ahora llenos con agua destilada.

3.4.7. Una vez terminado el proceso de desinfección, se procedió a sembrar en los medios de cultivo de Murashige y Skoog (1962), estos se caracterizan por poseer todos los componentes mencionados en la Tabla 2. Conjuntamente fueron enriquecidos con 30 g/L de azúcar como fuente de carbono y 8 g/L de agente gelificante, en este caso se utilizó Bacto Agar. Cabe recalcar que todos los medios elaborados en esta investigación, se ajustaron a un pH de 5.8 y fueron esterilizados en el autoclave a 121 °C durante 21 min.

3.4.8. Pasadas las 5 semanas desde la fecha de siembra, se valoró la variable de contaminación mediante inspección visual. Para este análisis, se asignó el valor de 100 a los explantes contaminados, ya sea por hongo o bacteria y 0 a los explantes no contaminados.

Tabla 2. Componentes del medio de Cultivo Murashige y Skoog

Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)	
Componente	Concentración en el medio de cultivo (mg/L)
Sales Minerales	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA.4 H ₂ O	37.3
Vitaminas	
Myo-inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Tiamina	0.5
Glicina	2

Adaptado de Mroginski y Roca, 1991, p. 22.

3.5. Tratamientos

Para la evaluación del protocolo de desinfección, se realizó un diseño estadístico completamente al azar bajo un arreglo factorial 2 x 2 x 3, es decir, 2 niveles en cuanto a tiempo de inmersión, 2 niveles en cuanto a número de lavados y 3 niveles en cuanto a concentración de cloro, para un total de 12

tratamientos, 4 repeticiones por tratamiento; siendo la unidad experimental 1 explante por envase.

Por consiguiente, se realizaron doce metodologías de desinfección con el fin de determinar el porcentaje de prendimiento del explante extraído de yemas apicales a partir de su propagación como se indica en la Tabla 3. Estas consistieron en emplear dos tiempos de inmersión en cloro para la desinfección, siendo estos de 45 y 90 min, respectivamente.

En el proceso que tardó 45 min, se realizaron 2 lavados con cloro al 2%, 10% y 20%; estableciendo una duración de 5 min para el primer lavado y de 45 min para el último; y en el proceso que tarda 90 min, se efectuaron 3 lavados con cloro al 2%, 10% y 20% estableciendo una duración de 5 min para los dos primeros lavados y de 90 min para el último.

Tabla 3. Tratamientos de desinfección para los explantes de plátano (*Musa* spp. AAB) variedad Barraganete

Tratamientos	COLORO (%)	TIEMPO (min)	LAVADOS (#)
T1	2	45	2
T2	10	45	2
T3	20	45	2
T4	2	90	2
T5	10	90	2
T6	20	90	2
T7	2	45	3
T8	10	45	3
T9	20	45	3
T10	2	90	3
T11	10	90	3
T12	20	90	3

Transcurrida cada semana, se evaluó la variable de contaminación mediante inspección visual asignando el valor de 100 a los explantes contaminados y 0 a los explantes no contaminados. Al final de las 5 semanas, se procesaron los datos utilizando el software estadístico InfoStat. El análisis consistió de un análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas de significación de Fisher para diferenciar grupos entre tratamientos.

4. PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN EFICIENTE DE BIOMASA

4.1. Principio

4.1.1. Los parámetros de asepsia para la elaboración de medios de cultivo deben ser monitoreados con regularidad.

4.1.2. El uso y la cantidad de hormonas están relacionadas directamente con la especie a tratar. En este proyecto de investigación, se realizaron pruebas piloto con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) las cuales no tuvieron trascendencia en el tiempo debido al deterioro que se ocasionó en el explante y a la posible mutación genética que puede producir una dosis alta. (Aguilar, Ortiz y Sandoval, 2008, p. 33).

4.1.3. Previo a la siembra, los frascos deben almacenarse en condiciones ambientales controladas que promuevan el desarrollo del material vegetal, es decir, temperatura entre 25 a 27 °C y humedad del 60%.

4.2. Equipos y materiales especiales

4.2.1. Mandil quirúrgico

4.2.2. Guantes

4.2.3. Mechero de alcohol

4.2.4. Film plástico

4.2.5. Ligas

4.2.6. Frascos de vidrio de 250 mL

4.2.7. Tapas metálicas

4.2.8. Hojas de papel esterilizadas

4.2.9. Toallas absorbentes esterilizadas

4.2.10. Pinzas de 30 cm

4.2.11. Mangos de bisturí

4.2.12. Hojas de bisturí N. 24

4.2.13. Papel aluminio

4.2.14. pH-metro

4.2.15. Medidor multiparamétrico

4.2.16. Balanza analítica

4.2.17. Cámara de flujo laminar

4.2.18. Cámara de estabilización

4.2.19. Autoclave (0.15 MPa de presión, 121 °C durante 21 min)

4.3. Reactivos

4.3.1. Para desinfectar la cámara de flujo laminar se utilizó alcohol comercial al 96%.

4.3.2. Para desinfectar el material de vidrio que ingresaba a la cámara, se ocupó amonio cuaternario al 10%.

4.3.3. Para la siembra se realizaron medios de cultivo bajo la conocida formulación de Murashige and Skoog y se complementaron con BA y ANA dependiendo del tratamiento a seguir. La razón fundamental por la que se utilizaron estos reguladores de crecimiento es porque la diferenciación de las yemas apicales se produce más rápidamente, siempre y cuando se empleen medios cuya relación citoquinina:auxina sea alta. Por otra parte, se conoce que la calidad de las auxinas presentes en el medio tiene un marcado efecto sobre el metabolismo primario e induce la formación de metabolitos secundarios, lo cual es favorable para la posterior investigación que partirá de este proyecto (Roca y Mroginski, 1991, p. 158-222).

4.4. Procedimiento (basado en la metodología presentada por Roca y Mroginski, 1991)

4.4.1. Se lavó con detergente 45 frascos de vidrio con las respectivas tapas metálicas antes de colocarlos en el autoclave.

4.4.2. Se colocaron las hojas de papel periódico dentro de un sobre y posteriormente dentro de una funda plástica de polietileno previo a su esterilización.

4.4.3. Se autoclavó todo el material de vidrio y metal incluyendo las pinzas y mangos de bisturí envueltos en papel aluminio.

4.4.4. Se pesaron las sales minerales para la elaboración de los medios y se analizó la conductividad del agua destilada mediante el uso del medidor multiparamétrico.

4.4.5. Se preparó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) y se complementó con la auxina ácido naftalenacético (ANA) y la citoquinina N6-benciladenina (BA), como se muestra en la Tabla 4., con el objetivo de generar eficiencia en el peso de biomasa.



Figura 4. Elaboración de medios previo a la dispensación en los frascos de vidrio.

4.4.6. Se vertió 50 mL de medio en cada frasco de vidrio y se autoclavó a 121 °C durante 21 min, asegurándose previamente que el pH se mantuviese en 5.8.

4.4.7. Se sometieron los frascos a un período de inspección visual de 7 días con el afán de asegurar la ausencia de cualquier posible contaminación en el medio.

4.4.8. Se procedió a limpiar todas las superficies de la cámara de flujo laminar con alcohol al 96% y se mantuvo encendida la luz ultravioleta por 1 h para asegurar la desinfección completa del lugar.

4.4.9. Se realizó la siembra y se incubaron los frascos en la cámara de estabilización con un período de luz de 11 h, temperatura de 25 ± 2 °C y humedad relativa de 30 a 60%.

4.4.10. Se evaluó la variable de desdiferenciación celular cada semana mediante la inspección visual de los brotes. Al concluir las 5 semanas a partir de la siembra, se pesó la biomasa.

4.5. Tratamientos

Para la evaluación del protocolo de producción de biomasa de Barraganete, se realizó un diseño estadístico completamente al azar, bajo un arreglo factorial 3^2 , es decir, 2 factores (sacarosa, complejo hormonal) y 3 niveles en cuanto a concentración de sacarosa y complejo hormonal, para un total de 9 tratamientos, 4 repeticiones por tratamiento y 1 explante por frasco como unidad experimental.

Por consiguiente, para inducir la formación de callo, el material vegetal fue sembrado en un medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) con 7 g/L de Bacto Agar como agente gelificante. Este medio fue enriquecido con 3 concentraciones distintas de ácido naftalenacético (ANA) y de N6-benciladenina (BA) como agentes hormonales de crecimiento y con 3 concentraciones distintas de sacarosa como fuente de carbono, dando como resultado 9 tratamientos diferentes, tal como se indica a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos para producción eficiente de biomasa de plátano (Musa spp. AAB) variedad Barraganete

Tratamiento	Sacarosa (g/L)	BA (mg/L)	ANA (mg/L)
T1	20	2.50	2.30
T2	20	6.00	13.95
T3	20	10.00	46.50
T4	30	2.50	2.30
T5	30	6.00	13.95
T6	30	10.00	46.50
T7	40	2.50	2.30
T8	40	6.00	13.95
T9	40	10.00	46.50

Transcurrida cada semana, se evaluó la variable de peso de biomasa generado y al final de las 5 semanas se procesaron los datos utilizando el software estadístico Stata. El análisis consistió de un análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas de significación de Scheffé al 5% para la interacción de las variables correspondientes.

5. RESULTADOS

5.1. Desinfección de explantes

Durante la fase de desinfección del propágulo inicial de Barraganete, se evaluó la variable de contaminación mediante inspección visual. Por tal motivo, los explantes fueron sujetos a 12 tratamientos. Todos estos se generaron a partir de 3 concentraciones de hipoclorito de sodio (2%, 10% y 20%); 2 rangos de tiempo (45 min y 90 min) y 2 niveles en cuanto al número de lavados (2 y 3).

5.1.1. Contaminación

Para el análisis exploratorio de datos, se realizó una tabla de contingencia donde se detalla el número de repeticiones que permanecieron sin contaminarse hasta la quinta semana, tras la aplicación de los 12 tratamientos destinados para el protocolo de desinfección, tal como se indica a continuación.

Tabla 5. Tabla de contingencia para contaminación basada en la sobrevivencia de las repeticiones a la quinta semana

Tratamientos	CLORO (%)	TIEMPO (min)	LAVADOS (#)	SOBREVIVENCIA (repeticiones)
T1	2	45	2	3
T2	10	45	2	2
T3	20	45	2	4
T4	2	90	2	0
T5	10	90	2	2
T6	20	90	2	1
T7	2	45	3	2
T8	10	45	3	4
T9	20	45	3	3
T10	2	90	3	1
T11	10	90	3	3
T12	20	90	3	2

Se observó que los tratamientos 3 y 8, los cuales poseen las concentraciones de hipoclorito de sodio más altas (20% y 10% v/v, respectivamente), presentaron la mayor cantidad de explantes no contaminados. Por otro lado, en los tratamientos con menor concentración de este reactivo (2% v/v), se observó una mayor cantidad de explantes contaminados.

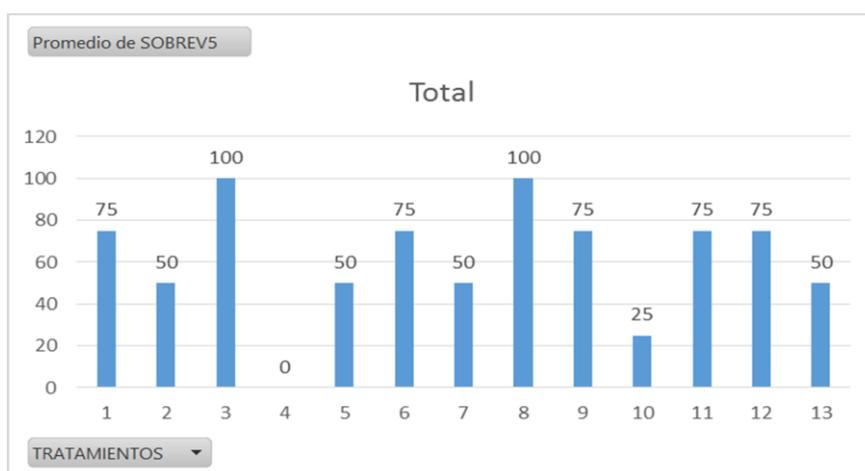


Figura 5. Porcentaje de supervivencia de explantes en la quinta semana, con respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio, tiempos de inmersión y número de lavados.

En la Figura 5., se puede apreciar que los tratamientos 3 y 8 presentaron un total de 100% de explantes no contaminados, convirtiéndose en los tratamientos más exitosos con respecto a la variable de contaminación. Mientras que los tratamientos 4 y 10 presentaron 0% y 25% de explantes libres de patógenos respectivamente, siendo los tratamientos menos efectivos para la desinfección.

Escobar, Fernández y Bernardi (2012, p. 336) señalan que para el análisis de la normalidad es posible realizar tres pruebas, con las cuales al examinar las variables, se obtendrán las mismas conclusiones. Entre ellas está la prueba de Skewness/Kurtosis, Shapiro-Wilk y Shapiro-Francia, De modo que, para comprobar la distribución de la normal es necesario que el nivel de significación sea superior al 0.05 para que se ajuste a una distribución normal.

Para este protocolo, se realizó la prueba de normalidad de Skewness/Kurtosis con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos evaluados para la desinfección cuya variable fue la supervivencia de las repeticiones hasta la semana 5, como se indica en la Figura 6.

Skewness/Kurtosis tests for Normality					
Variable	Obs	Pr(Skewness)	Pr(Kurtosis)	adj chi2(2)	joint Prob>chi2
sobrevivencia	12	0.736	0.866	0.14	0.9316

Figura 6. Prueba de normalidad de Skewness/Kurtosis en función de la variable sobrevivencia.

En la prueba de normalidad de Skewness/Kurtosis de la variable sobrevivencia se puede observar que existe un valor de la probabilidad (Prob>chi2) de 0.9316 el cual es superior al 0.05 del error, por tal razón se acepta la normalidad de la variable en mención.

Para el análisis inferencial, se identificó el número de semanas que los explantes se mantuvieron viables por cada uno de los tratamientos, es decir sin presentar anomalías de índole patológico. Posteriormente, se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) en donde el valor de p arrojado fue de 0,0877 (8,77%), el mismo que es mayor al nivel de significancia de la prueba (5%), lo que nos indica que no existe diferencia estadística significativa entre los 12 tratamientos. El error estándar de la prueba de ANOVA fue de 143.75, el cual es superior a la suma de cuadrados de todos los tratamientos (79.73), esto se debe a la cantidad de 4 repeticiones efectuadas durante la investigación por cuestiones presupuestarias. El ANOVA realizado se observa en la Figura 7.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Semanas de viabilidad	48	0.36	0.16	58.84	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gL	CM	F	p-valor
Modelo	79.73	11	7.25	1.82	0.0877
Tratamientos	79.73	11	7.25	1.82	0.0877
Error	143.75	36	3.99		
Total	223.48	47			

Figura 7. Análisis de varianza en función de los tratamientos de desinfección evaluados.

Se realizó una prueba de Fisher con el fin de encontrar los tratamientos más similares en base a la viabilidad del explantes en función del tiempo de evaluación (5 semanas), tomando en cuenta que el Barraganete demostró un tiempo aproximado de desdiferenciación celular de 3 semanas en esta investigación. Los resultados arrojados por la prueba de Fisher se muestran en la Figura 8., donde se observa que los tratamientos que lograron mantener el explante viable por mayor tiempo fueron los Tratamientos 8, 3, 11, 12, 1, 6 y 9, los cuales presentaron una media superior a las 3 semanas de viabilidad.

Test: LSD Fisher Alfa = 0.05 DMS = 2.86567					
Error: 3.9931 gl: 36					
Tratamientos	Medias	n	E.E.		
8.00	5.00	4	1.00	A	
3.00	5.00	4	1.00	A	
11.00	4.50	4	1.00	A	
12.00	4.25	4	1.00	A	
1.00	4.25	4	1.00	A	
6.00	4.00	4	1.00	A	B
9.00	3.75	4	1.00	A	B
2.00	2.50	4	1.00	A	B
7.00	2.50	4	1.00	A	B
5.00	2.50	4	1.00	A	B
4.00	1.25	4	1.00		B
10.00	1.25	4	1.00		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 8. Prueba de Fisher para comparación entre medias de tratamientos evaluados en función del tiempo de viabilidad del explantes.

Finalmente, se aplicó un análisis de varianza a los tratamientos que presentaron una media de viabilidad superior a las 3 semanas (Figura 9), el valor de p obtenido fue de 0,8692 (86,92%), el cual es superior al nivel de confianza de la prueba (5%), lo que indica que no existe diferencia estadística entre estos tratamientos, por lo que cualquiera de estos tratamientos ofrecen un tiempo de viabilidad suficiente para que la inducción de callo de Barraganete ocurra. Sin embargo, se observó que los tratamientos 3 y 8 ofrecen una

viabilidad del explante de al menos 5 semanas, por lo que serían los protocolos más recomendables para la fase de desinfección.

Análisis de la varianza				
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Semanas de viabilidad	28	0.10	0.00	34.15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gL	CM	F	p-valor
Modelo	5.43	6	0.90		0.8692
Tratamientos	5.43	6	0.90	0.40	0.8692
Error	47.25	21	2.25		
Total	52.68	27			

Figura 9. Análisis de Varianza de los tratamientos de desinfección con la media de viabilidad superior a 3 semanas.

Se aplicó una prueba de Fisher para encontrar subgrupos entre tratamientos, en la Figura 10., se observa que todos los tratamientos de desinfección fueron agrupados dentro del grupo A, lo que confirma que cualquiera de estos protocolos es eficiente para la fase de desinfección de explantes de Barraganete.

Test: LSD Fisher Alfa = 0.05 DMS = 2.20576
Error: 2.2500 gl: 21

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
8.00	5.00	4	0.75	A
3.00	5.00	4	0.75	A
11.00	4.50	4	0.75	A
12.00	4.25	4	0.75	A
1.00	4.25	4	0.75	A
6.00	4.00	4	0.75	A
9.00	3.75	4	0.75	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 10. Test de Fisher en función de los tratamientos de desinfección con tiempo de viabilidad superior a las 3 semanas.

5.2. Producción de biomasa

Durante la fase de inducción de callo en Barraganete, se evaluó la variable de generación de biomasa mediante el análisis del peso generado. Por tal motivo, los explantes fueron sembrados en nueve medios de cultivo distintos, enriquecidos con 3 concentraciones de sacarosa (20; 30; 40 g/L), ácido naftalenacético (ANA) (2.30; 13.95; 46.50 mg/L) y N6-benciladenina (BA) (2.5; 6; 10 mg/L).

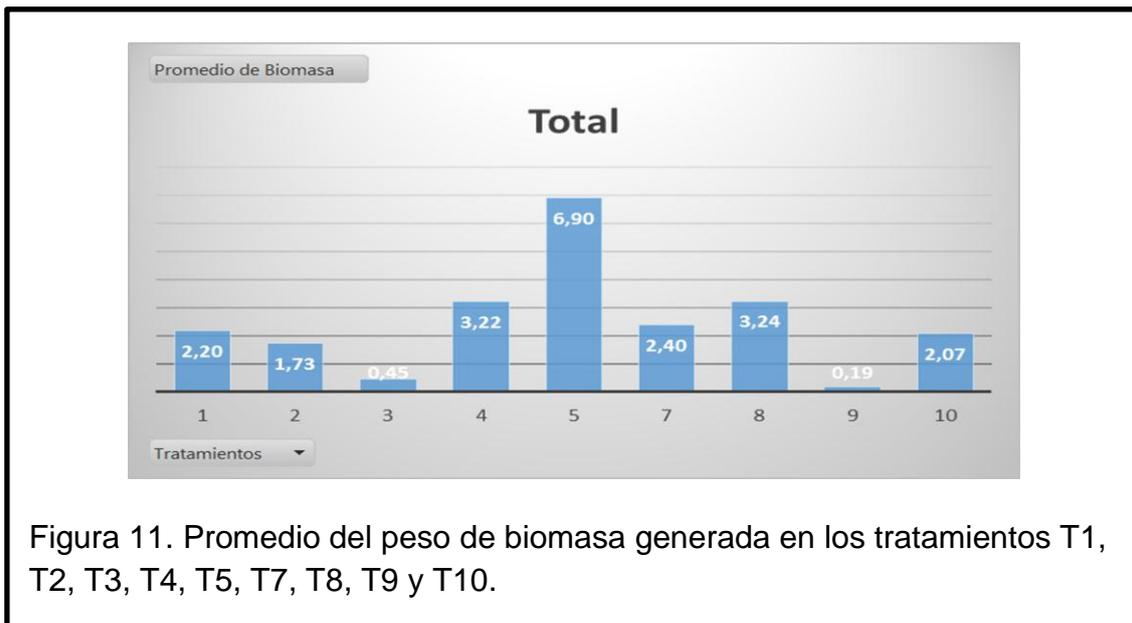
5.2.1. Peso de la biomasa

Para el análisis exploratorio de datos, se realizó una tabla de contingencia donde se detallan los tratamientos en los cuales el 75% de las repeticiones que permanecieron sin anomalías durante toda la experimentación, mostraron un resultado positivo en cuanto al incremento en peso de la biomasa, como se muestra a continuación.

Tabla 6. Tabla de contingencia para generación de biomasa en función del promedio del peso de los tratamientos

Tratamiento	Sacarosa (g/L)	BA (mg/L)	ANA (mg/L)	Promedio Peso Biomasa
T1	20	2.50	2.30	2.20
T2	20	6.00	13.95	1.73
T3	20	10.00	46.50	0.45
T4	30	2.50	2.30	3.22
T5	30	6.00	13.95	6.90
T6	30	10.00	46.50	-
T7	40	2.50	2.30	2.40
T8	40	6.00	13.95	3.24
T9	40	10.00	46.50	0.19

Se observó que el tratamiento 5, el cual posee una concentración media en cuanto a complejo hormonal (6 mg/L de BA y 13.95 mg/L), presentó mayor proliferación callosa. Por otro lado, en los tratamientos donde la concentración de los reguladores hormonales fue la más alta (10 mg/L de BA y 46.50 mg/L), se observaron los pesos de biomasa más bajos.



En la Figura 11., se puede apreciar que al finalizar las 5 semanas a partir de la introducción, se descartó el tratamiento 6 cuyas 4 repeticiones tuvieron inconvenientes y se identificó aquellos que presentaron una respuesta significativa en cuanto a la desdiferenciación celular del material vegetal sembrado mediante el análisis del peso alcanzado. De forma que el tratamiento 5 presentó 6.90 g de biomasa, mientras que el tratamiento 9 solamente 0.19 g de la misma.

Antes de realizar el análisis de la varianza (ANOVA) con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre los distintos medios de cultivo evaluados para la producción eficiente de biomasa, se realizó la prueba gráfica de histograma, la prueba gráfica de normalidad p-plot y la prueba de Skewness/Kurtosis. De tal manera, se pudo identificar que la variable puede ser analizada, ya que cumple con el supuesto de normalidad, como se muestra en las Figuras 12, 13 y 14.

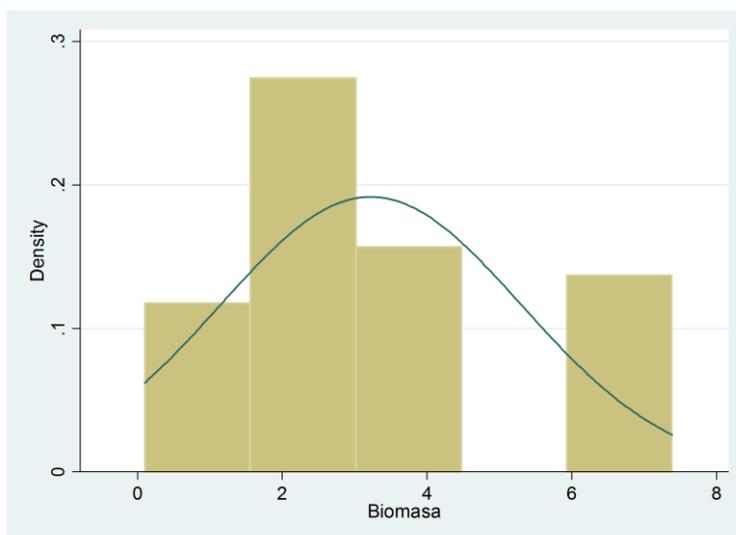


Figura 12. Prueba gráfica de histograma para la normalidad de la variable biomasa.

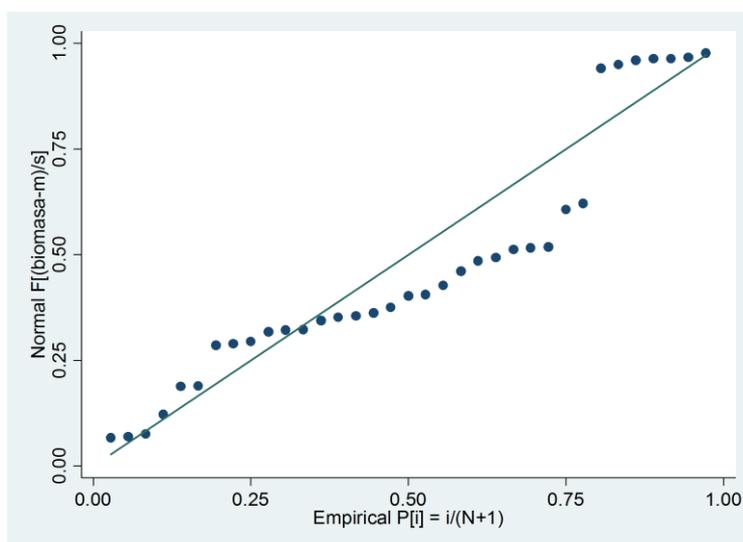


Figura 13. Prueba gráfica de normalidad de p-plot para la variable biomasa.

Skewness/Kurtosis tests for Normality						
Variable	Obs	Pr(Skewness)	Pr(Kurtosis)	adj	joint chi2(2)	Prob>chi2
biomasa	35	0.048	0.963		4.11	0.1279

Figura 14. Prueba de normalidad de Skewness/Kurtosis en función de la variable biomasa.

En la prueba de normalidad de Skewness/Kurtosis de la variable biomasa, se puede observar que existe un valor de la probabilidad (Prob>chi2) de 0.1279 el cual es superior al 0.05 del error, por tal razón se acepta la normalidad de la variable en mención.

Number of obs = 38 R-squared = 0.9744						
Root MSE = .364826 Adj R-squared = 0.9674						
Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F	
Model	147.123505	8	18.3904381	138.17	0.0000	
sacarosa	48.3149438	2	24.1574719	181.50	0.0000	
ba_na	40.9494539	3	13.649818	102.55	0.0000	
sacarosa*ba_na	22.2290807	3	7.40969356	55.67	0.0000	
Residual	3.85984207	29	.133098003			
Total	150.983347	37	4.080631			

Figura 15. Análisis de la varianza de la variable biomasa.

En la Figura 15., se pudo observar que existe un coeficiente de determinación (R^2) de 97.44%, donde el modelo presenta una significación estadística al 5%, lo que indica que existen diferencias significativas dentro de los medios de cultivo analizados. Además, se exhibe un promedio general de 3.1347 g de biomasa por tratamiento y un coeficiente de variación del 12%, lo que demuestra que existe mayor homogeneidad en los valores de la variable, en este caso, biomasa (Vargas, 1995, p.99).

		Summary of biomasa				
Sacarosa		Mean	Std. Dev.	Freq.		
1		1.757	.83213313	10		
2		4.4605555	2.07716	18		
3		2.126	1.0855536	10		
Total		3.1347368	2.0200572	38		

Analysis of Variance						
Source	SS	df	MS	F	Prob > F	
Between groups	60.7974017	2	30.3987009	11.80	0.0001	
Within groups	90.1859454	35	2.5767413			
Total	150.983347	37	4.080631			

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 9.6964$ Prob> $\chi^2 = 0.008$

Comparison of biomasa by Sacarosa (Scheffe)				
Row Mean-	Col Mean	1	2	
2		2.70356		0.001
3		.369	-2.33456	0.003

Figura 16. Prueba de significación de Scheffé al 5% para la interacción de las variables biomasa*sacarosa en la evaluación del peso.

En el análisis funcional se realizó una prueba de significación de Scheffé al 5%, tal como se indica en la Figura 16., donde se pudo observar que existen dos rangos de significación. Expresando el mayor contenido de biomasa, se encuentra el nivel 2 (30 g/L de sacarosa) con un promedio de 4.46 g. Mientras que el menor contenido de biomasa fue para el nivel 1 (20 g/L de sacarosa) con un promedio de 1.76 g, lo cual indica que existió un rango de 2.7 g entre estos tratamientos analizados. Por lo tanto, al evaluar el factor sacarosa en relación al mayor peso de biomasa obtenido, se puede constatar que los mejores tratamientos son aquellos que tienen 30 g/L de sacarosa en el medio.

Summary of biomasa			
ba_na	Mean	Std. Dev.	Freq.
0	2.0699999	.06244992	3
1	2.6685	.6071094	20
2	5.2963636	2.2981831	11
3	.32	.32537159	4
Total	3.1347368	2.0200572	38

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	90.8384379	3	30.2794793	17.12	0.0000
Within groups	60.1449093	34	1.76896792		
Total	150.983347	37	4.080631		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(3) = 35.7459$ Prob> $\chi^2 = 0.000$

Comparison of biomasa by ba_na (Scheffe)			
Row Mean- Col Mean	0	1	2
1	.5985 0.912		
2	3.22636 0.008	2.62786 0.000	
3	-1.75 0.409	-2.3485 0.027	-4.97636 0.000

Figura 17. Prueba de significación de Scheffé al 5% para la interacción de las variables biomasa*complejo hormonal en la evaluación del peso.

Por otra parte, en este análisis funcional se volvió a realizar la prueba de significación de Scheffé al 5%, tal como se indica en la Figura 17., se pudo observar que existen 3 rangos de significación. Expresando el mayor contenido de biomasa, se encuentra el nivel 2 (6 mg/L de BA; 13.95 mg/L de ANA) con un promedio de 5.30 g. Mientras que el menor contenido de biomasa fue para el tratamiento 3 (10 mg/L de BA; 46.50 mg/L de ANA) con un promedio de 0.32 g, lo cual indica que existió un rango de 4.98 g entre estos tratamientos analizados. Por lo tanto, al evaluar el factor complejo hormonal en relación al mayor peso de biomasa obtenido, se puede constatar que los mejores tratamientos son aquellos que tienen 6 mg/L de BA y 13.95 mg/L de ANA en el medio.

Summary of biomasa					
trata	Mean	Std. Dev.	Freq.		
1	2.2033333	.47647317	6		
2	1.725	.48790364	2		
3	.45000001	.49497475	2		
4	3.21875	.47021078	8		
5	6.9042857	.29125345	7		
7	2.4	.18286609	6		
8	3.24	.07071061	2		
9	.19	.07071067	2		
10	2.0699999	.06244992	3		
Total	3.1347368	2.0200572	38		

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	147.123505	8	18.3904381	138.17	0.0000
Within groups	3.85984207	29	.133098003		
Total	150.983347	37	4.080631		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(8) = 13.0129$ Prob> $\chi^2 = 0.111$

Comparison of biomasa by tratamientos (Scheffe)

Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	7
2	-.478333 0.951					
3	-1.75333 0.002	-1.275 0.191				
4	1.01542 0.008	1.49375 0.008	2.76875 0.000			
5	4.70095 0.000	5.17929 0.000	6.45429 0.000	3.68554 0.000		
7	.196667 0.999	.675 0.736	1.95 0.000	-.81875 0.062	-4.50429 0.000	
8	1.03667 0.196	1.515 0.062	2.79 0.000	.02125 1.000	-3.66429 0.000	.84 0.461
9	-2.01333 0.000	-1.535 0.056	-.26 1.000	-3.02875 0.000	-6.71429 0.000	-2.21 0.000
10	-.133333 1.000	.345 0.997	1.62 0.015	-1.14875 0.023	-4.83429 0.000	-.33 0.988
Row Mean- Col Mean	8	9				
9	-3.05 0.000					
10	-1.17 0.186	1.88 0.003				

Figura 18. Prueba de significación de Scheffé al 5% para la interacción de las variables biomasa*tratamientos en la evaluación del peso.

Por consiguiente, en este análisis funcional se realizó una prueba de significación de Scheffé al 5%, tal como se indica en la Figura 18., donde se pudo observar que existen 3 rangos de significación. Expresando el mayor contenido de biomasa, se encuentra el tratamiento 5 (6 mg/L de BA; 13.95 mg/L de ANA y 30 g/L de sacarosa) con un promedio de 6.90 g. Mientras que el menor contenido de biomasa fue para el tratamiento 9 (10 mg/L de BA; 46.50 mg/L de ANA y 40 g/L de sacarosa) con un promedio de 0.19 g, lo cual indica que existió un rango de 6.71 g entre estos tratamientos analizados.

Este resultado se asemeja con la conclusión expresada por Florio de Real y Mogollón (2011, p. 33-34), quienes establecen que la concentración de 5 mg/L de 6-benzilamino-purina fue suficiente para estimular el crecimiento de los meristemas e inducir el desarrollo de las yemas apicales. Igualmente, se puede sustentar con los resultados obtenidos por la empresa Rahan Meristem. Sin embargo, debido a que son protocolos con derecho de confidencialidad, se restringe el uso de esa información.

De manera que se acepta la hipótesis del estudio confirmando que mediante la utilización de yemas apicales de Barraganete es posible establecer un protocolo de cultivo *in vitro* para el incremento de biomasa de los callos.

6. DISCUSIÓN

El Barraganete ha tenido, desde siempre, una determinante importancia dentro del campo de las agroexportaciones. Lastimosamente, las densidades bajas de siembra en el país, debido a los problemas de índole agronómica que se pueden llegar a generar, suelen comprometer la producción necesaria para cumplir con la demanda exigida a nivel internacional (Dirección de Inteligencia Comercial e Investigaciones, s.f.-a).

Por este efecto y por el afán de dejar un sustento que sirva a futuras investigaciones, ya sea que estén enfocadas en la clonación de plantas con características agronómicas muy deseables durante todo el año o en la obtención de metabolitos secundarios, es que aumenta considerablemente la trascendencia de este proyecto de investigación.

6.1. Desinfección de explantes

Para estandarizar un protocolo de cultivo *in vitro*, se deben establecer algunos puntos críticos de control, los cuales en su mayoría, están vinculados directamente con los procesos de asepsia que se deben llevar a cabo en todos los pasos de la micropropagación.

Por tal motivo, las plantas madre constituyen la primera fase de control, debido a que toda su vida pasan expuestas a agentes contaminantes como son los hongos y las bacterias. Las plantas de campo están más expuestas a contaminación que aquellas desarrolladas en invernaderos. Dado que las plantas madre con las que se trabajó en este estudio provenían de un cultivo de meristemas, su estabilidad genética y calidad fitosanitaria estaba asegurada.

Se realizó un análisis previo del estado fisiológico de las mismas mediante el contraste con los descriptores ya establecidos para el cultivar en cuestión, puesto que no se debe olvidar que, gracias a la totipotencia en las células de la planta madre, el producto final será un nuevo organismo con características similares. Además que, según Sandoval et al., (2013, sección introducción, párr.3) un mal estado nutrimental junto con estrés hídrico en la planta donante,

pueden influir negativamente en la respuesta morfogénica de los explantes. Es por esto que, en este estudio se encontró indispensable el hecho de cerciorarse que las plantas madre mantengan condiciones aptas de crecimiento.

Una vez que se seleccionaron las plantas donantes a partir de los descriptores del Barraganete, la importancia recayó sobre la elección del explante. Para esta investigación se optó por trabajar con yemas apicales, obteniendo resultados altamente favorables en cuanto al protocolo de desinfección, ya que al menos una repetición de cada tratamiento sobrevivió hasta las 4 semanas a partir de la siembra. Por lo tanto, se confirma lo expuesto por García et al., (2004, p. 76) quienes afirman que una de las razones de mayor significancia para utilizar yemas apicales como propágulo inicial es debido a su baja probabilidad para encontrar en ellos la presencia de patógenos.

De igual manera sucedió al evaluar los resultados del protocolo para proliferación callosa de Barraganete. A pesar de que Mroginski y Roca (1991, p. 22) señalan que para callogénesis, es viable utilizar una amplia gama de propágulos iniciales; se decidió trabajar con yemas apicales con el fin de asegurar la presencia de células meristemáticas. Como consecuencia, todos los tratamientos mostraron una respuesta positiva, la cual se pudo evidenciar al constatar la ganancia en peso de los explantes. Por consiguiente, se sostiene la información emitida sobre la elevada frecuencia de división que caracteriza a las células meristemáticas (Peña, 2011, p. 50).

El protocolo empleado para la desinfección de los explantes se realizó en base a 12 tratamientos. Todos estos se generaron a partir de 3 concentraciones de hipoclorito de sodio (2%, 10% y 20%); 2 rangos de tiempo (45 min y 90 min) y 2 niveles en cuanto al número de lavados (2 y 3). Según los resultados que expulsó el programa estadístico InfoStat, se estableció que los mejores tratamientos para mantener los explantes sin contaminación hasta dentro de 5 semanas a partir de la siembra, fueron aquellos en los que predominó un tiempo de inmersión de 45 min, con una concentración de hipoclorito del sodio al 20% y 2 lavados; o en su defecto, un tiempo de inmersión de 45 min, con

una concentración de hipoclorito del sodio al 10% y 3 lavados, obteniendo el 100% de los explantes libres de patógenos.

Dichos resultados se asemejan a los obtenidos por Uzcátegui et al., (2010, p. 8) quienes empezaron colocando los cormos en una solución inicial de agua y jabón azul, continuaron realizando enjuagues con agua destilada y concluyeron su proceso de desinfección introduciendo el material vegetal en una solución de hipoclorito de sodio al 20% durante 20 min, logrando así obtener apenas el 25% de contaminación en Musa AAB cv. Hartón.

Ciertos autores como Canchignia et al. (2008, p. 44-45) han alcanzado excelentes resultados en maqueño, gracias al empleo de una concentración de 20% de hipoclorito de sodio por 20 min junto con una concentración de bicloruro de mercurio al 0.1% por 10 min para el establecimiento aséptico de yemas, generando un total de 100% de explantes sanos. Por lo cual, se confirma la eficacia de la concentración de hipoclorito de sodio empleada en el presente estudio para que el nivel de colonización fúngico o bacteriano, sea nulo.

6.2. Producción de biomasa

Luego de haber culminado con la primera fase de establecimiento del cultivo *in vitro* de Barraganete, correspondiente a la desinfección y prendimiento del propágulo inicial, se procedió con la fase de inducción de callo.

La proliferación callosa en este estudio se atribuye al complejo hormonal utilizado, el cual fue a base de ácido naftalenacético (ANA) y n6-benciladenina (BA). Esto lo testifica Narayanaswamy (1994, p. 55), quien asevera que en la mayoría de casos, un medio estándar enriquecido con ANA (10^{-7} a 10^{-5} M) en combinación con BA, es ideal para la iniciación y crecimiento de los callos.

Por consiguiente, en la investigación se demuestra que el mejor tratamiento para la desdiferenciación celular del Barraganete es el 5, constituido por 6 mg/L de BA; 13.95 mg/L de ANA y 30 g/L de sacarosa, generando 6.90 g de biomasa, lo que se ajusta con la teoría, la cual establece que las

monocotiledóneas y gramíneas requieren una alta concentración de auxinas en el medio para dar paso a la proliferación celular (Narayanaswamy, 1994, p. 55).

Otro factor determinante para la desdiferenciación celular es el tamaño de los explantes. Después de realizar 3 pruebas piloto con propágulos iniciales de diferentes dimensiones, se decidió emplear aquellos con una longitud no menor a 5 mm y a su vez, provenientes de tejido juvenil, es decir de estadio juvenil poco diferenciado; obteniendo respuestas positivas en las interacciones de los factores (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994, p. 22). Esto concuerda con lo que menciona Mroginski y Roca (1991, p. 26) al aserir que, mientras más grande sea el propágulo inicial, más probable será el proceso de formación de callo y por su parte, mientras más joven sea el tejido, existirán más probabilidades de obtener un mejor desarrollo. El efecto del tamaño ejerce una influencia directa también en el tema de la contaminación, tal como lo presumen Canchignia et al. (2008, p. 46) al indicar que lograron obtener un gran número de explantes sanos debido al tamaño de las yemas.

En el estudio se realizó una inspección visual de cada repetición con un intervalo de 7 días y consecuentemente, se fueron descartando aquellas que presentaban anomalías en su crecimiento ya sean de origen patológico o por efecto de la oxidación. Las revisiones fueron indispensables en el transcurso del proyecto debido a que como manifiesta Narayanaswamy (1994, p. 56), la fase de inducción se caracteriza especialmente, por los cambios en el tamaño de las células, la estructura de las células y el estado metabólico.

Por otra parte, se conoce que con el progresivo crecimiento del callo, pueden ocurrir ciertas diferencias histológicas y citológicas, o a su vez, ir acumulando metabolitos secundarios de gran valor (Narayanaswamy, 1994, p. 60). Por lo que se corrobora la posibilidad de un estudio posterior orientado a la producción de catalasa para su aplicación como antioxidante alimentario.

En cuanto a la sacarosa, la mayoría de autores coinciden que es la fuente de carbono más importante, y por consiguiente, declaran que el porcentaje más empleado es de 30 g/L, como es el caso de Vuylsteke (1989, p. 7) y Aragón et al. (2014, p.30). Literatura que concuerda con el presente estudio, donde el

mejor tratamiento contenía 30 g/L de sacarosa en el medio y el peor, apenas 20 g/L. Sin embargo, estos resultados discrepan con aquellos obtenidos por Canchignia et al. (2008, p. 47) quienes demostraron que para el caso del maqueño, no se requiere de suministros extras de sacarosa para un óptimo desarrollo, a pesar de pertenecer al mismo género y ploidía que el Barraganete.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

- Se estandarizó el protocolo de cultivo *in vitro* para el incremento de biomasa de los callos de plátano (*Musa* spp. AAB) variedad Barraganete.
- Se seleccionaron las plantas madre en función de los descriptores establecidos para el Barraganete. Puesto que se trataron de plantas provenientes de cultivo de meristemas, la similitud con los descriptores fue absoluta. Por consiguiente, todas cumplieron con los requerimientos fisiológicos y nutrimentales óptimos para garantizar la calidad del explante.
- Los mejores tratamientos para la fase de establecimiento aséptico fueron aquellos en los que predominó un tiempo de inmersión de 45 min, con una concentración de hipoclorito de sodio al 20% y 2 lavados; o en su defecto, un tiempo de inmersión de 45 min, con una concentración de hipoclorito del sodio al 10% y 3 lavados. Cabe recalcar que, con estos protocolos se logró mantener los explantes 100% libres de patógenos hasta después de 5 semanas a partir de la fecha de siembra.
- En los medios suplementados con 6 mg/L de BA; 13.95 mg/L de ANA y 30 g/L de sacarosa, se logró observar la división activa de una masa desorganizada a partir de las 3 semanas de la siembra. Lo que quiere decir que, el balance hormonal al que fueron sometidos los propágulos iniciales fue esencial para la proliferación callosa y el incremento en peso de la biomasa.
- La importancia del cultivo *in vitro* está relacionada de manera directa con la especie en estudio de este proyecto, puesto que uno de sus potenciales es dar soluciones a los inconvenientes que conlleva la propagación de cultivos estériles debido a su condición de triploides, como es el caso del Barraganete.

7.2. Recomendaciones

En el caso de no poder contar con una plantación cuyas labores culturales estén destinadas a cumplir con los más altos estándares para la producción, se debería optar por trabajar con plantas provenientes de un invernadero, para evitar que el nivel de colonización fúngico o bacteriano de los cormos sea elevado.

Como es de gran conocimiento, una dificultad para el caso de las Musáceas es la oxidación de polifenoles, la cual difiere significativamente dependiendo de la variedad a tratar. Por lo que se recomienda la adición de antioxidantes como el carbón activado, en el caso de que los subcultivos y la eliminación de tejido necrosado ya no surta gran efecto.

En el caso de destinar la investigación a la regeneración de plantas, se debería asegurar definitivamente de que no existe variación somaclonal mediante el uso de una prueba molecular.

Efectivamente, para el crecimiento y mantenimiento de células desdiferenciadas, el medio sólido se ha convertido en un material muy eficaz debido a las ventajas que aporta. Sin embargo, para el análisis de nutrición y metabolismo, para lo cual está dirigido este estudio, se debería emplear el medio líquido.

REFERENCIAS

- Abdelnour-Esquivel, A. y Escalant, J. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Recuperado el 15 de mayo de 2015 de <https://books.google.com.ec/books?id=T9QOAQAIAAJ>
- Aguilar, M., Ortiz, J, y Sandoval, J. (2008). Embriogénesis somática en plátanos y bananos: perspectivas y limitaciones. *Boletín técnico/CATIE*, 1(27), 33.
- Aragón, C., Sánchez, J., Gonzalez, J., Escalona, M., Carvalho, I., Amancio, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, 58(1), 29-38.
- Armijos, F. (2004). El virus del estriado del banano (BSV) en plantaciones de plátano y banano en Ecuador. *Boletín técnico/INIAP*, 1(144), 1-3.
- Bajaj, P. (2013). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*. Nueva Delhi, India: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Baraona, M. y Sancho, E. (1991). *Fruticultura general*. (2ª. ed.). San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Basail, M., Medero, V., Ventura, J., Otero, E., Torres, M., López, J., Cabrera, M., Santos, A., Rayas, A., Baute, M., Beovidez, Y. (2012). Multiplicación del clon de banano 'FHIA-18' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), p. 8-19.
- Belalcazar. S. (1991). *El cultivo de plátano (Musa AAB) en el trópico. Manual de asistencia técnica N° 50*. Bogotá, Colombia: Feriva.
- Calva, G., Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuentes de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), p. 4-6.
- Canchignia, H., Sigcha, L., Toaquiza, J., Ramos, L., Saucedo, S., Carranza, M. y Cevallos, O. (2008). Alternativas para la propagación *in vitro* de

plátano variedad Maqueño (*Musa balbisiana* AAB). *Revista Ciencia y Tecnología*, 1(1), p. 44-45.

Chawla, H. (2002). *Introduction to Plant Biotechnology*. (2^a. ed.). Pantnagar, India: Science Publishers, Inc.

Cubero, J. Y Salmerón, J. (2002). Mejora genética vegetal. Recuperado el 15 de mayo de 2015 de <https://books.google.com.ec/books?id=R7BbEm3uQ2kC>

Dávila, M., Abarca, D., Araúz D., Obando, M., Martínez, R., Muños, C. (1983). *Guía técnica para el cultivo del plátano (Musa sp.)*. Managua, Nicaragua: Simón Bolívar.

Dirección de Inteligencia Comercial e Investigaciones, (s.f.-a). Boletín de análisis sectorial del plátano de 2015. Recuperado el 28 de enero de 2014 de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/06/PROEC_AS2015_PLATANO.pdf

Dirección de Inteligencia Comercial e Investigaciones, (s.f.-b). Boletín de análisis de mercados internacionales de 2014. Recuperado el 28 de octubre de 2014 de <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/11/BAM-Octubre-Noviembre-2014-final.pdf>

Dirección de Inteligencia Comercial e Investigaciones, (s.f.-c). Boletín de análisis de mercados internacionales de 2013. Recuperado el 28 de octubre de 2014 de <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/11/BAM-Octubre-Noviembre-2013-final.pdf>

Dorris, M. (2010). What is plant tissue culture?. *Journal of the Bromeliad Society*, 60(4), 172-178.

Escobar, M., Fernández, E., Bernardi, F. (2012). *Análisis de datos con Stata*. (2^a. ed.). Montalbán, España: Efca, S.A.

Fernández, A. (2004). *Investigación y técnicas de mercado*. (2^a. ed.). Madrid, España; ESIC Editorial.

- Florio de Real, S., Mogollón, N. (2011). Estudios morfoanatómicos del origen y formación de brotes y raíces *in vitro* del plátano 'Hartón Gigante' (*Musa AAB*). *Revista Investigaciones Científicas (NE) UNERMB*, 2(2), p. 33-34.
- Gautheret, Roger J. (1983). Historia del cultivo *in vitro*. Recuperado el 28 de mayo de 2015 de <http://link.springer.com/article/10.1007%2F02488184#page-1>
- García, M., Quintero, R., López-Munguía, A. (2004). *Biotecnología alimentaria*. (5^a. ed.). México D.F., México: Limusa S.A.
- INIAP. (s.f.). Banano, plátano y otras musáceas: Programa Nacional de Banano y Plátano. Recuperado el 28 de octubre de 2014 de http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com_content&view=article&id=29:banano&catid=6:programas#indice
- Martínez, A., (1998). Aspectos generales y principales labores del cultivo del plátano. Recuperado el 28 de marzo de 2015 de https://books.google.com.ec/books?id=Bm7VMx1TrU8C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Martínez, E., Agustí, L. (2006). Prácticas de crecimiento y desarrollo de los vegetales. Recuperado el 13 de febrero de 2015 de https://books.google.com.ec/books?id=KBVx-yg9yqEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Martínez, G., Tremont O., Hernández J. (2004). Manual técnico para la propagación de Musáceas. *Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela*, 4(2), p. 2-3.
- Montano, N., Reynaldo, D., López, J., Torres, M., Otero, E., Gutiérrez, V., & Martínez, M. (2004). Nueva metodología para la implantación *in vitro* del plátano y el banano en biofábricas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2(2), p. 2-8.

- Montiel, L. (1995). Organización, función y ecología en los seres vivos. Recuperado el 28 de marzo de 2015 de <https://books.google.com.ec/books?id=ZPmnu1g172YC&pg=PA30&dq=reguladores+de+crecimiento+vegetal&hl=es&sa=X&sqi=2&ved=0CDMQ6AEwBWoVChMij4Dt09PRyAIVARoeCh3alAeH#v=onepage&q=reguladores%20de%20crecimiento%20vegetal&f=true>
- Mroginski, L.A. y Roca, W.M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. Recuperado el 28 de marzo de 2015 de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo2.pdf>
- Narayanaswamy, S. (1994). Calidad de explante para cultivo de tejidos. Recuperado el 28 de marzo de 2015 de <https://books.google.com.ec/books?id=-M4IR-pxqJMC>
- Peña, A. (2011). *Manual de histología vegetal*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Robinson, J., Saúco, V. (2010). Generalidades del plátano. Recuperado el 12 de mayo de 2015 de <https://books.google.com.ec/books?id=0GxOPqj2UVYC>
- Roca, W. y Mroginski, L. (1991). Fundamentos y aplicaciones del cultivo de tejidos. Recuperado el 18 de abril de 2015 de <https://books.google.com.ec/books?id=EXijYNw55DUC&printsec=frontcover&dq=Roca+y+Mroginski,&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiVu5OvzL3JAhUF7R4KHZpSBMYQ6AEIGzAA#v=onepage&q=Roca%20y%20Mroginski%2C&f=false>
- Rodríguez, M., Morales, J. y Chavarría, J. (1985). Producción de plátanos (Musa AAB, ABB). Recuperado el 28 de marzo de 2015 de https://books.google.com.ec/books?id=_NkOAQAAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

- Romo-Leroux, P., Cobos, A. (2012). Historia del cultivo *in vitro* en Ecuador. Recuperado el 12 de abril de 2015 de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/2152>
- Pospíšilová, J., Bhojwani, S., Razdan, M. (1997). Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Nueva Delhi, India: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sandoval, G., Iracheta, L., Cruz, C., Adriano, M., López, P., Sandoval, A. (2013). Effect of biofertilizers on tolerance of banana to disinfection and induction of organogenesis. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 19(2), 183-196.
- Toapanta, J., Mite, F., Sotomayor, I. Efecto de la fertilización y altas densidades de plantas sobre el rendimiento del cultivo de plátano. Recuperado el 28 de enero de 2015 de [http://www.secsuelo.org/VIIICongreso/Plenaria/Fertilidad%20de%20Suelos/5-%20Efecto%20de%20la%20fertilizacion%20de%20%20platanos%20\(Toapanta%20J\).pdf](http://www.secsuelo.org/VIIICongreso/Plenaria/Fertilidad%20de%20Suelos/5-%20Efecto%20de%20la%20fertilizacion%20de%20%20platanos%20(Toapanta%20J).pdf)
- Toledo, J., Espinoza, N., Golmirzaie, A. (1998). Manejo de plántulas *in vitro*. Recuperado el 16 de abril de 2015 de <https://books.google.com.ec/books?id=8w2iY5avRu0C&pg=PA9&dq=sales+minerales+cultivo+de+tejidos&hl=es&sa=X&ved=0CCMQ6AEwAmoVChMlkKqkldDFyAIVgh4eCh3eUQxx#v=snippet&q=vitaminas&f=false>
- Uzcátegui, J., Hernández, Y., Osorio, D., Rivas, M. (2010). Evaluación del comportamiento *in vitro* de ápices de plátanos Musa AAB cv. "Hartón" y "Hartón Doble Tallo". *Producción Agropecuaria/Biotecnología*, 3(1), p. 7-12.
- Vargas, A. (1995). Estadística descriptiva e inferencial. Recuperado el 17 de febrero de 2015 de <https://books.google.com.ec/books?id=RbaC-wPWqjsC&pg=PA99&dq=estadistica+descriptiva+coeficiente+de+variacion&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiY9O->

C55HNAhUBXh4KHZmgAu8Q6AEIGjAA#v=onepage&q=estadística%20descriptiva%20coeficiente%20de%20variación&f=false

Villalobos, V., y Thorpe, T. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Recuperado el 08 de enero de 2015 de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo6.pdf>

Vuylsteke, D. (1998). *Shoot-tip culture for the propagation, conservation and distribution of Musa germplasm*. Ibadán, Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture

ANEXOS

Anexo 1. Listado de abreviaturas

m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
NaClO	Hipoclorito de Sodio
ANA	Ácido Naftalenacético
BA	N6-benciladenina
BAP	6-benzilamino-purina
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
MS	Medio de Murashige y Skoog

Anexo 2. Procesos de selección de plantas madre

Foto 1. Plantas de Barraganete en etapa de aclimatización



Foto 2. Plantas de Barraganete en vivero



Foto 3. Reconocimiento de descriptores de Barraganete



Foto 4. Hijos espada



Foto 5. Cormo de Barraganete



Anexo 3. Procesos de elaboración de medios

Foto 6. Cuarto de pesaje



Foto 7. Soluciones para la elaboración del medio MS



Foto 8. Test para evaluar el cloro



Foto 9. Medios almacenados durante 7 días



Foto 10. Tubos de ensayo para el último tiempo de inmersión en NaClO y posterior lavado en agua destilada



Anexo 4. Evaluación del proceso de contaminación

Foto 11. Punto de crecimiento



Foto 12. Explante necrosado



Foto 13. Explantes con contaminación fúngica y bacteriana



Foto 14. Cámara de estabilización



Foto 15. Prueba piloto para generación de biomasa



Foto 16. Prueba piloto transcurridas 6 semanas a partir de la siembra



Anexo 5. Evaluación del proceso de generación de biomasa de Barraganete

Foto 16. Tratamiento 5, repetición 2, transcurridas 5 semanas a partir de la siembra



Foto 17. Tratamiento 5, repetición 4, transcurridas 5 semanas a partir de la siembra

