UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
CENTRO DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN GESTIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FLORES Y FRUTAS ANDINAS PARA EXPORTACIÓN

TEMA: "DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMBRIOGÉNICA DE BABACO (Vasconcelleae x heilborni) A PARTIR DE ÓVULOS Y HOJAS MULTIPLICADS IN VITRO VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA"

Trabajo de Investigación
Previa a la obtención del Grado Académico de Magister en
Gestión de la Producción de Flores y Frutas Andinas para Exportación

Autora: **ING. NORMA ESPERANZA QUILLAY CURAY.**

Director: Ing. Mg. JORGE FABARA GUMPEL

Ambato – Ecuador

2011

Al Consejo de Posgrado de la UTA.

El tribunal receptor de la defensa del trabajo de investigación con el tema: DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMBRIOGÉNICA DE BABACO (Vasconcelleae x heilborni) A PARTIR DE ÓVULOS Y HOJAS MULTIPLICADS IN VITRO VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA, presentado por la Ing. Norma Esperanza Quillay Curay conformado por: Ing. Mg. Nelly Cherres Romo, Ing. Mg. Eduardo Cruz Tobar e Ing. Mg. Pedro Sánchez Cobo Miembros del Tribunal, Ing. Mg. Jorge Fabara Gumpel Director del trabajo de investigación y presidido por: M. Sc. Julio Benítez Robalino. Presidente del Tribunal; Ing. Mg Juan Garcés Chávez Director del CEPOS– UTA, una vez escuchada la defensa oral el Tribunal aprueba y remite el trabajo de investigación para uso y custodia en las bibliotecas de la UTA.

Ing. M. Sc. Julio Benítez Robalino.
PRESIDENTE

Ing. Mg. Juan Garcés Chávez.
DIRECTOR CEPOS.

Ing. Mg. Jorge Fabara Gumpel
Director del Trabajo de investigación

Ing. Mg. Nelly Cherres Romo
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Mg. Eduardo Cruz Tobar
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Mg. Pedro Sánchez Cobo
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el trabajo de investigación con el tema: DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMBRIOGÉNICA DE BABACO (Vasconcelleae x heilborni) A PARTIR DE ÓVULOS Y HOJAS MULTIPLICADS IN VITRO VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA, nos corresponde exclusivamente a la Ing. Norma Esperanza Quillay Curay e Ing. Mg. Jorge Fabara Gumpel. Director del trabajo de investigación; y el patrimonio intelectual del mismo a la Universidad Técnica de Ambato.

---	---
Ing. Norma Esperanza Quillay Curay	Ing. Mg.. Jorge Fabara Gumpel.
AUTORA	DIRECTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este trabajo de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi trabajo de investigación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de ésta, dentro de las regulaciones de la Universidad.

Ing. Norma Esperanza Quillay Curay.

DEDICATORIA.

Esta tesis la dedico a Juditas, amigo fiel que siempre me acompañará en mi corazón y a toda mi familia por brindarme su confianza cariño, apoyo y compresión.

A mi abuelita, el ser más maravilloso que siempre me brindó su cariño incondicional que siempre la llevaré en mi corazón. (+)

Norma Q.

AGRADECIMIENTO.

Agradezco a ese ser supremo "Dios Padre", por permitirme vivir y superar todo los momentos buenos y malos que trae consigo la vida.
- Juditas por brindarme fortaleza y paciencia cuando más lo necesité, estuviste allí.
- Mis Padres. Aunque no estén a mi lado, me han brindado su cariño y apoyo incondicional, permitiéndome superar los problemas de la vida.
- Mis tres hermanas. Por estar pendiente de mi, brindándome sus palabras de apoyo y cariño.
- Mis primos Patricia y Eugenio, por apoyarme y compartir conmigo lo que significa para mí graduarme, por hacerme reír y hacer que la vida parezca más sencilla.
- Abuelito.- por brindarme cariño y buena voluntad, gracias siempre tienes para mí una sonrisa que me anima.
- Toc. Mi mejor amigo, que siempre me apoyó y estuvo pendiente de que este proyecto de tesis, gracias por tus palabras que me fortalecían cuando más lo necesitaba, enseñándome que la vida es solo un estado de ánimo, y por esa razón siempre hay que sonreír a la vida.
- Behtty y Juan.- muchas gracias, fueron el pilar fundamental para realizar esta tesis, ya que me brindaron sus sabios conocimientos permitiéndome hacer realidad este proyecto y hacerme sentir en familia.
- Emily.- niña linda, que con tu inocencia me llenaba de ternura y me hacia participe de sus juegos, permitiendo volver a mis tiempos de infancia, donde todo es inocencia y alegría.
- Ing. Iván Garzón. Director del Laboratorio de Biotecnología de la EET Pichilingue, gracias por abrirme esa puerta tan grande e importante que fue: Permitirme realizar mi proyecto de tesis en tan prestigiosa Institución.
- Jhoseline y flia. Gracias por brindarme su amistad y hacerme sentir en familia.
- Silvia. Gracias por brindarme su amistad y confianza.
- U.T.A.. Director de Tesis y Miembros del Consejo, por enriquecer mis conocimientos con paciencia sabiduría.

Norma Q.

ÍNDICE

CAPITULO I

1 EL PROBLEMA…… 1

1.1 TEMA. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMBRIOGENICA DE BABACO (Vasconcelleae x heilbornii) A PARTIR DE ÓVULOS Y HOJAS IN VITRO VÍA EMBRIOGENESIS SOMATICA. …… .. 1

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA…..1

1.2.1 Contextualización……..1
1.2.2 Análisis Critico…… 2

1.2.3 Prognosis……..3

1.2.4 Formulación del Problema...…….4

1.2.5 Interrogantes...…….5

1.2.6 Delimitación del objeto de investigación..…….5

1.3 JUSTIFICACIÓN…...…….5

1.4 OBJETIVOS.……..……6

CAPITULO II

2 MARCO TEÓRICO…….8

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS…...8
2.2 FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA……...11

2.3 FUNDAMENTACIÓN LEGAL……..12

2.4 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES……..12

2.5 HIPÓTESIS……..35

2.6 SEÑALAMIENTO DE LAS VARIABLE…...…35

CAPITULO III.

3.METODOLOGIA……..38

3.1 MODALIDAD BÁSICA DELA INVESTIGACIÓN……..38

3.2 NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN…..38

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA……..39

3.4 MATERIALES DE LABORATORIO……..39

3.5 MATERIALES DE CAMPO.……41

3.6 TÉCNICA…..……41

3.7 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES……..44

3.8 PLAN DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN..……46

3.9 PLAN DE PROCESO DE LA INFORMACIÓN ……...46

CAPITULO IV.

4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS……48

4.1 Análisis de los resultados……..48

4.2 Interpretación de datos……..…….…48
CAPITULO V.
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES……..…….……61
CAPITULO VI.
6. PROPUESTA……..……..……..……..62
6.1 Datos informativos……..……..63
6.2 Antecedentes de la propuesta…….....…….…….…….63
6.3 Justificación…….……..63
6.4 Objetivos……..……...……...……..……..65
6.5 Análisis de factibilidad…….……..…...…….……66
6.6 Fundamentación…….……...……66
6.7 Metodología…….…….…….…….....75
6.8 Administración…….……..……76
6.9 Prevención de la evaluación……..……..……..……...…77
7. Materiales de Referencia……..80
ANEXOS……..……..……..……...81

ÍNDICE
DE CUADROS Y FIGURAS.

CUADRO 1. Influencia de los subcultivos sobre la regeneración de plantas a partir de los callos……..……..……...29
CUADRO 2. Descripción variable dependiente "capacidad embriogénica…….....36
CUADRO 3. Variable independiente "medios de cultivo……...…….….37
CUADRO 4. Diseño de distribución de los tratamientos y medios de cultivo….....45
CUADRO 5. Esquema de análisis de varianza…….……...…48
CUADRO 6. Porcentaje de contaminación bacteriana por medio de cultivo……49
CUADRO 7. Contaminación por bacterias por tratamiento……..….50
CUADRO 8. Contaminación bacteriana en relación medio de cultivo/ tratamiento...52
CUADRO 9. Contaminación por hongos en relación a los medios de cultivo y tratamiento…….…….53
CUADRO 10. Capacidad embriogénica en relación a los medios de cultivo/ tratamiento…….……..……...55
CUADRO 11. Contaminación por hongos y bacterias en hojas…….……...…57
CUADRO 12. Contaminación por hongos etapa II…….…….……58
CUADRO 13. Contaminación por bacterias , etapa II…….... ……..……59
CUADRO 14. Callogénesis etapa II……..……..……..…...….59

FIGURAS

FIGURA 1 Porcentaje de contaminación por bacterias en relación al medio de cultivo en la etapa de inducción de callos……..50
FIGURA 2. Porcentaje de contaminación bacteriana en relación a los tratamientos……..51
FIGURA 3. Contaminación por hongos en relación medios de cultivo / tratamiento……...…… 54
FIGURA 4. Capacidad embriogénica, relación medio de cultivo/ tratamiento……..56
FIGURA 5. Capacidad embriogénica. Etapa II……...……60

RESUMEN EJECUTIVO.

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la EET Pichilingue del INIAP en Quevedo con el único propósito de evaluar la capacidad embriogénica en hojas y óvulos de babaco (*Vasconcellea x heilborni*). Para la ejecución del mismo se utilizo la técnica propuesta por Vega R. y Kitto S.L. (2001).

Como material vegetal se adquirió frutos de babaco de diferentes edades (20 – 90 días), a los que se le sometió a los siguientes tratamientos: T1: Temperatura ambiente, siembra inmediata; T2. Temperatura de 4^{o} C por 4 y T3. Temperatura de 4^{o}C por 8 días, introducidos en cuatro medios de cultivo para la inducción de callos (MIC: A, B, C y T), los mismos que estaban compuestos de: MICA: ANA 500ul/l; 2,4D 0,5 mg/l; MICB: ANA 500ul/l; 2,4D 1,5mg/l; MMCC: ANA 500ul/l; 2,4D 2,5 mg/l; MICT sin hormonas.

Durante la introducción de óvulos y hojas de babaco se registraron contaminación por bacterias y hongos.

En cuanto a capacidad embriogénica el tratamiento que mejores resultados presentó fue el (T3) frutos tratados a temperatura de 4^{o}C por 8 días, introducidos en el medio de introducción de callo B (MICB) presentando una media de 16.5. Seguidamente encontramos al tratamiento 1 (T1) frutos a temperatura ambiente, siembra inmediata con una media de 9 callos introducidos en el medio de inducción de callos C (MICC).

En la inducción a callos de segmento de hojas de babaco no se obtuvo ningún resultado favorable debido a que se presentó una contaminación de un 100% de hongos y bacterias. La contaminación se dio posiblemente porque las hojas que se adquirieron para la introducción in vitro no tuvo ningún tratamiento fitosanitario previo.

INTRODUCCIÓN

La presente investigación con el tema DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMBRIOGÉNICA DE BABACO (Vasconcelleae x heilborni) A PARTIR DE ÓVULOS Y HOJAS MULTIPLICADS IN VITRO VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA y se ejecuto en el laboratorio de Biotecnología de la EET Pichilingue del INIAP en Quevedo con el único propósito de evaluar la capacidad embriogénica en hojas y óvulos de babaco, para dicha investigación se recurrió a la técnica propuesta por Vega R. y Kitto S.L. (2001).

El material vegetal se adquirió de un invernadero ubicado en la comunidad de Bulan perteneciente al cantos Paute, provincia del Azuay, se obtuvieron frutos de babaco de diferentes edades (20 – 90 días), a los que se le sometió a los siguientes tratamientos: T1: Temperatura ambiente, siembra inmediata; T2. Temperatura de 4^{o} C por 4 y T3. Temperatura de 4^{o}C por 8 días, introducidos en cuatro medios de cultivo para la inducción de callos MIC A, B, C y T, (MIC: Medio de inducción de callos) los mismos que estaban compuestos de: **MICA**: ANA 500ul/l; 2,4D 0,5 mg/l; **MICB**: ANA 500ul/l; 2,4D 1,5mg/l; **MMCC**: ANA 500ul/l; 2,4D 2,5 mg/l; **MICT** sin hormonas.
Durante la introducción de óvulos y hojas de babaco se registraron contaminación por bacterias y hongos.

En cuanto a capacidad embriogénica el tratamiento que mejores resultados presentó fue el (T3) frutos tratados a temperatura de 4^{o}C por 8 días, introducidos en el medio de introducción de callo B (MICB) presentando una media de 16.5. Seguidamente encontramos al tratamiento 1 (T1) frutos a temperatura ambiente, siembra inmediata con una media de 9 callos introducidos en el medio de inducción de callos C (MICC).

En la inducción a callos de segmento de hojas de babaco no se obtuvo ningún resultado favorable debido a que se presentó una contaminación de un 100% de hongos y bacterias. La contaminación se dio posiblemente porque las hojas que se adquirieron para la introducción in vitro no tuvo ningún tratamiento fitosanitario previo.
Se recomienda, partir de plantas madres bien seleccionadas y minuciosamente tratadas (tratamientos fitosanitarios), de tal manera que constituyen mayor garantía para futuras investigaciones.

CAPITULO I

EL PROBLEMA.

1.1 Tema de investigación

“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMBRIOGÉNICA DE BABACO (Vasconcelleae x heilborni) A PARTIR DE ÓVULOS Y HOJAS MULTIPLICADS IN VITRO VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA”

1.2 Planteamiento del problema

1.2.1 **Contextualización**.

Diferentes especies de la Familia *Caricaceae* corresponden a cultivos importantes de la región Andina, teniendo usos como frutales, producción de compuestos enzimáticos con acción proteolítica, como fuentes de germoplasma y potencial genético de interés posible de usar en programas de mejoramiento. Entre ellas se destacan *Carica papaya* y otros grupos de cultivo clasificados dentro del género *Vasconcelleae*; entre ellos *V: cundinamarcensis* (sin. *C. pubescens*) (papayo de montaña) y *V. stipulata.* Según cada cultivo, se evidencia diferentes potenciales regenerativos, ya sea a nivel sexual y asexual, pero también grandes limitaciones que afectan su desarrollo y regeneración. Algunas de las varias limitaciones específicas a mencionar, según especies, corresponden a problemas de germinación por causa de dormancia influenciada por la testa, variabilidad en el grado de

viabilidad según proveniencia y lento desarrollo de post - emergencia (*V. stipulata).* En otras situaciones la propagación asexual es obligatoria, tratándose de híbridos interespecíficos estériles, como es el caso de *V. x heilbornii.* (Jordán, M., 2009)

El babaco, (*V. x heilbornii.),* se ha cultivado en el Ecuador desde hace muchísimos años y por su alta rentabilidad especialmente en pequeñas superficies, da sustento a muchas familias ecuatorianas a través de los años (Fabara, J. 1985)

Según datos del III Censo Agropecuario (2001), el 40% de la población ecuatoriana que reside en el área rural, las dos terceras partes conforman hogares de productores agropecuarios y viven en las propias Unidades de Producción Agropecuaria, de tal manera que, algo más del 25% de la población ecuatoriana se estima vinculada a la actividad agropecuaria, ciertamente, el 62% de la población rural ocupada, trabaja en agricultura.

En Azuay la superficie plantada de babaco es de 54 ha, alcanzado un total de 192 UPAs(Unidades de Producción Agrícola). (INEC – MAG – SICA, 2001) (**Anexo 2 tabla 1 y 2.)**

1.2.2 Análisis crítico.

El productor de babaco para alcanzar elevados índices y obtener una buena rentabilidad, enfrenta problemas relacionados con escasez de plantas de buena calidad para establecer los huertos, un complejo de enfermedades, ácaros y nematodos que afecta el desarrollo, y falta de conocimiento más profundo de las prácticas de manejo que el cultivo requiere.

El babaco se puede reproducir solamente por vía asexual o vegetativa, debido a que posee un fruto partenocárpico, es decir que no produce semilla, siendo su propagación por estacas, brotes tiernos e injertos. (Fabara J. 1985).

La partenocarpia es un fenómeno que ha sido citado en la *Carica papaya* L. y en miembros del género Vasconcellea, antes considerada caricas. Se ha observado casos relativamente frecuentes de partenocarpia en los híbridos naturales Vasconcellea x heilbornii Badillo nm*pentagona* (Heilborn) (n.v. "Babaco"), *V x heilbornii* Badillo nm. *Chrysopetala* (Heilborn)(nm "*chamburo*"), y *V x heilbornii* Badillo nm. *Fructifragans*, en las que parecen ser inducidas por hibridismo, ya que desarrollan frutos aun sin estímulo del polén (Heilborn, citado por Micheletti, 1980; Horovitz, citado por Badillo, 1971; Citado por Vegas A., et al 2003).

1.2.3 **Prognosis.**

El babaco, es una fruta subtropical estéril que difícilmente puede ser modificada a través del mejoramiento convencional (Vega R., Kitto S. L., 2001)

La embriogénesis de *Cariáceas* ha sido obtenida de diferentes fuentes de explantes, como en *C. papaya* a partir de suspensión de células de callos de embriones (Litz y Conover, 1983), *C. stipulata*, a partir de callos de pedúnculos, (Litz y Conover, 1980), y *C. pubescente* a partir de callo de hipocótilos germinados in vitro (Jordán, 1985). Sin embargo, babaco solamente ha sido micro propagado in vitro a partir de secciones nodales (Cohen y Cooper, 1981), de yemas, brotes apicales y laterales (Cossio, 1985). Por lo tanto, la obtención de plantas a través de embriones somáticos

en babaco u organogénesis resultaría en variaciones somaclonales y podría ser una alternativa para mejorar la calidad de frutos, ya sea en tamaño (unidades más pequeñas para exportación), frutos compactos o bien resistentes a plagas y / o enfermedades. (Vega R., et al 2001).

1.2.4 Formulación del problema.

Al realizar la propagación asexual de *Vasconcelleae x heilborni*, permite la perpetuación de organismos patógenos (Fusarium oxysporum), causando pérdidas entre 50 – 100%.(Universidad Central del Ecuador; Facultad de Ciencias Agrícola; Instituto de Biotecnología Agraria, 2007).

La dotación de plantas de calidad que evite pérdidas al agricultor nos ha llevado a buscar posibles alternativas de propagación de babaco, para lo cual acudidos al aporte de la Biotecnología.

La técnica de cultivo de tejidos vegetales se define como: El cultivo de células, tejidos y /o órganos extraídos de plantas, que se mantiene bajo condiciones artificiales y permiten producir plantas que poseen todas las características de la planta madre, o sea que, esta es una técnica de propagación vegetativa en condiciones artificiales.

Normalmente, el proceso del cultivo in vitro de tejidos consta de las siguientes etapas: Etapa I: Establecimiento o iniciación del cultivo aséptico. Etapa II: Propagación in Vitro plantas. Etapa III: Enraizamiento y etapa IV aclimatación. (Kanji U., et al 1996)

Según trabajos realizados por INIAP, (1997), indican que en babaco se ha realizado varios ensayos para la introducción (Etapa I) in vitro, pero los resultados no han sido favorables, se ha presentado contaminación por bacterias, hongos y también levaduras, lo que no ha permitido el desarrollo del explante para su correspondiente micropropagación. Concluye; la alta contaminación en la introducción in vitro de babaco se debe a la falta de material sano para obtener explantes y realizar la correspondiente introducción y establecimiento del cultivo en condiciones de laboratorio.

1.2.5 Interrogantes (subproblemas).

Según estudios realizados anteriormente y tomándolos como referencia para el presente trabajo de investigación planteamos las siguientes interrogantes.

- ¿Cuál será el porcentaje de contaminación en la etapa de establecimiento o iniciación del cultivo in vitro de óvulos y hojas de babaco?

- ¿Se podrá determinar la capacidad embriogénetica de babaco a partir de óvulos y hojas?

- ¿Se podrá inducir a la formación de callos en hojas y óvulos de babaco mediante diferentes medios de cultivo?.

- ¿Qué incidencia tendrá el medio de cultivo y el tipo de explante en la capacidad embriogénica de babaco?

1.2.6 Delimitación del objeto de investigación.

La introducción de hojas y óvulos de babaco se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la EET. Pichilingue INIAP.

1.2.6.1 Delimitación espacial.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, perteneciente al Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria (INIAP), localizada en las siguientes coordenadas: 79°21' Longitud occidental; 1°06' de Latitud sur a una altura de 120 m.s.n.m ubicada en el Km. 5 vía Quevedo – El Empalme, en la provincia de Los Ríos.

1.2.6.2 Delimitación temporal.

La investigación se llevo a cabo desde 2 de febrero del 2011 al 15 de septiembre del 2011

1.3 Justificación.

El escases de plantas de calidad, mediante otras técnicas ha llevado a buscar otras alternativas de propagación por la que se recurrió a la Biotecnología.

El uso de sus diferentes métodos de micro propagación de plantas como es el cultivo in vitro de yemas (organogénesis), y obtención de embriones somáticos, a partir de estructuras como óvulos, hojas y pedúnculos. (Embriogénesis somática), en ambos

casos conllevan a la obtención de plantas completas y libres de enfermedades. (Usui, K. et,., al 1996).

Por medio del presente trabajo se pretende determinar la capacidad embriogénica de los explantes (óvulos y hojas), mediante el uso de 4 medios de cultivo para la etapa de introducción, tres para la etapa de mantenimiento de callos y un último para el desarrollo de embrión en caso de darse la formación de callos.

1.4 Objetivos.

1.4.1 Objetivo general

Aportar al mejoramiento tecnológico de cultivo de babaco estableciendo una sólida base, que persigue la estimulación al desarrollo embriogénico somático en óvulos y hojas.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de contaminación (hongos y bacterias) en fase de introducción de los dos tipos de explantes: óvulos y hojas.

- Determinar que tratamiento presenta mejores resultados en la evaluación de la capacidad embriogénica.

- Determinar la capacidad ó reactividad embriogénica de las estructuras: óvulos y hojas de babaco en relación a los medios de cultivo.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos (investigaciones previas, estado del arte).

2.1.1. En la regeneración de Babaco (Vasconcelleae x heilborni), VEGA R. KITTO S. L.(2001) Manifiesta que la embriogénesis somática de caricáceas. Los óvulos y pedúnculos de diferentes edades (20 – 90 días; el número de óvulos por fruto osciló entre 195 – 225) fue el material inicial para producción de callos. Posteriormente se utilizaron hojas y peciolos de material in vitro. Los frutos fueron mantenidos en refrigeración a 4^{o}C por periodos de 2, 4, 6, 8, y 16 días.

Los frutos a 4^{o}C por 48 horas presentó iniciación de callos más temprano que los otros óvulos en un fotoperiodo de 16 a 18 horas bajo lámparas fluorescente, en un medio de cultivo de iniciación de callos que contenía MS, (piridoxina 0,5; Tiamina 0,4; inositol 100 y acido nicotínico 0,5 mg/l), sacarosa 30, 60 y 90 g/l; glutamina (GLU) 400mg/l. Los reguladores de crecimiento fueron; ácido indol acético (AIA) 0,5 a 4mg/l y agar 8g/l. El pH del medio fue acondicionado entre 5,7 a 5,8 antes de ser esterilizado.

2.1.2 Según Bengoa, C. (1990),manifiesta sobre la micropropagación de babaco (*Carica x heilborni*inmpentagona), para la introducción in vitro se trabajó con 360 micro estacas, 120 de cada tipo de explante (tercio apical, medio u basal), destinados a determinar el mejor explante a utilizar en el establecimiento in vitro del cultivo y mejor medio nutritivo.

En el primer ensayo se determinó que los mejores explantes a utilizar son los apicales, comprobándose grandes diferencias en la sobrevivencia al utilizar los otros tipos de explantes. A su vez, no existe efecto de los diferentes medios nutritivos (A, B y C) utilizados en esta etapa.

En el ensayo dos, el medio de brotación B, desarrollaron abundantes callos, la misma que contenía Citoquininas (1,0 mg/l), caseina hidrolizada (500 mg/l) y sulfato de adenina (80 mg/l). El gran desarrollo de callos va acompañado de deformaciones de los explantes y de una marcada vitrificación, fenómeno que resultaron irrecuperables a lo largo del cultivo.

2.1.3.- Vaca I, Landázuri A., Falconí E. y Soria N. (2010),respecto al; Incremento de número de brotes de babaco señalo que las tres fuentes vegetales de babaco, las fuentes vegetativas basales y media permitieron obtener el mayor número de brotes durante la fase de multiplicación. De las tres auxinas evaluadas, en la fase de multiplicación, el AIA favoreció la mayor formación de brotes por explante. Los tratamientos que presentaron el mayor número de brotes por explante fueron el T_2 (Fuente basal, AIA, 0,167ppm) y el T_{17} (Fuente basal, ANA, 1,5ppm), con promedios de 2 brotes por explante de babaco, para los dos tratamientos. La dosis óptima de auxinas que permitió obtener el mayor número de brotes por explante fue 0,167ppm de AIA.

2.1.4.-INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria 1997), con relación al; Crecimiento in vitro; especies vegetales; como babaco, *(Vasconcellea x heilbornii)* Indican que el objetivo fue determinar los medios de

cultivo y condiciones de crecimiento in vitro de especies de importancia. En este ciclo agrícola se han realizado trabajos con cultivo in vitro de mora y babaco.

Señalan que para la introducción in vitro de babaco y mora se utilizaron explantes provenientes del campo. Los explantes se someten a un proceso de lavado y desinfección en el laboratorio. Los medios de cultivo contienen sales de Murashige y Skoog, suplementado con auxinas y citoquininas, adicionando Sucrosa y agar para darle consistencia al medio de cultivo. Los tubos se colocan en un cuarto de cultivo, con temperatura de 18 +- 2^{O} C, con un fotoperiodo de 16 horas.

En cuanto a babaco, se han realizado algunos ensayos para la introducción in vitro, pero los resultados no han sido favorables, se ha presentado contaminación por bacterias, hongos y también levaduras, lo que no ha permitido el desarrollo del explante para su correspondiente micropropagación.

2.1.5. Criollo D. (2008), describe que: La microinjertación de babaco (*Vasconcelleaheilbornii cv pentagona*) y chihualcán (*Vasconcelleaheilbornii cv crhysophetala*) en patrones de papaya (*Carica papaya*) se realizó mediante las técnicas de Mosella - Ascui (1984) y de Navarro *et al.* (1975). Se usaron ápices de babaco y chihualcán, para la micro injertación en papaya, los cuales se colocaron previamente en una solución líquida que contenía sales MS, AIA (30 ppm) y sacarosa (25 g/l) por 2 minutos, 30 minutos, 24 horas y 48 horas.

En los micros injertos de babaco-papaya y chihualcán-papaya hubo falta de prendimiento posiblemente debido a una incompatibilidad entre los géneros *vasconcellas*y *Carica*.

2.1.6 Orellana R. (2001), en referencia a; **"**Dinámica de crecimiento y caracterización pomologíca del fruto de 12 accesiones de *vasconcelleaxheilbornii*; recolectadas en el Austro, colección *ex - situ* del INIAP, granja Bullcay, Gualaceo" indica,*acx 039 vasconcellea x heilbornii cv.* 'babaco' *(v. badillo) v. badillo*.es la única especie que se cultiva comercialmente. Es una planta dioica con flores femeninas únicamente. Sus frutos son partenocárpico, de color amarillo, exquisito aroma cuando maduros, siendo de gran tamaño, llegando a alcanzar 23.04cm de longitud, 8.65cm de diámetro y un peso de 703.84g en promedio. En raras ocasiones se ha encontrado rudimentos de semillas lo que indica que es posible la polinización.

Las cosechas de Vasconcellea se realizan de forma continua y en el caso particular del babaco se debe realizar en madurez fisiológica cuando los frutos empiecen a cambiar de color verde a amarillos iniciando en el interior de las aristas. (Soria N et al. 1999)

2.2 Fundamentación filosófica.

La biotecnología agrícola o agrobiotecnología es una tema de gran actualidad y considerada de enorme potencial para mejorar la productividad de los sistemas agrícolas y contribuir así a resolver algunos de los principales retos que afronta la sociedad global, como lo explica el paradigma socio critico, como la seguridad alimentaria, el alto precio de los alimentos, la sostenibilidad, la lucha contra la pobreza y el hambre, el cambio climático, etc. Las principales aplicaciones agro biotecnológicas son las técnicas in vitro o celulares, técnicas de diagnostico y técnicas de ingeniería genética. (Morillo E. et al, 2009).

2.3 Fundamentación legal.

El presente trabajo de investigación legalmente se enunciaría en lo que establece la Constitución de la República del Ecuador (2008) Capitulo tercero que trata sobre "Soberanía alimentaria" Art. 281.-el mismo que dispone que: La soberanía alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del Estado para garantizar que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades alcancen la autosuficiencia de alimentos sanos y culturalmente apropiados de forma permanente. Para ello, será responsabilidad del Estado:

- Fortalecer la diversificación y la introducción de tecnologías ecológicas y orgánicas en la producción agropecuaria.

- Asegurar el desarrollo de la investigación científica y de la innovación tecnológica apropiada para garantizar la soberanía alimentaria.

- Regular bajo normas de bioseguridad el uso y desarrollo de biotecnología, así como su experimentación, uso y comercialización.

2.4 Categorías fundamentales.

2.4.1 Cultivo de babaco

Según Fabara J. et al.(1985), EI babaco es un híbrido de origen ecuatoriano, posiblemente de la provincia de Loja, resultante del cruce entre *Caricapubescens*L (chamburo) y de *CaricaStipulata*H (toronche).

Su cultivo al aire libre está localizado fundamentalmente en los valles de la región interandina en las provincias de Imbabura (Atuntaqui, Perucho y Otavalo), Pichincha (Tumbaco, San Antonio de Pichincha, San José de Minas, Guayllabamba), Tungurahua (Patate, Baños, Pelileo), Chimborazo (Penipe, Pallatanga y Huigra), Azuay (EI Valle de Cuenca, Paute, Gualaceo), Loja (Loja, Malacatos y Vilcabamba), entre otros

Montenegro F. (2009) Manifiesta que el babaco se puede cultivar en todo el callejón interandino de la sierra ecuatoriana, en altitudes que oscilan entre los 2.400 a 3.200 msnm, con esto se ha logrado cultivar este frutal en el rango altitudinal que anteriormente no era posible.

Este cultivo en sus inicios fue visitado por varios especialistas de otros países como Nueva Zelanda, en 1973, los mismos que realizaron varios estudios y trasladaron las primeras muestras y plantas para adaptar a ese país. Posteriormente en Italia es introducido en 1985, a Francia en 1987 y en España hay plantaciones comerciales

desde 1989, en los Estados Unidos existen plantaciones de babaco bajo invernadero específicamente en California, además existe este cultivo en el Reino Unido e Israel.

2.4.2 Características y morfología

El babaco es una planta arbustiva, el cultivo es semi perenne, de tallo de más de 2 m, creciendo en invernadero hasta 3 m. Sistema radicular conformado por raíces carnosas verticales de las cuales se desprenden raíces absorbentes superficiales y delicadas encargadas de la absorción de nutrientes. EI sistema radicular del babaco es susceptible a labores de remoción del suelo posterior a su plantación. EI tronco es recto, cilíndrico, no leñoso, verde cuando joven para tornarse de tono castaño grisáceo en edad adulta. Tiene hojas insertadas al tronco alternadamente, limbo lobulado con cinco a siete lóbulos, nervadura marcada de pecíolo largo. Su verde cambia de tonalidades, según la fase de desarrollo.

Las flores son femeninas, solitarias, pétalos blanco-amarillento-verdoso y sépalos verde obscuros, aparecen de manera continua en las axilas de las hojas, un mes después del trasplante si ha existido una adecuada abonadura y riego.

EI fruto es una baya sin semilla, no necesita de polinización para desarrollarse, es alargado de sección pentagonal mediana de unos 30 cm de largo por 10 a 15 cm de diámetro los obtenidos dentro de invernadero. En una misma planta pueden encontrarse frutos de diferentes tamaños. EI número de frutos por planta varía, ésta produce de acuerdo a como va creciendo pero se han estimado en 60 frutos promedio por planta durante su ciclo de vida de 24 meses.

La producción de babaco, bajo invernadero se inicia a los 12 o 13 meses de edad después del trasplante, dependiendo de la altitud y zona donde se encuentre. (Montenegro F. 2009)

2.4.3 Condiciones ambientales

2.4.3.1 Temperatura

La temperatura promedio adecuada para el desarrollo de este cultivo, está entre los 14 y 27 ºC.

Se presentan desórdenes fisiológicos si las temperaturas son exageradamente bajas o altas 5 o 35°C respectivamente, causando, caída de flores, frutos y también deficiencias nutricionales (Montenegro F. 2009)

2.4.3.2 Humedad

La humedad ambiental más recomendada para el desarrollo del cultivo esta dentro del rango del 70 al 80 % el mismo que puede ser controlado en los invernaderos,

mediante una adecuada ventilación. Caso contrario se presentarán enfermedades como el OIDIO o CENICILIA y plagas como la ARAÑITA ROJA, cuando la humedad relativa alcanza niveles bajos (60 % o menos por más de 8 días).

2.4.3.3 Luminosidad

Este cultivo no es muy exigente en horas luz, pero si necesita un mínimo de 4.5 horas luz por día.

2.4.4 Riego

EI riego del cultivo de babaco bajo invernadero, necesita riegos espaciados cada 12 o 15 días de acuerdo con el clima y las condiciones texturales del suelo. La recomendación para suelos francos es: iniciar regando 5 litros por planta cada 12 días para terminar con alrededor de 20 litros por planta cada 12 días.

En suelos francos arenosos es recomendable realizar riegos cada 8 días en las cantidades anteriormente indicadas.

Para riego por goteo se recomienda iniciar el riego de 1 Litro por planta día para luego avanzar a 3 Litros por planta día, colocando siempre dos goteros por planta alejados mínimo 30 cm del tallo de la planta.

2.4.5 Suelos

La textura ideal del suelo es la franca o franca arenosa arcillosa, ricos en materia orgánica, alrededor del 5%. Se adapta también a suelos limosos de fácil drenaje.

Se debe tener especial cuidado con el exceso de agua en el suelo para evitar pudriciones radiculares.

EI pH adecuado para un buen desarrollo del cultivo y asimilación de los nutrientes, se encuentra entre 5.5 y 6.8.

2.4.6 Propagación

EI babaco se puede reproducir solamente por vía asexual o vegetativa, debido a que posee un fruto partenocárpico, es decir que no produce semilla.

Los métodos de propagación de babaco más comunes son por estacas, brotes tiernos e injerto (Montenegro F. 2009)

También se puede propagar babaco mediante el cultivo in vitro.

2.4.7 Cultivo in vitro.

Según Jiménez E. (1998) Con respecto a los orígenes del cultivo in vitro de tejidos se remontan a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas, quien postulo el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustenta teorías de técnicas del cultivo in vitro. El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales.

Actualmente, en la propagación comercial puede identificarse cinco etapas bien definidas, cada una con sus objetivos específicos. Fase 0: Preparativa. Fase I: Establecimiento o iniciación de los cultivos. Fase II: Multiplicación, Fase III: Enraizamiento y Fase IV: Aclimatación (Krikorian, 1991 citado por Jimenez E. 1998).

2.4.7.1 Fase 0: preparativa.

Pérez J. (1998) indica que: Inicialmente, esta fase fue conocida para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presenta comúnmente en la Fase I (Debergh y Maene, 1981). Sin embargo, en la actualidad existen un consenso de que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible, por lo que cada vez se la va prestando mayor importancia. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético.

Para esta fase preparativa, se debe considerar los siguientes pasos.

- Selección de las plantas donadoras.
- Pre – tratamiento a las plantas donadoras.
- Crecimiento de las plantas en ambientes controlados e higiénicos.

2.4.7.2 Fase I: establecimiento o iniciación de los cultivos.

El objetivo de esta etapa es lograr el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación.

2.4.7.2.1 El explante.

El estado de desarrollo de la planta madre y la edad fisiológica del explante así como su tamaño, son de gran influencia en el éxito del cultivo in vitro (George y Sherrington, 1984 citado por Jiménez E. 1998)

2.4.7.2.2 <u>Desinfección del explante</u>.

La contaminación en los cultivos in vitro es uno de los principales problemas a resolver en la industria de la micro propagación. Los contaminantes pueden originarse de dos fuentes distintas, primeramente aquellos que vienen en la superficie o en los tejidos de la planta donadora y en segundo lugar los que aparecen como resultados de fallas en los procedimientos de laboratorio. Desde el punto de vista del establecimiento de cultivo axénicos solo la primera causa será abordada.

Para la eliminación de microorganismos contaminantes los explantes son desinfectados superficialmente. Generalmente se cortan los explantes de un tamaño algo superior y son sometidos a la acción de los desinfectantes y luego en condiciones estériles son reducidos a su tamaño final.

Los desinfectantes más comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), Hipoclorito de Ca (CaClO), peróxido de hidrogeno (H2O2), etanol y bicloruro de mercurio (HgCl2). Los tres primeros se emplean en concentraciones de 1 a 3% en tiempos de 10 a 20 minutos, el alcohol se usa generalmente al 70% y se emplea en combinación con otros desinfectantes. El bicloruro de mercurio es el de mayor toxicidad y se emplea en dosis bajas y corto tiempo (0.1% durante 1 a 3 minutos). (Jiménez E. 1998).

2.4.7.2.3 <u>Contaminantes microbianos introducidos en el laboratorio</u>.

Los microorganismos que se introducen en el laboratorio son generalmente habitantes del suelo que se encuentran en el ambiente; saprofitos o patógenos de las plantas, así como habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano que se relaciona con procederes inadecuados en el laboratorio, condiciones higiénico sanitarias deficientes o incumplimientos de la disciplina tecnológica. Ciertas bacterias entran al cultivo de tejidos con los explantes iníciales pero otras son claramente introducidas en el laboratorio.

Entre los hongos filamentosos contaminantes, los géneros encontrados con mayor frecuencia han sido *Aspergillus, Cladosporium, Penicillium, Fusarium, Alternaria y Neurospora*(Enjalric y col., 1988; Danby y col., 1994; Alvarado y col., 1997 citado por Jiménez E. 1998)

Las bacterias también crecen superficialmente en el medio de cultivo de las plantas, alrededor de los explantes y dentro del propio medio de cultivo. Cuando estos microorganismos se encuentran asociados al tejido vegetal no se distinguen colonias aisladas sino una masa bacteriana que adopta las formas de pliegues, halos o rosetas en el interior del medio de cultivo sólido y muestra abundante o escaso crecimiento sobre la superficie. Sus colores y texturas varían con la especie y en muchos casos con la composición del medio de cultivo. En medio líquido las bacterias forman turbidez uniforme o no, películas o sedimentos.

A diferencia de los hongos filamentosos y las levaduras, las bacterias a menudo no producen crecimiento visible sobre el medio o síntomas en las plantas hasta mucho tiempo después de que fueron introducidos.

Las altas presiones osmóticas, el pH y determinadas hormonas pueden inhibir o limitar el crecimiento de las bacterias (Leifert y col., 1994 citado por Jiménez E. 1998).

2.4.7.3 **Fase II multiplicación**.

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron las fases anteriores originen brotes (Callos).

2.4.7.4 **Fase III enraizamiento.**

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 de las auxinas.

Para todas las fases anteriormente mencionadas se requiere de :

2.4.7. 5 Medios de cultivo y hormonas de crecimiento.

Las sales mineralesMurashige y Skoog*(MS)*es el medio basal que lleva sus nombres y que constituye una de las formulaciones clásicas más utilizados hasta el momento.

Sacarosa (azúcar de mesa) es un disacárido de glucosa y fructosa. Se sintetiza en plantas, pero no en animales superiores. Contiene 2 átomos de carbono anoméricolibre,puesto que los carbonos anoméricos de sus dos unidades monosacáridos constituyentes se hallan unidos entre sí, covalentemente mediante un enlace O glucosídico. Por esta razón, la sacarosa no es un azúcar reductor y tampoco posee un extremo reductor.

Su nombre abreviado puede escribirse como Glc(a -1à 2)Fru o como Fru(b 2à 1)Glc. La sacarosa es un producto intermedio principal de la fotosíntesis, en muchas plantas constituye la forma principal de transporte de azúcar desde las hojas a otras partes de la planta. En las semillas germinadas de plantas, las grasas y proteínas almacenadas se convierten en sacarosa para su transporte a partir de la planta en desarrollo.

2.4.7.5.1 Fitohormonas En micropropagación, principalmente se utilizan citocininas y auxinas como reguladores de crecimiento. Lo más importante es la proporción y cantidad de las mismas.

2.4.7.5.2 Auxinas: Se utilizan para promover la división celular y la diferenciación de raíces. Normalmente, se usan los compuestos siguientes como fuente de auxina:

IAA (Acido indolacético); NAA (Acido naftalenacético); IBA (Acido indolbutírico); 2,4-D (2,4-Acido diclorofenoxiacético), etc.

2.4.7.5.3 Citocininas: Se adicionan al medio de cultivo para promover la división celular y la diferenciación de yemas y brotes adventicios de callos y órganos. Se usan los compuestos siguientes como fuente de citocininas:

Cinetina; BA (6-Benciladenina); BAP (6-Bencilaminopurina); 2iP (N-Isopentenilaminopurina); Zeatina.

2.4.7.5.4 Giberelinas: Se utilizan para inducir el desarrollo de embriones adventicios. En la mayoría de los casos, se usa GA_3, entre varias giberelinas existentes.

2.4.7.5.5 Gelrite. (Gellangum): Gelrite es un agente gelificante que se desarrolló para micropropagación de plantas. Tiene las características siguientes:

- Requiere de un ion positivo para gelificar, puede ser K^+ Ca^+
- Permite controlar la solidificación del medio de cultivo mediante el cambio del volumen, clase y densidad del ion positivo.
- Es más transparente que el agar.
- Permite gelificar utilizando una menor cantidad que la de agar.
- Puede volver a disolverse por recalentamiento, después de que ha gelificado.
- Tiene resistencia al calor y a las enzimas.
- Produce una mezcla homogénea.

2.4.7.5.6 pH (Exponente del ión hidrógeno) La concentración del ión H (pH) produce un efecto en la absorción iónica, en los medios de cultivo. La acidez y la alcalinidad extremas inhiben el crecimiento de los vitroplantas.
Por lo general, se estabiliza el pH apropiado entre 5.4 a 6.0, con HCI, y NaOH o KOH según la especie de planta que se va a micropropagar. (Usui K., et al 1996)

En el cultivo in vitro se puede aplicar diferentes métodos de regeneración de plantas, entre ellas tenemos.

2.4.7.6 Métodos de regeneración in vitro.

2.4.7.6.1 Organogénesis.

Orellana P. (1998) La organogénesis es un evento morfogenético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de yemas con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Este método ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: La formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias.

2.4.7.6.2 Cultivo de hojas.

Usui K. (1996) En algunas especies se puede diferenciar los brotes a partir de los explantes de las hojas directamente. Algunas veces alcanza también al primordio (2.4), callos embriogénicos y callo normal (2.5).

Normalmente esta técnica es más riesgosa que el cultivo de meristemas, debido a que en esta misma, la tasa de mutación es alta. Para tener éxito con esta técnica, primero debe verificarse la no existencia de virus, y segundo que no vaya a ocurrir una mutación.

2.4.7.6.3 Otros órganos.

Algunas veces se utilizan como material de propagación (por ejemplo: tallos, pedúnculos, cotiledones, etc.). Estos órganos tienen algunas ventajas, por ejemplo se puede preparar muchos materiales de una sola vez, así también después de seleccionar la calidad de la planta, evitando contaminaciones, y observando si la actividad de las hormonas internas es muy alta, se puede utilizar en la multiplicación.

2.4.7.6.4 Cultivo de callos

Según Gómez R. (1998),el establecimiento de cultivos de callos seguido con la formación de plantas vía organogénesis o embriogénesis somática se ha estudiado en numerosas especies de plantas (Litz y Jarret, 1991). El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido. La formación del callo comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente des diferencian ante la presencia de auxina exógena en el medio de cultivo. En las células se presenta una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizadas, dando origen a una masa amorfa de tejidos.

En todas las fases del cultivo de callo el genotipo juega un importante papel para llegar a obtener éxito, por lo cual se debe siempre trabajar durante la investigación con 2 a 3 genotipos a la vez.Desde el punto de vista morfo génico la característica más importante del callo es la totipotencia de sus células ya que en general con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos dependiendo fundamentalmente del balance auxina-citocinina en el medio de cultivo.

Se ha formado callos utilizando diferentes tipos de explantes, prácticamente de todas las partes de una planta. Independientemente del explante usado, la edad de este tiene un rol importante en la determinación de la respuesta in vitro. Solo un pequeño porcentaje de las células en un explante dado contribuyen a la formación del callo. El lugar o sitio para el comienzo de la proliferación de los callos generalmente esta situado en la superficie del explante o en la superficie extirpada. La tendencia es a emplear tejidos mas indiferenciados y los más jóvenes posibles, lo cual ha permitido obtener éxito en el cultivo in vitro de diferentes especies anteriormente consideradas

"recalcitrantes". También el uso de diferentes partes de plantas in vitro, así como el uso de órganos o fragmentos de órganos encerrados en frutos o inflorescencias ha permitido reducir a niveles muy bajos los porcentajes de contaminación, siendo también otra tendencia actual.

El callo puede tener diferentes apariencias y color en dependencia de la especie o genotipo con que se trabaje, así como las condiciones de cultivo in vitro. El color varía de blanco, blanco amarillento a pardo. Su apariencia puede ser acuosa (callos que no regeneran) o compactos, secos y nodulares.

La fase de formación de los callos es de forma general la menos importante, pues consiste en solamente establecer los explantes in vitro y obtener el callo, el cual se forma fácilmente solamente con la presencia en el medio de cualquier tipo de auxina "potente" (2,4-diclorofenoxiacetico, dicamba, picloram), sin embargo lograr multiplicarlo con buen crecimiento y al final obtener plantas son las fases 0 etapas mas difíciles.

Los callos después de formados pueden multiplicarse con subcultivos cada 30-45 días en dependencia de la especie de planta, separando estos en pequeñas fracciones con tamaño entre 2-5 mm. Generalmente se emplea el mismo medio de cultivo de formación para la multiplicación. Con respecto a la multiplicación de los callos en la caña de azúcar el medio propuesto por Heinz y Mee (1969 citado por Orellana P 1998) ha resultado superior al resto de los medios estudiados, en cuanto al crecimiento y las características de friabilidad, lo cual está dado por el balance hormonal logrado en este medio.

Los callos son de color amarillo a blanco, secos y de buen desarrollo. Mostrando una marcada influencia del contenido de agar del medio de cultivo (estado físico) sobre el

crecimiento de estos. Los mejores callos fueron obtenidos al emplear una concentración de agar de 8 g/L, con diferencias superiores en cuanto a crecimiento y apariencia de los callos a las concentraciones de 4 y 6 g/L respectivamente. Lo cual parece estar dado por las altas concentraciones a estas dosis de iones Calcio y Magnesio que tiene un papel importante en la formación y calidad del callo.

Producto de la diferenciación celular que tiene lugar en los tejidos del callo, las células meristemáticos en continua división, se transforman en células grandes, de citoplasma ralo y laterizado, producto del crecimiento de una vacuola que ocupa todo el espacio citoplasmático.

Para la fase de formación de plantas a partir de ellos según la vía (organogénesis y embriogénesis somática) que se utilice será necesario emplear un balance hormonal diferente.

La edad del callo juega un papel fundamental junto con el genotipo en el porcentaje de regeneración alcanzados. Tomando como base experimentos realizados por Gómez (1996) en caña de azúcar, los cultivos de células desdiferenciadas (callos) una vez establecidos tenían el mismo aspecto y la capacidad de rediferenciar en general (primordios de hojas y raíces) en cuatro variedades, a lo largo de 9 meses vario de 75.6 a 80.4 % en el medio propuesto por Payan y col. (1977 citado por Orellana P. 1998). Pudo comprobarse que la capacidad de los callos para regenerar plántulas es mayor cuando la inducción se realiza a los 3 meses (85.56 %) potencialidad que se reduce a menos de la mitad a los 10 meses (28.76 %).

Además de una disminución gradual en la potencialidad de los cultivos de callo para regenerar plántulas en el lapso estudiado, también hubo cambios en el patrón de diferenciación.

Desde el tercero al quinto mes no se encontraron cultivos que regeneraran raíces; fenómeno que apareció en cultivo de seis meses y que fue incrementándose gradualmente. Cuadro 1 .

CUADRO 1: INFLUENCIA DE LOS SUBCULTIVOS SOBRE LA REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE LOS CALLOS, INDUCIDA EN EL MEDIO PAYÁN Y COL. (1977).

MESES	Plantas (%)	Raíces (%)	Total (%)
3	85.56	0	85.56
4	73.82	0	73.82
5	66.12	0	66.15
6	54.27	1.25	55.54
7	46.15	2.64	48.79
8	41.02	5.13	46.15
9	36.44	7.28	43.72
10	28.78	14.69	43.45

También las condiciones de cultivo en esta fase tuvieron una marcada influencia. Observándose diferencias en los tipos de luz utilizados (luz artificial directa, con fotoperiodo de 12:12 y luz solar), comportándose superior la luz solar en los parámetros evaluados (tiempo para la regeneración y altura de las plantas). Desde el punto de vista del desarrollo in vitro queda demostrado las ventajas de la luz solar, lo cual puede deberse a las siguientes razones: la calidad espectral es muy superior a cualquier luz artificial y las fluctuaciones de luz y temperatura a las cuales están adaptadas los cultivos, estimulando su desarrollo in vitro. Siendo también ventajosa desde el punto de vista económico.

2.4.7.6.5 **Embriogénesis somática.**

Para Gómez R. (1998), la embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos. Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia, por primera vez descrita por Strasburges en 1878. Aunque fueron Reinerty col., quienes dieron créditos por primera vez a la descripción de la embriogénesis somática en el año 1958.

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales. Este método es ampliamente considerado como el mas eficiente para la producción masiva de plantas "in vitro". Debido a la naturaleza bipolar del embrión y la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales. Sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aun limitado el número de especies en los cuales se reporta una embriogénesis somática eficiente que permita un uso aplicado del método.

El desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye los siguientes pasos:

_ Inducción de los embriones somáticos
_ Desarrollo de los embriones somáticos

_ Proliferación

_ Maduración

_ Germinación y Conversión en plantas

La característica más distintiva de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar (raíz y brote)"capaz de originar una planta completa. Según Sannasgala (1989) y Escalant y Teissont (1989) citado por Vega R (2001) el embrión somático presenta las siguientes características:

- Tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis). Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de este.
- Es una estructura bipolar con un ápice radical, apical y cotiledones .
- Presente bandas procambiales entre los ápices.

Según Parrot (1993) citado por Vega R. (2001), la inducción del estado embriogénico incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que conllevan a la embriogénesis cigótico. Contrariamente a los embriones cigóticos, los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética de la planta fuente del explante.

Morfológicamente un embrión somático es muy similar a uno cigótico, sobre todo en su desarrollo evolutivo desde pro embrión, fase globular, corazón torpedo y fase cotiledonar o embrión maduro, esto para el caso de las especies dicotiledóneas.

La embriogénesis somática es afectada por varios factores tales como:

_ El genotipo de la planta

_ El tipo y estado fisiológico del explante

_ Los reguladores del crecimiento

_ Condiciones de cultivo

Una valiosa cantidad de información se ha obtenido en estos 48 años desde que por primera vez la embriogénesis somática fue reconocida como tal en los laboratorios de cultivo in vitro. No obstante la inducción exitosa de los embriones somáticos y su siguiente conversión en viables plantas no es rutina o eficiente para la mayoría de las especies en los momentos actuales (Merkle y col.,1996) citado por Vega R (2001).

Todas las células somáticas dentro de la planta contienen la, información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. La inducción de la embriogénesis somática consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante, siendo estos remplazados con un programa de expresión de genes o gen de la embriogénesis en aquellas células del tejido del explante, las cuales pudieran dar lugar a embriones somáticos. Este concepto fue planteado por primera vez por Evans y col., (1981); Sharp y col., (1984), citados por Vega R (2001) quienes usaron los términos siguientes:

"Inducción de la embriogénesis en determinadas células" (IEDC) para describir una embriogénesis celular que tuvo origen en una célula no embriogénica.

"Células somáticas determinadas pre embriogénicamente" (CsDPE) para describir aquellas células desde embriones cigóticos de plantas, las cuales siempre expresan un programa de expresión de los genes embriogénicos.

Los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática dependen si el tejido del explante está formado o consiste en CsDPE o CsNE (célula somática no embriogénica).

En el primer caso, "CsDPE": Un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de un embrión somático a partir del tejido del explante, este proceso es llamado embriogénesis somática directa. O sea la formación de embriones somáticos directamente desde una estructura organizada tales como segmentos de embriones cigóticos o embriones cigóticos completos y/o tallos (Williams y Maheswaran, 1986) citados por Vega R. (2001)

"CsNE": Las células del tejido deben sufrir varias divisiones mitóticas en la presencia de una auxina durante la inducción del estado de célula embriogénica. Estas divisiones mitóticas dan lugar a un callo, aunque también se pueden obtener a partir de suspensiones celulares y protoplastos. Este proceso es llamado embriogénesis somática indirecta y es usado para indicar que una fase se interpone entre el explante original y la aparición de embriones somáticos.

Uno de los eventos iníciales para la inducción de la embriogénesis somática es la terminación de la salida del gen a los genes del patrón de expresión permitiendo su emplazamiento con el programa de la embriogénesis. Un posible mecanismo para regular baja la expresión de los genes es la metilación del ADN, la cual han sido correlacionada con la cantidad de auxina exógena presente en el medio de cultivo. Por lo cual tratamientos de estrés que permitan mantener baja la regulación de la expresión de los genes del tejido del explante, pueden también estimular la embriogénesis somática. Se han empleado diferentes técnicas como estrés con calor, aumento de la concentración de iones de hipoclorito, anaerobiosis, temperaturas bajas 4°C y también la exposición a la auxina.

En la embriogénesis indirecta el fenómeno fue observado por primera vez en suspensiones celulares de zanahoria (*Daucus carota*) por Steward y col., (1958) y a partir de callos creciendo en medio solido por Reinert y col., (1958).citados por Vega R. (2001)

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (E.S.B.F.) y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia (E.S.A.F.). En la primera, el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo.

Estos embriones aparecen entre las 12 y las 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos y se desarrollan completamente pasando por los diferentes estadios de desarrollo (globular, corazón, torpedo y maduro), mientras que en la segunda, los embriones, somáticos aparecen entre las 16 y las 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular, agrupados en un número mucho mayor, aunque estos grupos aparecen en un número menor de callos. Por ejemplo, en el caso del café (Coffea arabica), al cual se refirió anteriormente, así como en los bananos y plátanos (Musa spp.).

2.5 Hipótesis.

Los óvulos y hojas de babaco (Vasconcellea x heilbornii) cultivados in vitro sometidos a la acción de fitohormonas presentaran capacidad embriogénica**.**

2.6 Señalamiento de variables de la hipótesis.

Para evaluar la capacidad embriogénica de babaco (V. x heilbornii) el material usado fueron frutos que oscilaban entre un tiempo de desarrollo de 20 a 90 días a los mismos que se les realizo tres tratamientos:

- T1; Temperatura Ambiente (T^o promedio 24.08^o C.) siembra inmediata.
- T2; Temperatura de 4^o C. por 4 días
- T3; Temperatura de 4^o C. Por 8 días.

Y de igual manera se realizó la recolección de hojas de babaco e implantación de segmento de hojas, sometidas al tratamiento 1 (temperatura ambiente, siembra inmediata).Tanto los óvulos (de frutos sometidos a diferentes tratamientos) y los segmentos de hojas de babaco fueron introducidos in vitro en cuatro medios de cultivo, y se llevó un registro de contaminación y capacidad embriogénica (Cuadro 2 y 3)

CUADRO 2. OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE DEPENDIENTE "CAPACIDAD EMBRIOGENICA"

CONCEPTO	CATEGORÍA	INDICADORES	ÍNDICE
Capacidad embriogénica de babaco. La embriogénesis somática, también denominada embriogénesis asexual o adventicia, consiste en el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión de gametos durante la fecundación o, en otras palabras, es un proceso por el cual se produce una estructura bipolar (el embrión) a partir de una célula somática.	Introducción de óvulos y hojas 1.- Fruto a T^{o}. Ambiente. 2.-Fruto a T^{o}. 4 C por 4 días. 3.-Fruto a T^{o}. 4 C 8 días. 4- Segmento de hojas.	Número de óvulos introducidos por cada tratamiento. Numero de óvulos que forman callo. Numero de óvulos que se mantienen sin formar callo. Numero de segmento de hojas introducidas.	- Evaluación % contaminación por hongos. - Evaluación % contaminación por bacterias - .Evaluación, % de óvulos con capacidad embriogénetica o reactividad embriogénica.

CUADRO 3. OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE "MEDIOS DE CULTIVO "

CONCEPTO	CATEGORÍA	INDICADORES	ÍNDICE
Medio de cultivo consiste en un gel o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir (bajo condiciones favorables de pH y temperatura) el crecimiento de virus, microorganismos, células o incluso pequeñas plantas. Según qué se quiera hacer crecer, el medio requerirá unas u otras condiciones. Generalmente se presentan desecados en forma de polvo fino o granular antes de ser preparados, al prepararse podemos encontrarlos en estado sólido, semisólido y líquido.	Medio para introducción (MIC) Medio de Mantenimiento de Callo (MMC) Medio de Desarrollo de Embrión (MDE).	MICA: 500ul, de2,4D MICB: 1500ul,de2,4D MICC:2500ul,de2,4D MICT:0ul ,de 2,4D MMCA: 1mg de BA. MMCB: 2mg de BA MMCC: 3mg de BA MDE: 0,5mg de AIA	Evaluación % contaminación por hongos. Evaluación % contaminación por bacterias Evaluación, % de óvulos con capacidad embriogénetica o reactividad embriogénica.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA.

3.1 Modalidad básica de la investigación.

La investigación tiene un enfoque cuantitativo al determinar la capacidad embriogénica de babaco introduciendo óvulos y hojas de babaco en diferentes medios de cultivo.

3.2 Nivel o tipo de investigación.

3.2.1 Descriptiva.- Este método permitió seleccionar una serie de conceptos o variables midiendo cada una de ellas independientemente de las otras con el fin de describir y graficar las características y las frecuencias con la que ocurrieron en la investigación.

3.2.2 De campo.- Permitió obtener información por medio de la observación facilitando la recolección de datos con ayuda de registros, fotos, libreta de campo. (**Anexo 3 y 4)**

3.2.3 Bibliográfica.-Constituyó el punto de partida para la realización de todos los procesos de esta investigación facilitando el análisis y evaluación de aquello que se obtuvo de libros, revistas, folletos, artículos e internet.

3.2.4 Experimental.- permitió delimitar y definir el objeto de la investigación o problema, señalando las variables dependientes e independientes. Plantear una hipótesis de trabajo, elaborando un diseño experimental, luego analizar resultados, obtener conclusiones y así elaborar un informe escrito de la investigación

3.3 Población y Muestra.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, perteneciente al Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria (INIAP), localizada en las siguientes coordenadas: 79°21' Longitud occidental; 1°06' de Latitud sur a una altura de 120 m.s.n.m ubicada en el Km. 5 vía Quevedo – El Empalme, en la provincia de Los Ríos.[1]

3.3.1Materiales de laboratorio.

Para la ejecución de este trabajo de investigación fue indispensable el uso de:

3.3.1.1 Materiales de Laboratorio.

3.3.1.2 Cuartos de Preparación de Medios.

Filtro y destilador de agua, autoclave, refrigeradoras, balanza analítica.

Plato calentador y agitador magnético.

Material de vidrio, botellas para medios de cultivo.

3.31.3 Sala de aislamiento.

Cámara de flujo laminar, esterilizadores y estufa.

3.3.1.4 Sala de Crecimiento.

Estantería adecuada con luz blanca, higrotermometros.

---.

[1]INAMHI, Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (datos promedios del periodo 2003 – 2004)

3.3.1.5 .Materiales de campo.

El material vegetal de babaco se extrajo del Invernadero del Sr. Justo Zegarra, ubicado en la comunidad de Bulan a una altitud de 2519msnm, Latitud $2^{0}43^{l}42$" Sur, Longitud $58^{0}46^{l}18$" Oeste; perteneciente al Cantón Paute, Provincia del Azuay.

El cultivo de Babaco se encontraba en el tercer año de instalación, los frutos fueron extraídos en un estado de desarrollo de entre 20 a 90 días (Referencia tomada del antecedente 1) y hojas maduras.

3.3.1.6 Reactivos.

Los reactivos utilizados en la presente investigación, se señalan en el anexo 5. Los macro y micro nutrientes son los siguientes.

- Macro y micronutrientes, Vitaminas, aminoácidos, fuentes de Carbono.
- Fitohormonas (auxinas y citoquininas), gelificante.

3.3.1.7 Técnica.

Se utilizó la técnica de introducción de óvulos propuesta por Vega R.,Kitto S. (2001) (descrita en el antecedente 1.)

3.3.1.8 Recolección de material.

Los frutos y hojas de babaco fueron recolectados en la mañana, y luego trasladados cuidadosamente al Laboratorio de Biotecnología de la EET. Pichilingue, en donde se procedió a dar el manejo adecuado para la Introducción. Se recolecto 9 frutos, los mismos que se repartieron 3 frutos para cada Tratamiento.

3.3.1.9 Desinfección del material vegetativo.

Al material vegetal (frutos y hojas) para introducirlo in vitro, en el laboratorio de la EET Pichilingue se le practicó el siguiente proceso de desinfección:

1.- El material estuvo en chorro continuo de agua por 30min.
2.- Se lavó al material 3 veces con jabón líquido 20 gotas /L.deTween 20
3.- Se sumergió al material en alcohol al 96% por 1 min.
4.- Se sumergió en hipoclorito de Calcio al 3% por 5 min.
5.- En Cámara de Flujo, se realizó tres enjuagues con Agua destilada estéril.
6.- Se realizó la introducción in vitro de óvulos y segmento de hojas de babaco.

3.3.2.0 Introducción in vitro de óvulos.

- Para la introducción in vitro, a los frutos desinfectados se los colocó sobre papel toalla previamente esterilizado para la absorción del agua, resultado de los enjuagues.
- Luego se realizó un corte vertical en el fruto (aristas).

- Se extrajo los óvulos, situándoles 20 por caja petri que contenían 25 ml de medio de cultivo de introducción (MIC: A, B, C y T). Las cajas fueron selladas y mantenidas a condiciones de luz con un fotoperiodo de 16/8 (16 horas de luz /8 de oscuridad) horas a una temperatura de 27 $\pm$ 2°C., por 21 días.

  Total óvulos /Tratamientos/ 4 medios = 480 óvulos.

  Tratamiento 1: Temperatura ambiente, siembra inmediata: 480 óvulos
  Tratamiento 2. Temperatura de 4° C por 4 días se introdujo 480 óvulos.
  Tratamiento 3. Temperatura de 4°C por 8 días se introdujo 480 óvulos.

  No. Tratamientos óvulos / medios = 1440 óvulos.

  El total de óvulos introducidos en esta investigación fue de 1440 óvulos.

Transferencia.

- Transcurrido el periodo los óvulos se transfirieron a cajas Petri que contenían 25 ml de un medio para mantenimiento de callo (MMC: A; B y C), fueron selladas y mantenidas en las mismas condiciones anteriores por 63 días, (Transferidos cada 21 días)
- Después se transfirieron a los óvulos y callos a cajas Petri que contenían 25ml de un medio de Desarrollo de Embrión (MDE).

3.3.2.1 Introducción de segmentos de hojas.

Para la introducción in vitro de hojas de babaco, se realizó la desinfección anteriormente descrita.

- Luego de desinfectadas en cámara de flujo, las hojas se las colocó en papel toalla previamente esterilizadas, para la absorción de agua, resultado de los enjuagues.
- Se extrajo una porción de hoja, y se la colocó en la caja petri para así dividirla en pequeños segmentos.
- Se realizó la siembra de 20 segmentos de hoja por caja petri que contenía 25ml., de medio de introducción. (MIC: A; B; C y T.) las cajas fueron selladas y mantenidas en condiciones de luz con un fotoperiodo de 16/8 horas y a una temperatura de $27_^{+}\ 2^{o}$ C por 21 días, para luego transferirlos a medios de mantenimiento, (MMC: A, B y C) por 63 días, Trascurrido el periodo se lo trasferiría al medio de desarrollo de Embrión (MDE).

Total de segmento de hojas introducidas in vitro por Tratamiento/ medios fue 480 segmentos.

Durante el tiempo de investigación se realizó el registro o toma de datos cada semana, para determinar: contaminados por hongos, bacterias, y capacidad embriogénica (Formación de callos).

3.4 Operacionalización de variables.

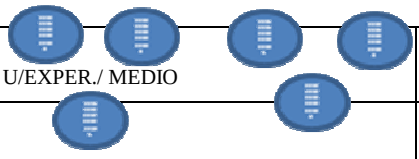
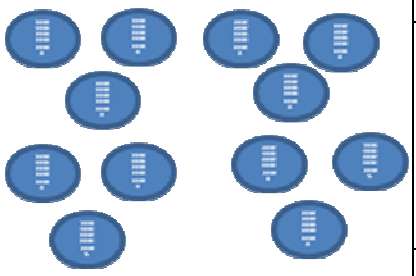
3.4.1 .Factor en estudio.

Capacidad embriogénica de óvulos y hojas de babaco, multiplicadas *in vitro*, vía embriogénesis somática.

3.4.2. Tratamientos.

Los tratamientos aplicados en el presente estudio se señalan en el cuadro 4

CUADRO 4. DISEÑO DE DISTRIBUCIÓN DE LOS TRATAMIENTO Y MEDIOS DE CULTIVO

TRATAMIENTO	U/EXPER./ MEDIO	MEDIO 1 INDUCCION	MEDIO 2 MANTEN.	MEDIO 3 DESARROLLO	MEDIO 4 EMBRIÓN
T1.		MICA MICB MICC MICT	MMCA MMCB MMCC	MDE	ME
T2.		MICA MICB MICC MICT	MMCA MMCB MMCC	MDE	ME
T3.		MICA MICB MICC MICT	MMCA MMCB MMCC	MDE	ME

3.4.2.1 Óvulos

Los tratamientos constituyeron los óvulos de los frutos sometidos a diferentes temperaturas y tiempo.

Tratamiento 1: Óvulos de frutos a temperatura ambiente y siembra inmediata.
Tratamiento 2: Óvulos de frutos sometidos a temperatura de $4^{o}C$ por 4 días.
Tratamiento 3**:** Óvulos de frutos sometidos a Temperatura de $4^{o}C$ por 8 días.

3.4.2.2 Hojas.

Para la introducción in vitro de hojas se la sometió al tratamiento 1(Temperatura Ambiente con siembra inmediata.)

3.5 Plan de recolección de información.

3.5.1 Diseño experimental.

Por la naturaleza de la investigación, se aplicó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con seis repeticiones.

3.6 Plan de procesamiento de la información.

Cada tratamiento por medio de cultivo se conformó por seis repeticiones, la unidad experimental estuvo compuesta por una caja Petri de 10cm., de diámetro conteniendo 20 óvulos. (**ANEXO 6)**

Por 1 tratamiento/1 medio se introdujo 120 óvulos.

En el T1. (Los óvulos fueron extraídos de frutos a Temperatura Ambiente, siembra inmediata): se extrajo óvulos, y se los introdujo en los medios: MICA; 120 óvulos. MICB: 120 óvulos. MICC: 120 óvulos y MICT 120 óvulos.

En el T2. (Los óvulos fueros extraídos de frutos sometidos a Temperatura de 4^{o}C por 4 días): se extrajo óvulos y se realizó la introducción en los medios de cultivo: MICA; 120 óvulos. MICB; 120 óvulos. MICC; 120 óvulos y MICT; 120 óvulos.

En el T3. (Los óvulos fueros extraídos de frutos sometidos a Temperatura de 4^{o}C por 8 días): se extrajo óvulos y se realizó la introducción en los medios de cultivo: MICA; 120 óvulos. MICB; 120 óvulos. MICC; 120 óvulos y MICT; 120 óvulos.

CAPÍTULO IV.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

4.1 Análisis de Datos.

Se realizó el análisis de varianza (ADEVA), además para los tratamientos que demostraron diferencia significativa se realizó pruebas de Duncan al 0.05%.

Adicionalmente para la interpretación de los resultados se realizaron comparaciones en base a parámetros de estadística descriptiva como promedios, rangos y frecuencias, descrita en el Cuadro 5

CUADRO 5. ESQUEMA DE ANÁLISIS DE VARIANZA.

Fuentes de Varianza	Grados de Libertad.
Total.	(t x r – 1)
Tratamiento	(t – 1)
Error Experimental	t(r – 1)

4.1.1 Análisis de los resultados. Etapa I

4.1.1.1 Porcentaje de contaminación por bacteria.

Para evaluar contaminación en la etapa de introducción se consideró: Medio de cultivo / Tratamiento (temperatura), los mismos que no presentaron variación significativa entre los tratamientos y medios de cultivo.

El medio de cultivo que menor porcentaje de contaminación por bacterias presentó fue MICC con un 11.11%, continuando el medio MICT con 15,28%, MICB, 15,44% y MICA 33,61%, siendo el último el que mayor porcentaje de contaminación presentó. (Cuadro 6)

CUADRO 6. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN BACTERIANA POR

MEDIO DE CULTIVO.

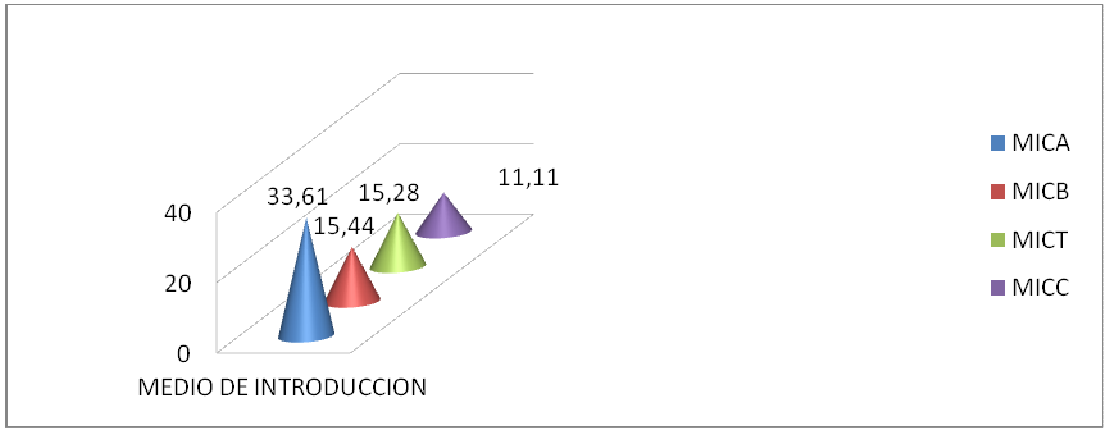


FIGURA1. Porcentaje de contaminación por bacterias en relación al medio de cultivo en la etapa de inducción de callos

Test: Duncan Alfa=0,05			
Error: 1258,2384 g l: 60			
Medio	Cont.	n	
MICA	33.61	18	A
MICB	15.44	18	A
MICT	15.28	18	A
MICC	11.11	18	A
Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)			

En el análisis estadístico de contaminación bacteriana en relación a los tratamientos no presentó diferencia significativa pero si matemática (Cuadro 7)

CUADRO 7. CONTAMINACIÓN POR BACTERIAS POR TRATAMIENTO

Test: Duncan Alfa=0,05			
Error: 1258,2384 g l: 60			
Tratamiento	Medias	n	
4°C x 8 días	28.33	24	A
4°C x 4 días	20	24	A
T° ambiente	8.24	24	A
Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)			

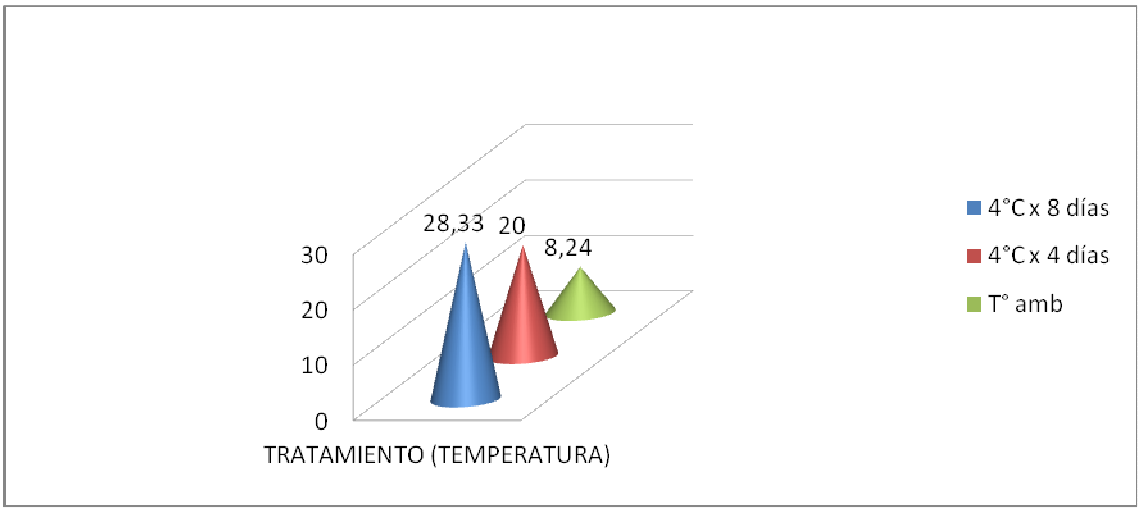


FIGURA 2. Porcentaje de contaminación bacteriana en relación a los tratamientos.

El tratamiento con menor porcentaje de contaminación fue el tratamiento 1(Temperatura ambiente, siembra inmediata) como se señala en la figura 2

En el análisis estadístico de contaminación bacteriana en relación; medio de cultivo / tratamiento, tenemos como resultado que no hay diferencia significativa solo diferencia matemática (Cuadro 8)

CUADRO 8. CONTAMINACIÓN BACTERIANA EN RELACIÓN MEDIO DE CULTIVO/ TRATAMIENTO.

Test: Duncan Alfa=0,05				
Error: 199,1127 g. l: 60				
Medio	Tratamiento	Medias	n	
MICA	4°C x 8 días	16.67	6	A
MICT	4°C x 4 días	11.67	6	A
MICA	T° ambiente	5.56	6	A
MICC	4°C x 8 días	4.17	6	A
MICT	4°C x 8 días	1.67	6	A
MICA	4°C x 4 días	0	6	A
MICT	T° ambiente	0	6	A
MICB	4°C x 4 días	0	6	A
MICB	T° ambiente	0	6	A
MICC	T° ambiente	0	6	A
MICC	4°C x 4 días	0	6	A
MICB	4°C x 8 días	0	6	A
Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)				

4.1.1.2 **Porcentaje de contaminación por hongos.**

Al realizar en análisis estadístico en lo que trata, la contaminación por hongos en los diferentes medios de cultivo y tratamiento, no presentó diferencia significativa pero si matemática. (cuadro 9)

CUADRO 9. CONTAMINACIÓN POR HONGOS EN RELACIÓN A LOS MEDIOS DE CULTIVO Y TRATAMIENTOS.

Test: Duncan Alfa=0,05				
Error: 7,6944 g l: 60				
Medio	Tratamiento	Medias	n	
MICA	4°C x 8 días	3.33	6	A
MICT	4°C x 4 días	2.33	6	A
MICA	T° ambiente	0.83	6	A
MICC	4°C x 8 días	0.83	6	A
MICT	4°C x 8 días	0.33	6	A
MICB	4°C x 4 días	0	6	A
MICT	T° ambiente	0	6	A
MICB	T° ambiente	0	6	A
MICC	4°C x 4 días	0	6	A
MICC	T° ambiente	0	6	A
MICA	4°C x 4 días	0	6	A
MICB	4°C x 8 días	0	6	A
Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)				

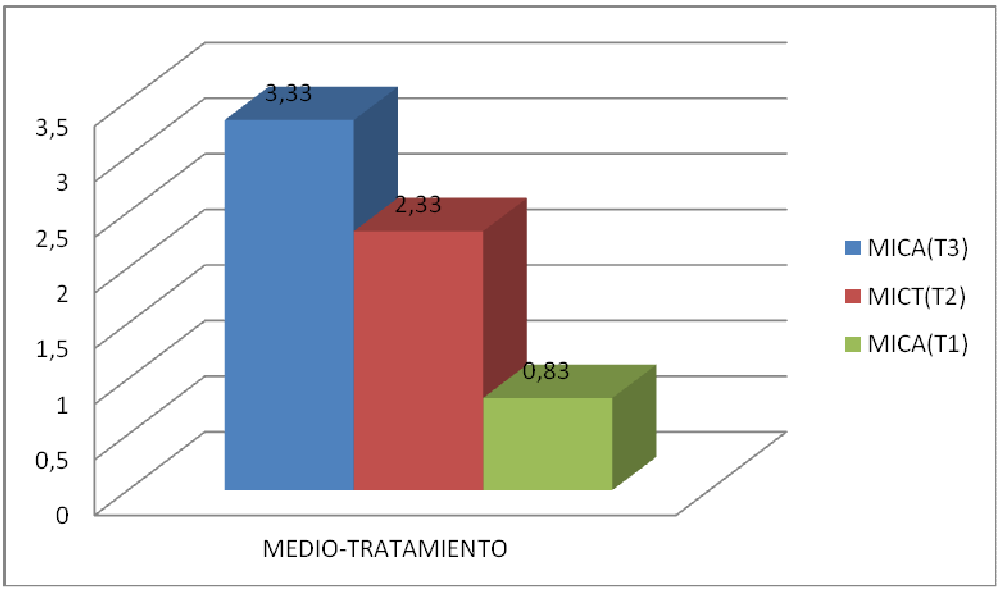


FIGURA 3. Contaminación por hongos en relación medios de cultivo / tratamiento.

4.1.1.3<u>Capacidad embriogénica.</u>

La capacidad embriogénica hace referencia a la facilidad que tiene un óvulo en transformarse en callo, debido a que esta es primordial en la embriogénesis somática.

Al realizar el análisis estadístico en lo que hace referencia a la capacidad embriogénica, se determinó que existe diferencia significativa entre los medios de cultivo y tratamientos. (Cuadro 10).

CUADRO 10. CAPACIDAD EMBRIOGENICA EN RELACIÓN A MEDIO DE CULTIVO/TRATAMIENTO.

Test: Duncan Alfa=0,05							
Error: 9,6194 g l: 60							
Medio	**Tratamientos**	**Medias**	**n**				
MICB	4°C x 8 días	16.5	6	A			
MICC	T° ambiente	9	6		B		
MICB	T° ambiente	6	6		B	C	
MICA	T° ambiente	5.17	6			C	
MICC	4°C x 8 días	3.67	6			C	D
MICA	4°C x 8 días	2.5	6			C	D
MICB	4°C x 4 días	0	6				D
MICT	4°C x 4 días	0	6				D
MICT	4°C x 8 días	0	6				D
MICT	T° ambiente	0	6				D
MICA	4°C x 4 días	0	6				D
MICC	4°C x 4 días	0	6				D
Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)							

Se determina que los óvulos provenientes de frutos tratados a T^o de 4^0C por 8 días (T3) implantados en el medio de Inducción de callo B (MICB: 1,5mg de 2,4D) presentaron porcentajes callo génico, con alta diferencia estadística significativa. La misma que se puede tomar como referencia para futuras investigaciones

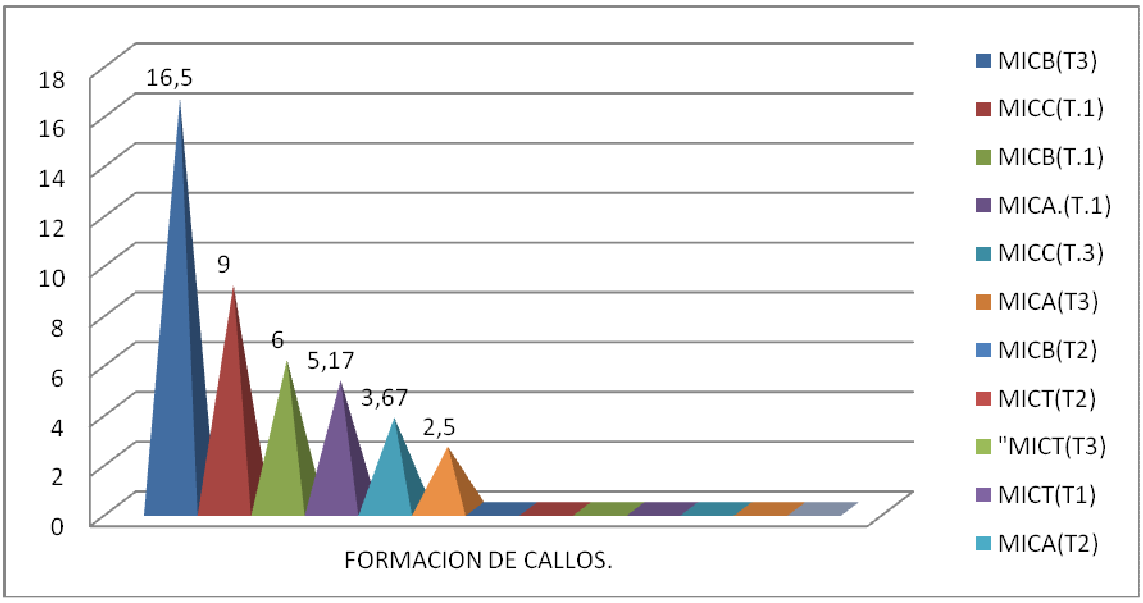


Figura 4. Capacidad Embriogénica, relación medio de cultivo/ tratamiento.

4.1.1.4 <u>Introducción in vitro de hojas.</u>

En la implantación de segmentos de hojas de babaco no fue posible evaluar la capacidad embriogénica ya que se presentó la pérdida del 100% por hongos y bacterias. El alto índice de contaminación de segmentos de hojas, se debió posiblemente a que las hojas fueron extraídas sin previo tratamiento a la introducción in vitro. (Cuadro 11)

CUADRO 11. CONTAMINACIÓN POR HONGOS Y BACTERIAS.

MEDIO DE CULTIVO	BACTERIAS	HONGOS
MICA	52.5	47.5
MICB	91.7	8.3
MICC	66	34
MICT	81.7	18.3

4.1.2 Mantenimiento de callos. ETAPA II

Transcurrida la primera etapa (21 días) el total de óvulos y callos fueron transferidos a los medios de mantenimiento de callo (MMC) A, B y C(Anexo 5)

La transferencia se realizó de un total de óvulos y callos, de cada tratamiento y medio de cultivo de la etapa I, dividiéndolo para los tres medios de cultivo; MMCA; MMCB y MMCC correspondiente a la etapa II. (Anexo 7 y 7.1)

En la segunda etapa se transfirieron tanto a los óvulos y callos a los medios de mantenimiento (MMC), donde se evaluaron las siguientes variables.

1.- Porcentaje de Contaminación por Hongos y bacterias.
2.- Porcentaje de callo génesis formados por tratamiento.

4.1.2.1 Contaminación por hongos.

En el cuadro 12 se observa el porcentaje de contaminación por hongos en relación a los tratamientos.

En el análisis estadístico de contaminación por hongos en la etapa II, demostró que no hay diferencia significativa, solo matemática (Cuadro 12).

CUADRO 12. CONTAMINACIÓN POR HONGOS ETAPA II

Test : Duncan Alfa: 0,05			
Error: 336,7402 gl: 33			
Ensayo	Medias	n	
4°C x 4 días	4.4	12	A
T° Ambiente	5.57	12	A
4°C x 8 días	13.99	12	A
Letras distintas indican diferencias significativas(p<=0,05)			

4.1.2.2 Contaminación por bacterias.

Se realizó el análisis estadístico en la etapa II concerniente a contaminación bacteriana en el relación a los medios de cultivo; los mismos que no presentaron diferencia significativa. En lo que trata a contaminación bacteriana/tratamiento si presentó diferencia significativa (Cuadro 13).

CUADRO 13. CONTAMINACIÓN POR BACTERIAS ETAPA II.

Test : Duncan Alfa: 0,05				
Error: 663,9107 gl: 33				
Ensayo	Medias	n		
4°C x 4 días	34.42	12	A	
4°C x 8 días	63.88	12		B
T° Ambiente	72.46	12		B
Letras distintas indican diferencias significativas(p<=0,05)				

4.1.2.3 <u>Mantenimiento de callos</u>. (Capacidad embriogénica).

En el análisis estadístico en lo que trató el porcentaje de callo génesis en la segunda etapa, no se observó diferencia significativa en relación a los medios de cultivo (Anexo 9) pero si se observó diferencia significativa en relación a los tratamientos. (Cuadro 14)

CUADRO 14. CALLOGENESIS O MANTENIMIENTO DE CALLO ETAPA II.

Test : Duncan Alfa: 0,05				
Error: 471,9482 gl: 33				
Ensayo	Medias	n		
.T° Ambiente	24.28	12	A	
.4°C x 4 días	37.82	12	A	B
.4°C x 8 días	43.69	12		B
Letras distintas indican diferencias significativas(p<=0,05)				

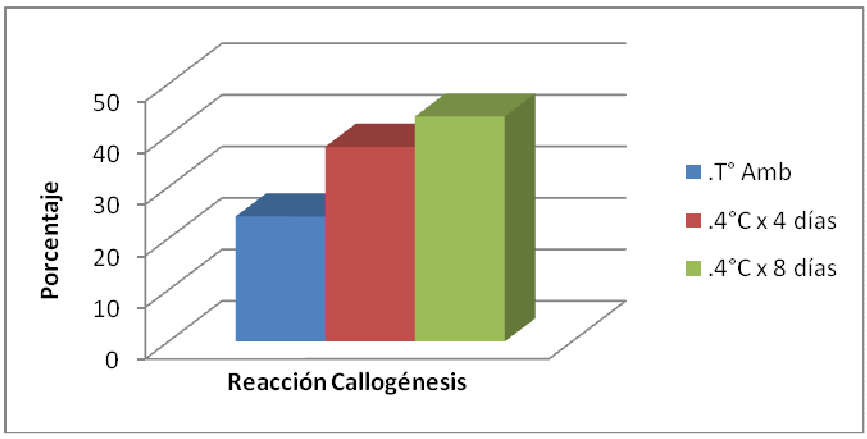


Figura 5. Capacidad embriogénica en relación a los tratamientos.

CAPITULO V.

CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación, se observó capacidad embriogénica en óvulos de babaco, cumpliendo la hipótesis planteada, en lo que se refiere a hojas de babaco no se cumplió con la hipótesis debido a que se presento contaminación del 100%.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante todo el proceso del desarrollo de la capacidad embriogénica de óvulos y hojas de babaco se concluye:

1. En la introducción in vitro de segmento de hojas, no se obtuvo resultados favorables, se presentó una contaminación del 100% por bacterias y hongos. Posiblemente porque a las plantas donadoras de hojas no se le proporcionó un tratamiento fitosanitario previo. En la contaminación de hongos y bacterias en la introducción in vitro de óvulos de babaco, no presentó diferencia significativa pero si matemática, en relación a los medios de cultivo y tratamiento.

2. El mejor medio de cultivo para la inducción de callos fue el MICB y el tratamiento 3 (óvulos de frutos sometidos a temperatura de 4^{o}C por 8 días) con una media de 16,5 de formación de callos.

3. Alternativamente el segundo medio de cultivo se puede utilizar para la inducción de callos en la primera etapa, siendo el MICC, Temperatura ambiente.

RECOMENDACIONES.

1.- Se recomienda, partir de plantas madres bien seleccionadas y minuciosamente tratadas (tratamientos fitosanitarios), de tal manera que constituyen mayor garantía para futuras investigaciones.

2.- Se recomienda utilizar antibiótico, como la gentamicina (máximo a concentración de 8mg/l) para el control de bacterias en las diferentes etapas del cultivo, evitando así perdidas de materiales in vitro.

3.- Proyectar a la brevedad posible como políticas investigativas in vitro de plantas de babaco para el agricultor, totalmente certificadas para efectos de cubrir una necesidad de protección a los problemas fundamentales de fusariosis, bacteriosis, virosis y resistencia a nematodos.

CAPITULO VI.

PROPUESTA.

APLICACIÓN DE GENTAMICINA EN LA INTRODUCCIÓN IN VITRO DE ÓVULOS DE BABACO (Vasconcellea x heilborni).

6.1 Datos informativos.

Ejecutor:	Ing. Norma Quillay.
Institución:	Universidad Técnica de Ambato
Localización Geográfica:	Provincia: Tungurahua.
	Cantón: Ambato
Participantes Beneficiarios.	INIAP. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
	UTA. Universidad Técnica de Ambato.
Duración del Proyecto:	Octubre 2011- Octubre 2012
Fecha estimada de Inicio.	Octubre 2011
Fecha estimada de finalización:	Octubre 2012
Naturaleza o tipo de Proyecto:	Investigativo.

6.2 Antecedentes de la propuesta.

Esta propuesta se fundamenta en los siguientes trabajos de investigación.

6.2.1 Quillay N. (2011) indica que en la capacidad embriogénica de babaco (Vasconcellea x heilbornii) a partir de óvulos y hojas multiplicadas in vitro vía

embriogénesis somática, a los que se les sometió a tres tratamientos e introducidos en cuatro medios de cultivo para la inducción de callos. Como resultado tenemos que el tratamiento 3 (óvulos provenientes de frutos sometidos a temperatura de 4^{o}C por 8 días) introducido en medio MICB (ANA 500ul, 2,4D 1,5 mg/l) es el que presenta diferencia significativa en la inducción de callos en un total de 16.5.

6.2.2 INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria 1997). En el Crecimiento in vitro de especies vegetales como es el babacoindican que el objetivo fue determinar los medios de cultivo y condiciones de crecimiento in vitro de especies de importancia. En este ciclo agrícola se han realizado trabajos de cultivo in vitro de babaco.

Para la introducción in vitro de babaco se utilizaron explantes provenientes del campo. Los explantes se someten a un proceso de lavado y desinfección en el laboratorio. Los medios de cultivo contienen sales de Murashige y Skoog, suplementado con auxinas y citoquininas, adicionando Sucrosa y agar para darle consistencia al medio de cultivo. Los tubos se colocan en un cuarto de cultivo, con temperatura de 18 +- 2^{O} C, con un fotoperiodo de 16 horas.

En cuanto a babaco, se han realizado algunos ensayos para la introducción in vitro, pero los resultados no han sido favorables, se ha presentado contaminación por bacterias, hongos y también levaduras, lo que no ha permitido el desarrollo del explante para su correspondiente micropropagación.

6.2.3 Alvarado C. et., al ((2003).Manifiesta que al evaluar la detección temprana (BIOVEG, 2003) y el uso de antibióticos como métodos para la prevención y el

control de la contaminación bacteriana en el cultivo de plantas *in vitro* de caña de azúcar se demostró que su uso puede ser factible. En el primer caso, la modificación del medio de cultivo para la multiplicación de las plantas *in vitro* por la adición de Agua de Coco (100,0mL.L^{-1}) y extracto de levadura (250,0 mg.L^{-1})resultaron las mejores opciones para incrementar la expresión del crecimiento bacteriano sin efectos negativos sobre las mismas. Además, el aumento del pH inicial a 6,5 es otra alternativa para detectar precozmente la presencia de bacterias contaminantes en líneas de plantas *in vitro.* Por otra parte, el tratamiento de los explantes en la fase de establecimiento con Sulfato de GENTAMICINA o la incorporación de este antibiótico al medio de cultivo para la multiplicación de las plantas *in vitro* a concentraciones hasta 8,0mg.L^{-1} pudieran ser utilizados para el control de los contaminantes bacterianos.

6.3 Justificación.

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana.
Hoy en día la contaminación es uno de los principales y más severos problemas para los micro propagadores de plantas en el mundo, es un fenómeno multicausal que debe tenerse en cuenta desde la concepción misma de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

Los microorganismos provocan pérdidas cuantiosas de material vegetal en los procesos productivos o de investigación. En las zonas tropicales, si no se tiene en cuenta, este problema puede alcanzar proporciones incalculables porque las condiciones climáticas favorecen el desarrollo y multiplicación de los microorganismos.

Como alternativa para controlar la contaminación microbiana en el cultivo in vitro se propone el empleo de sustancias antimicrobianas para el control de la contaminación. Entre los antibióticos y fungicidas más empleados se encuentran: cefotaxima (claforan), rifampicina, **gentamicina** anfotericin B, Benomil, y carbendazim (Silva y col., 1988; Debergh y col., 1993; George, 1993 citado por Gómez, R. 1998).

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro. Actúa sobre bacterias gramnegativas aerobias, incluyendo enterobacteriáceas, *Pseudomonas* y *Haemophilus.* Actúa también sobre estafilococos (*Staphylococcusaureus* y *Staphylococcusepidermidis*) incluyendo cepas productoras de penicilinasa, tiene actividad muy limitada sobre estreptococos. Carece de actividad sobre bacterias anaerobias.

6.4 Objetivos.

6.4.1 <u>Objetivo general.</u>

Controlar y reducir el porcentaje de contaminación de óvulos de babaco sembrados in vitro en sus diferentes fases.

6.4.2 Objetivos Específicos

- Realizar la inducción de callos en el MICB en óvulos provenientes de frutos tratados a 4^{o}C por 8 días utilizando Gentamicina.

- Reducir porcentaje de contaminación bacteriana en la etapa de inducción de callos.

6.5 Análisis de factibilidad.

Al controlar la contaminación bacteriana con el uso de gentamicina en el cultivo in vitro, permite realizar un seguimiento adecuado de la capacidad embriogénica de óvulos de babaco sin pérdida de los callos formados en esta etapa, lo que es factible para futuras investigaciones, esto facilitará el alcance del desarrollo de todas las etapas de la embriogénesis somática con la finalidad de obtener embriones somáticos.

6.6. Fundamentación.

6.6. 2 Propagación

Fabara J. et al (1985). El babaco se puede reproducir solamente por vía asexual o vegetativa, debido a que posee un fruto partenocárpico, es decir que no produce semilla.

Se propaga a través de estacas en vivero, la plantación se realiza cuando las plantas tienen de 30 a 40 cm de altura. El tiempo que generalmente se demora en alcanzar dicha altura es de 60 a 70 días luego de haber sido sembrada.

Los métodos más utilizados para la propagación son por estaca, brotes tiernos, injertos y el cultivo in vitro.

6.6.3 Cultivo in vitro

Usui K., et al (1996) El cultivo *in vitro* se basa en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células son autosuficientes y que en principio tienen la capacidad de regenerar una planta completa (Pierik, 1988). Las células de las plantas que se encuentran ya diferenciadas están determinadas y normalmente no se dividen. La división y desdifenciación de estas células puede inducirse si se colocan porciones de tejido (explantes) en un medio de cultivo adecuado que contenga los nutrientes y los aditivos necesarios. Mediante el uso de citokininas y auxinas se puede obtener respuesta en los explantes y manipulando la proporción de estos dos

reguladores de crecimiento, los explantes pueden desarrollar plantas directamente o bien callos que posteriormente se diferencian aleatoriamente en tejidos vasculares (brotes y/o raíces).

El cultivo *in vitro* se utiliza para realizar estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica
general; para la obtención de plantas libres de patógenos; para la conservación de germoplasma; para la producción de metabolitos secundarios; para la mejora genética mediante la inducción de mutaciones, la selección *in vitro* o la hibridación somática; para la introducción de nuevas características en las plantas mediante ingeniería genética y para la propagación masiva de plantas.

La micropropagación es una alternativa importante a la propagación de plantasconvencional. Los métodos utilizados son una extensión de los que ya se han desarrollado para la macropropagación. Implica la producción de plantas utilizando explantes como yemas apicales o laterales, segmentos de hoja, segmentos de raíz o protoplastos, en condiciones asépticas (libre demicroorganismos) en un recipiente donde se pueden controlar las condiciones ambientales y los nutrientes. Las plantas resultantes son en principio idénticas a los parentales de los que proceden.
La micropropagación puede abordarse cuando los métodos convencionales no son factibles debido a dificultades técnicas, tiempo de multiplicación muy largo, y/o el coste de producción es elevado. En la industria de la micropropagación el coste efectivo del proceso y la fidelidad genómica del resultado de los micropropágulos son dos hechos muy importantes a tener en cuenta.

6.6.4 Métodos de propagación vegetativa in vitro

Los métodos de propagación vegetativa que se seleccionen en la multiplicación *in vitro*
dependen de la planta que se vaya a multiplicar y de los objetivos finales del esquema de micropropagación. Se debe elegir el tejido del que se quiere partir para la micropropagación así como la forma de diferenciación y de regeneración de órganos. La mejor opción no es siempre la que mayor número de brotes produce. En este contexto, los métodos que dan lugar a plantas pasando por una fase de callo no se consideran ideales, ya que habitualmente se cree que se producen alteraciones genómicas en los regenerantes, durante la formación de los callos. La acumulación de las variaciones en las células cultivadas parece ser directamente proporcional a la duración del cultivo

Los métodos de propagación vegetativa en función del tejido que se ponga en cultivo (Pierik, 1988 citado por Usui K., et al 1996) se pueden clasificar en:

1. Cultivo de plantas intactas: siembra de una semilla *in vitro*, obteniéndose primero una plántula y finalmente una planta.
2. Cultivo de embriones: cultivo de embriones aislados después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.
3. Cultivo de meristemos y yemas terminales o laterales.
4. Cultivo de órganos aislados: raíces, anteras o bien porciones de tejidos u órganos aislados de la planta (explantes).
5. Cultivo de callo: cultivo de tejido desdiferenciado*in vitro* formándose órganos adventicios o embriones somáticos.

6. Cultivo de células aisladas de un tejido, un callo o un tejido en suspensión, obtenidas con la ayuda de enzimas o mecánicamente.
7. Cultivo de protoplastos que se obtienen por digestión enzimática de la pared celular.
8. Micro injerto.(Criollo, D. 2008)

La diferenciación *in vitro* puede producirse de forma organizada o mediante organogénesis. La organogénesis puede ser directa si se forma directamente del explante o indirecta si existe una etapa intermedia y se forma a partir de callos.

La diferenciación organizadase produce normalmente a partir de semillas, de embriones zigóticos, de meristemos, de microinjertos o de yemas laterales o terminales. El desarrollo a partir de estos explantes ocurre normalmente de forma organizada, es decir, se mantiene la estructura de característica del órgano o de la planta. Se parece a la propagación vegetativa convencional mediante esqueje o estolones. Si no se destruye la estructura orgánica, la progenie es idéntica al material vegetal original. Normalmente, el cultivo de yemas apicales permite obtener mayor número de plántulas que el cultivo de yemas laterales si el cultivo se realiza en un medio sin hormonas pero estas diferencias se ven reducidas si se utilizan reguladores de crecimiento.

La morfogénesis implica la formación de órganos a partir de células somáticas de los tejidos de los órganos aislados. En la **organogénesis indirecta**, las células y/o los tejidos que se aíslan de una porción organizada de la planta, se desdiferencian en forma de callo. Si el callo se disgrega, se originan grupos de células (agregados), y/o células aisladas (cultivos en suspensión).

Se puede producir así la regeneración de brotes adventicios a partir de callos morfogenéticos o bien embriogénesis indirecta de callos embriogénicos o suspensiones celulares. El crecimiento no organizado se induce fundamentalmente mediante el uso de altas concentraciones de auxinas y/o citokininas en el medio nutritivo. La estabilidad genética de los cultivos no organizados es frecuentemente baja. En la **organogénesis directa**, las células de un órgano o tejido aislado se desdiferencian primero para posteriormente formar tejidos. A partir de estos se forman rápidamente órganos (raíces o brotes) o individuos completos (proembriones o embriones). Se produce de esta forma la regeneración de brotes a partir de explantes o bien embriogénesis directa. La estabilidad genética no es muy alta.

La regeneración puede ocurrir de forma adventicia o mediante embriogénesis somática.

Ambos tipos de regeneración pueden producirse mediante organogénesis directa o indirecta. La **organogénesis adventicia** supone la formación de órganos bien sean brotes vegetativos o raíces mediante un desarrollo unipolar de forma que siempre exista conexión entre los nuevos brotes y el tejido materno. La regeneración adventicia permite la obtención de mayor número de propágulos en menor cantidad de tiempo pero este método de regeneración depende de la capacidad de obtener plantas idénticas a las plantas madres. Se debe determinar la frecuencia de plantas que presentan variaciones. En algunos casos estas variaciones pueden ser beneficiosas para la obtención de nuevas

variedades o toleradas en caso de que la frecuencia sea baja y la eficiencia del sistema de multiplicación muy alta.

Gómez, R. (1998) Indica que la embriogénesis somáticaes el proceso en el cual las células somáticas se desarrollan para dar lugar a plantas diferenciadas pasando por los estados embriogénicos pero sin la fusión de gametos. Los embriones somáticos

proceden de células individuales, son bipolares y no están conectados al sistema vascular de la planta madre. Los embriones somáticos tienen la ventaja de ser verdaderos clones, y no quimeras, al proceder de una sola célula; además, se puede aumentar la eficiencia en la formación de plantas al producirse con menor número de pasos y en mayores cantidades con mayor uniformidad tanto morfológica como citológicamente. Los criterios para la identificación de los distintos estadios de desarrollo de los embriones somáticos.

Estadio globular: estructuras redondeadas sin cotiledones o brote apical formándose o proyectándose sobre el explante original.

Estadio corazón o torpedo: es el intermedio entre estadio globular y cotiledonar, toma forma de corazón debido al desarrollo de los cotiledones. Estadio cotiledonar: uno o más cotiledones están diferenciados.

6.6.7 Factores que afectan al desarrollo in vitro.

Begoa M. (1990) El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por el material vegetal y las condiciones físicas y químicas que se crean *in vitro.*
En el caso del **material vegetal,** influye la constitución genética de la planta, la edad de la planta, la edad del órgano o tejido, el estado fisiológico, el estado sanitario, así como la posición del explante dentro de la planta, el tamaño de la planta, el ambiente y las condiciones en el que se ha desarrollado la planta madre, el tipo de corte que se realice en el explante y la forma en la que se coloque el explante en el medio.

6.6.8 Problemas en el cultivo in vitro

Cada uno de los pasos necesarios en el proceso de micropropagación tiene sus problemas específicos, aunque algunos de ellos se pueden implicar dos o más estadios (Debergh y Read,1991 citado por Alonso M 2002). Los principales problemas en el cultivo *in vitro* son la contaminación de los explantes, la oxidación fenólica, la hiperhidricidad y la variación somaclonal.

6.6.9 Contaminación

Las contaminaciones pueden causar perdidas económicas muy importantes en la micropropagación. La contaminación más que matar a los explantes directamente invade el cultivo haciendo que el explante no sea apto para su micropropagación

La mayor parte de los contaminantes, en el cultivo de tejidos, proceden de la planta donadora. Al establecer los cultivos y dependiendo del explante que utilicemos, se pueden transmitir microorganismos de la superficie del explante o de su interior. Con el cultivo de meristemos y dependiendo del tamaño del mismo, se pueden eliminar la mayoría de los organismos pero, sin embargo, en el caso de hojas, peciolos y tallos casi todos los microorganismos en el tejido pueden transmitirse . Por lo tanto, es conveniente analizar las plantas de las que proceden los explantes en búsqueda de individuos limpios y rechazando aquellos que están contaminados fuertemente. La búsqueda de contaminaciones debe incluir análisis de los organismos que pueden crecer en el medio de cultivo y por otra parte los patógenos que infectan de forma específica al cultivo.

Los principales microorganismos asociados a las superficies de las plantas son hongos,
levaduras, bacteria y molicutes (fitoplasmas, espiroplasmas y organismos relacionados). Muchos de estos microorganismos se pueden eliminar mediante esterilizaciones superficiales. Los microorganismos endófitos que se pueden desarrollar en las plantas pueden ser virus, viroides, bacterias, micoplasmas y hongos y pueden afectar de forma inter o intracelular. Los microorganismos intercelulares son generalmente transmitidos mediante vectores o mediante el contacto entre plantas sanas e infectadas. Los microorganismos endógenos tanto intercelulares como intracelulares no se pueden eliminar mediante esterilizaciones y pueden desarrollarse en el medio de cultivo de las plantas aunque el crecimiento de algunos puede ser inhibido mediante altas concentraciones de sal o azúcar y el pH. Algunos

de estos microorganismos se expresan con rapidez y son fáciles de detectar mediante inspecciones rutinarias pero otros permanecen latentes hasta que las condiciones sean favorables como la transferencia de los explantes a un medio nuevo especialmente cuando se reduce la concentración de sales y de azúcar en el medio.

Se puede detectar la presencia de organismos cultivables mediante uso de medios específicos para hongos y bacterias.

Las plantas contaminadas pueden tratarse mediante termoterapia y/o cultivo de meristemos o también aplicando productos antifúngicos, antibióticos y antivíricos a las plantas durante el estadio 0 aunque en ocasiones estos compuestos químicos pueden tener efectos bioestáticos más que biocidas.Si las plantas se establecen axénicamente, las contaminaciones posteriores puedenproceder de una técnica poco adecuada o procedimientos que pueden ser potencialmentecontrolados como las malas prácticas en el laboratorio o infestación con insectos o ácaros. Las contaminaciones debidas a las técnicas o procedimientos de cultivo proceden del instrumental utilizado como levaduras que pueden sobrevivir la esterilización mediante alcohol, esporas de bacterias resistentes al calor como *Bacillus*que pueden sobrevivir altas temperaturas o bacterias que provienen del micro propagador. Los microorganismos pueden proceder también de un fallo en la campana de flujo laminar y de una esterilización insuficiente del medio de cultivo o del equipo.

Otros problemas del cultivo in vitro son: Oxidación fenòlica, hiperhidricidad (Vitrificacion), y variación somaclonal.

6.7. Metodología, modelo operativo.

En el presente trabajo, la modalidad de investigación es Descriptiva, de Campo, experimental y Bibliográfica. Permitiendo plantear una

hipótesis, elaborar diseño experimental, recolectar datos, analizarlo resultados, obtener conclusiones y elaborar un informe de la investigación.

6.8.Administración.

La elaboración y ejecución de este trabajo se realizará la con el fin de cumplir objetivos planteados. Para recolección de datos se usara registros donde permite realizar un seguimiento adecuado de la investigación.

6.8.1 Humanos.

- Investigador

6.8.2 Materiales:

Vegetal; frutos de Babaco

6.8.3 Materiales químicos

Medio MS, ANA, AIA, AG3, BA, GLUTAMINA, AGAR, SUCROSA.

6.8.4 Equipos de oficina.

- Computadora, impresora, papel.

6.8.5 Equipo de laboratorio.

- Autoclave, Balanza Analítica, Destilador de agua, Estero microscopio, Refrigeradora, Estufa, Platos calentadores, Mechero, Cristalería, Pinzas, Plato agitador.

6.9 Previsión de la evaluación.

Para la evaluación de los datos recolectados en la investigación se realizará mediante análisis estadísticos, con la Prueba de Duncan al 0,05%. La misma que determinará el cumplimiento satisfactorio o no, de los objetivos planteados

BIBLIOGRAFÍA.

1. ALVARES L. 2000 Recolección, Caracterización y Evaluación de papayas de altura, con énfasis en papayuelas. Departamento de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. Colombia. Consultado en Agosto 2011. Disponible en: http://ciagrope.tripod.com/

2. BENGOA M. 1990. Micropropagación de babaco (Carica x heilborniinmpentagona) Tesis Académico. Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. Chile. Consultado en Agosto 2011. Disponible en http://orton.catie.ac.cr

3. CASTILLO B. 2004. Determinar la capacidad Embriogénica de 22 clones de Cacao tipo Nacional multiplicados in vitro vía Embriogénesis Somática. Tesis de Grado. Biólogo. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Naturales. Escuela de Biología. Guayaquil –Ecuador. 101p.

4. CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR 2008. Soberanía alimentaria Art. 281. Consultado en Septiembre del 2011. Disponible en htpp://www.eueomecuador.org

5. CRIOLLO D. 2008. La microinjertación en babaco y chihualcán en patrones de papaya. Sangolquí – Ecuador. Consultado en Agosto 2011. Disponible en http://www.espe.edu.ec:8700

6. FABARA J. Bermeo N. Barbaran C. 1985. Manual del Cultivo del Babaco. Quito. Esquina Editores. 101 p.

7. GÓMEZ R. 1998. Cultivo de Células y Tejidos. Propagación y Mejoramiento Genética de plantas por Biotecnología. Volumen I. Villa Clara – Cuba. 390 p.

8. INIAP (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.) 1997. Crecimiento in vitro, especies vegetales: Mejía (Pichincha). Mora; CaricaPentagona; Solanumbetaceum: Cyphomandrabetacea; Pepino; Fitomejoramiento; Biotecnología; Cultivo de tejidos; Zona Fría. Ecuador. Consultado en Agosto 2011. Disponible en: http://orton.catie.ac.cr

9. JIMÉNEZ E. 1998. Generalidades del cultivo in vitro. Propagación y mejoramiento genética de plantas por Biotecnología. Volumen I. Cuba. pp. 13 – 55.

10. JORDÁN M., Vélez D., Armijos R.(2009)Biotecnologías aplicables al desarrollo de algunas especies de Caricáceas cultivadas en la región Andina avances y problemas. Consultada en Agosto 2011. Disponible en http://www.utpl.edu.ec

11. KANASTAKUNA Blog. 2011. Composición Química y valor energético del Babaco. Consultado. Agosto 2011. Disponible en:http://www.kanastakuna.com

12. MERINO D. 1989. El cultivo del babaco. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid. 84p.

13. MORILLO E., Escobar J., Taipe M. 2009. Catálogo Nacional de Laboratorios de Agrobiotecnología en el Ecuador. Publicación Miscelánea INIAP - IICA. Quito 103p.

14. MONTENEGRO F. 2009. Cultivo de babaco bajo invernadero. (en línea) Cotopaxi – Ecuador. Consultado en Agosto 2011. Disponible en: http://www.engormix.com

15. ORELLANA P., 1998. Propagaciónvía organogénesis; Mejoramiento Genético de plantas por biotecnología. Cuba. pp. 151-175

16. ORELLANA R. 2001. Dinámica del crecimiento y caracterización pomológica del fruto de 12 accesiones de Vasconcelleae x heilbornii; recolectadas en el Austro, colección ex – situ del INIAP, granja Bullcay, Gualaceo; Tesis de Grado. Master. Universidad Técnica de Ambato. 103 p

17. PÉREZ N. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Ediciones GEO. Cuba. 400p.

18. SORIA N. y Viteri P., 1999. Guía para el Cultivo de Babacoen el Ecuador. Ambato. 48p.

19. UCE. (Universidad Central del Ecuador) 2007. Facultad de Ciencias Agrarias. Obtención de semilla artificial de inchi – Caryodendronorinocense – y babaco – Caricapentagona- mediante embriogénesis somática. Consultado en Agosto 2011. Disponible en: http://www.soccolhort.com

20. USUI K., Okabe K., Victores R., Ramírez A.1996. Principios Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Guatemala. 90 p.

21. VACA I., Landásuri A., Falconi E. y Soria N. 2010. ESPE – IASA. Incremento de número de brotes de babaco. Ecuador. Consultado en Agosto 2001. Disponible en http://agrytec.como

22. VEGA, R. y KittoS. 2001. Regeneración del Babaco; Biotecnología Agraria, un enfoque hacia el mejoramiento de plantas. Bogotá, D.C. – Colombia Editora Guadalupe Ltda. pp. 170 – 176.

23. VEGAS A., Trujillo G., Sandrea Y., Mata J. 2003. Apomixis, Poliembrionía Somática y Cigótica in vitro en Lechosa. Venezuela. Consultado en Agosto 2011. Disponible en http://www.scielo.org.ve

24. III CENSO AGROPECUARIO DEL ECUADOR. 2001. Consultado en Agosto 2011. Disponible en http://www.agroecuador.com

ANEXOS

ANEXO 1

GLOSARIO.

ADN. Acido desoxirribonucleico, frecuentemente abreviado como **ADN** (y también **DNA**, del inglés *deoxyribonucleicacid*), es un tipo de ácido nucleído, una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.

Partenocarpia Formación de un fruto sin previa fecundación. Estos frutos carecen de semillas. Ej.: Banana, Babaco. Fenómeno por el cual se forman frutos sin una fecundación previa. Por este motivo no se producen semillas o bien éstas son estériles.

Reproducción asexual. también llamada **reproducción vegetativa**, consiste en que de un organismo se desprende una sola célula o trozos del cuerpo de un individuo ya desarrollado, que por procesos mitóticos, son capaces de formar un individuo completo genéticamente idéntico a él. Se lleva a cabo con un solo progenitor y sin la intervención de los núcleos de las células sexuales o gametos.

Totipotencia celular. Del latín *totuspotens*, "totus" (todo) y "potens" (poder o habilidad), el término **célulatotipotencial** es utilizado en biología para referirse a células que poseen la capacidad de dar origen a varios otros tipos celulares, incluso pudiendo una sola de estas células dar origen a millones de células, tejidos, órganos, hasta incluso embriones.

Ovulo vegetal. Elemento en las plantas que contienen los GAMETOFITOS femeninos.

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. La síntesis de auxinas se ha identificado en diversos organismos como plantas superiores, hongos, bacterias y algas, y casi siempre están relacionadas con etapas de intenso crecimiento.

Células somáticas son aquellas que forman el crecimiento de tejidos y órganos de un ser vivo, procedentes de células madre originadas durante el desarrollo embrionario y que sufren un proceso de proliferación celular y apoptosis.

Callo. En la investigación y la biotecnología biológicas, un **callo de células** (también denominado **callus**, o **calli**), es una masa de células no diferenciadas.

Embriogénesis vegetal. Es el conjunto de procesos fisiológicos que conducen a la transformación de una sola célula, el cigoto, en un individuo multicelular más complejo -el embrión- contenido en la semilla madura. Requiere de fina regulación de multitud de elementos de desarrollo, que conducen a la elaboración de morfologías básicas (morfogénesis), el establecimiento de estructuras funcionalmente organizadas (organogénesis) y la diferenciación tisular. Además, debe generar las estructuras elementales de crecimiento activo en los sistemas modulares que son las plantas, esto es, los meristemos, así como las funciones necesarias para la ulterior supervivencia del embrión, como son la quiescencia y la germinación.[1]

Micropropagación es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades.[1] La micropropagación se utiliza para multiplicar o propagar plantas nuevas, tales como aquellas creadas por ingeniería genética, muta génesis o mejoramiento genético. Se utiliza también la micropropagación para obtener plantas libres de enfermedades (tales como virosis) u obtener grandes cantidades de plantas que no se propagan eficientemente.

Bacteria. son microorganismosunicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm, por lo general) y diversas formas incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirilos). Las bacterias son procariotas y, por lo tanto, a diferencia de las célulaseucariotas (de animales, plantas, etc.), no tienen el núcleo definido y presentan orgánulos internos de locomoción. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles.

Hongo. Los hongos no son plantas ni animales, aunque se parezcan en algunas de sus características tanto a las unas como a los otros. A las plantas, por ser organismos sedentarios que se encuentran fijos a un sustrato y, mientras están vivos, no cesan de crecer. A los animales, pues, aunque las células de los hongos poseen pared como las de las plantas, las paredes celulares fúngicas son ricas en quitina, la misma sustancia que hace duro el esqueleto externo de los insectos.

Hibrido. Es el organismo vivo animal o vegetal procedente del cruce de dos organismos de razas, especies o subespecies distintas, o de alguna o más cualidades diferentes

Hormonas. son sustancias secretadas por células especializadas, localizadas en glándulas de secreción interna o glándulas endocrinas (carentes de conductos), o también por células epiteliales e intersticiales con el fin son las de afectar la función de otras células. También hay hormonas que actúan sobre la misma célula que las sintetizas (autocrinas). Hay algunas hormonas animales y hormonas vegetales como las auxinas, ácido abscísico, citoquinina, giberelina y el etileno

Induccion la iniciación o causa de un cambio o proceso, en el cual un tejido o parte del cuerpo provoca la diferenciación de otro tejido o parte del cuerpo.

Macro nutrientes. Los elementos químicos que los humanos consumen en grandes cantidades para el crecimiento de los vegetales como el Nitrógeno, Fosforo, Potasio, calcio y Azufre.

Micronutrientes. Sustancias que el organismo de los seres vivos necesita en pequeñas dosis. Son indispensables para los diferentes procesos bioquímicos y metabólicos de los organismos vivos y sin ellos morirían. Y son hierro, cloro, cobre, manganeso, zinc, molibdeno y boro.

Solución. Mezclahomogénea de dos o más sustancias. La sustancia disuelta se denomina soluto y está presente generalmente en pequeña cantidad en comparación con la sustancia donde se disuelve denominada disolvente o solvente.

Tejidos. Son aquellos materiales constituidos por un conjunto organizado de células, con sus respectivos organoides iguales o de unos pocos tipos de diferencias entre células diferenciadas de un modo determinado, ordenadas regularmente, con un comportamiento fisiológico coordinado y un origen embrionario común.

Vitaminas. Son compuestos heterogéneos imprescindibles para la vida, que al ingerirlos de forma equilibrada y en dosis esenciales promueven el correcto funcionamiento fisiológico. La mayoría de las vitaminas esenciales no pueden ser sintetizadas (elaboradas) por el organismo, por lo que éste no puede obtenerlas más que a través de la ingesta equilibrada de vitaminas contenidas en los alimentos naturales. Las vitaminas son nutrientes que junto a otros elementos nutricionales actúan como catalizadoras de todos los procesos fisiológicos (directa e indirectamente).

Protocolo. Plan escrito y detallado de un experimento científico, un ensayo clínico o una actuación médica.

Limbo foliar, parte plana y visible de la hoja; generalmente ancha, recorrida por los nervios y sostenida por el pecíolo.

Lóbulo. Cada una de las partes, a manera de ondas, que sobresalen en el borde de una cosa.

Nervadura. es la distribución de los nervios que componen el tejido vascular de la hoja de una planta. Se ubican en el estrato esponjoso del mesófilo de la hoja; a través de ellos circula la savia, comunicando los órganos de la hoja con el resto de la planta

Aristas, junto con los vértices, forman los elementos principales con los que trabaja esta disciplina, siendo consideradas las aristas las uniones entre nudos o vértices.

Microorganismo, también llamado microbio, es un ser vivo que sólo puede visualizarse con el microscopio. La ciencia que estudia a los microorganismos es la microbiología. «micro» del griegoμικρο (diminuto, pequeño) y «bio» del griego βιος (vida) *seres vivos diminutos*. Son organismos dotados de individualidad que presentan, a diferencia de las plantas y los animales, una organización biológica elemental. En su mayoría son unicelulares, aunque en algunos casos se trate de organismos cenóticos compuestos por células multinucleadas, o incluso multicelulares.

Fisiología. Conocimiento, estudio es la ciencia biológica que estudia las funciones de los seres orgánicos.

Biotecnología es la tecnología basada en la biología, especialmente usada en agricultura, farmacia, ciencia de los alimentos, medioambiente y medicina.

UPAs. Unidades de Producción Agrícola.

ANEXO 2.

TABLA 1. CENSO AGROPECUARIO 2001: SUPERFICIE, PRODUCCIÓN Y VENTAS, SEGÚN CULTIVOS PERMANENTES

CULTIVOS PERMANENTES		SUPERFICIE PLANTADA (Hectáreas)	SUPERFICIE EN EDAD PRODUCTIVA (Hectáreas)	SUPERFICIE COSECHADA (Hectáreas)	PRODUCCIÓN (Tm.)	VENTAS (Tm.)
TOTAL AZUAY	Solo	7,685	7,014	6,769		
	Asociado	6,029	5,819	5,520		
Aguacate	Solo	30	*	*	*	*
	Asociado	227	215	183	40	30
Babaco	Solo	*	*	*	*	*
	Asociado	54	50	50	11	11
Banano	Solo	1,379	1,327	1,220	1,792	890
	Asociado	1,039	1,025	1,020	1,171	815
Cacao	Solo	2,577	2,447	2,437	362	308
	Asociado	708	688	687	49	25
Café	Solo	89	88	88	*	*
	Asociado	567	553	497	14	11
Caña de azúcar otros usos	Solo	2,588	2,328	2,260	.	.
	Asociado	341	331	319	.	.
Chirimoya	Solo	*	*	*	*	*
	Asociado	72	71	68	41	24
Claudia	Solo	*	*	*	*	*
	Asociado	339	335	318	292	275
Durazno	Solo	*	*	*	*	*
	Asociado	450	442	393	397	375
Granadilla	Solo	*	*	*	*	*
	Asociado	89	86	79	45	35
Guaba	Asociado	85	82	55	30	24
Limón	Solo	38	36	36	36	33
	Asociado	186	164	163	49	28
Mandarina	Solo	*	*	*	*	*
	Asociado	131	120	119	33	21
Manzana	Solo	90	80	72	190	165
	Asociado	551	539	505	558	506
Mora	Solo	69	67	65	114	110
	Asociado	123	122	121	152	150
Naranja	Solo	36	33	*	*	*
	Asociado	289	279	273	81	50
Pera	Solo	*	*	*	*	*
	Asociado	204	200	187	167	159
Plátano	Solo	128	117	117	112	103
	Asociado	66	53	53	37	27
Tomate de árbol	Solo	533	376	352	1,735	1,657
	Asociado	206	184	174	174	153
Otros permanentes	Solo	77	63	63		
	Asociado	303	278	256		

TABLA 2. NÚMERO DE UPAs POR TAMAÑOS Y SUPERFICIE PLANTADA, SEGÚN CULTIVOS PERMANENTES SOLOS (MONOCULTIVOS) CENSO AGROPECUARIO 2001

CULTIVOS PERMANENTES SOLOS (MONOCULTIVOS)		TOTAL	TAMAÑOS DE UPA									
			Menos de 1 hectárea	De 1 hasta menos de 2 has.	De 2 hasta menos de 3 has.	De 3 hasta menos de 5 has.	De 5 hasta menos de 10 has.	De 10 hasta menos de 20 has.	De 20 hasta menos de 50 has.	De 50 hasta menos de 100 has.	De 100 hasta menos de 200 has.	De 200 hectáreas y mas
TOTAL AZUAY	Hectáreas	7,685	170	296	338	679	1,241	1,379	1,827	844	505	406
Aguacate	UPAs	57	15	4	6	22	4	*	*	4	.	.
	Hectáreas	30	*	*	*	*	*	*	*	*	.	.
Babaco	UPAs	192	61	28	35	21	*	27	*	*	.	*
	Hectáreas	*	*	*	*	*	*	*	*	*	.	*
Banano	UPAs	1,442	157	105	111	116	248	280	270	104	34	17
	Hectáreas	1,379	*	*	57	95	145	420	278	258	50	35
Cacao	UPAs	666	134	93	36	78	107	55	101	41	12	10
	Hectáreas	2,577	21	84	60	180	444	219	1,013	254	59	242
Café	UPAs	160	16	20	11	35	35	17	11	*	8	*
	Hectáreas	89	*	*	*	*	*	21	*	*	*	*
Caña de azúcar para otros usos	UPAs	2,335	497	280	212	225	349	400	175	137	45	15
	Hectáreas	2,588	54	98	106	203	454	567	389	246	362	108

ANEXO 3 Determinación de la Capacidad Embriogénica de Babaco (Vasconcellea x heilborni)

Material: Óvulos Número de Ensayo: 1

Fecha de Instalación: 30 de Mayo Responsable: Ing. Norma Quillay.

REGISTRO DE DATOS 1

Medio	Tratamiento	# Caja	Ovul/Siembra	fecha/Siem	Fecha	No. Dias	Bacterias	Hongo	Total Óvulos
MICA	1	1	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICA	1	2	20	30-May	06-Jun	7 dias	6	0	14
MICA	1	3	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICA	1	4	20	30-May	06-Jun	7 dias	3	0	17
MICA	1	5	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICA	1	6	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICB	2	7	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICB	2	8	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICB	2	9	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICB	2	10	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICB	2	11	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICB	2	12	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICC	3	13	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICC	3	14	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICC	3	15	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICC	3	16	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICC	3	17	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICC	3	18	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICT	4	19	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICT	4	20	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICT	4	21	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICT	4	22	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICT	4	23	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20
MICT	4	24	20	30-May	06-Jun	7 dias	0	0	20

ANEXO 4

Determinación de la Capacidad Embriogénica de Babaco (Vasconcellea x heilborni)

Material: Óvulos Número de Ensayo: 1

Fecha de Instalación: 30 de Mayo Responsable: Ing. Norma Quillay.

REGISTRO DE DATOS 2

N trat	Caja	Medios mantenimiento	Fecha	Fechas obs	Número días	T ovul + Callos	Total Ovul	No. callos vivos	Total perd
1	1	MMCA	1	13-Jun	22	15	12	3	0
1	2	MMCA	1	13-Jun	22	15	12	3	0
1	1	MMCB	1	13-Jun	22	15	15	0	0
1	2	MMCB	1	13-Jun	22	15	14	1	0
1	1	MMCC	1	13-Jun	22	18	6	9	0
1	2	MMCC	1	13-Jun	22	18	17	1	0
2	1	MMCA	1	13-Jun	22	19	15	3	0
2	2	MMCA	1	13-Jun	22	16	18	1	0
2	3	MMCA	1	13-Jun	22	11	16	0	0
2	1	MMCB	1	13-Jun	22	16	9	2	0
2	2	MMCB	1	13-Jun	22	16	13	3	0
2	1	MMCC	1	13-Jun	22	15	13	3	0
2	2	MMCC	1	13-Jun	22	15	15	0	0
3	1	MMCA	1	13-Jun	22	15	12	3	0
3	2	MMCA	1	13-Jun	22	14	10	5	0

ANEXO 5Componentes de los diferentes medios de cultivo utilizados en la Evaluación de la Capacidad Embriogénica de Babaco. EET. Pichilingue INIAP. 2011.

ETAPA	**MEDIO : MICA**	**MEDIO : MICB**	**MEDIO: MICC**	**MEDIO:MICT TESTIGO.**
INDUCCION DE CALLOS (MIC)	MS: Completo. Glutamina 400mg/l, ANA 500ul/l. **2,4D 0,5mgl/l**. Fitagel: 2,2g/l Piridoxina:0,5mg/l Tiamina: 0,4mg/l A., Nicotínico 0,5mg/l Sacarosa: 30g/l PH. 5,7	MS: Completo. Glutamina 400mg/l, ANA 500ul/l. **2,4D 1,5mg/l.** Fitagel: 2,2g/l Piridoxina:0,5mg/l Tiamina: 0,4mg/l A., Nicotínico 0,5mg/l Sacarosa: 30g/l PH. 5,7	MS: Completo. Glutamina 400mg/l, ANA 500ul/l. **2,4D 2,5mg/l.** Fitagel: 2,2g/l Piridoxina:0,5mg/l Tiamina: 0,4mg/l A., Nicotínico 0,5mg/l Sacarosa: 30g/l PH. 5,7	MS: Completo. Glutamina 400mg/l, Fitagel: 2,2g/l Piridoxina:0,5mg/l Tiamina: 0,4mg/l A.,Nicotínico 0,5mg/l Sacarosa: 30g/l PH. 5,7
	MEDIO: MMCA	MEDIO : MMCB	MEDIO: MMCC	
MEDIO DE MANTENIMIENTO DE CALLOS (MMC)	MS: Completo. Glutamina 400mg/l, Fitagel: 2,2g/l Sacarosa: 30g/l BA: 0,1mg/l (1000ul) PH. 5,7	MS: Completo. Glutamina 400mg/l, Fitagel: 2,2g/l Sacarosa: 30g/l BA: 0,2mg/l (2000ul) PH. 5,7	MS: Completo. Glutamina 400mg/l, Fitagel: 2,2g/l Sacarosa: 30g/l BA: 0,3mg/l (3000ul) PH. 5,7	
	MEDIO: MDE	MEDIO : ME		
DESARROLLO DE EMBRION (MDE)	MS. 1/2: SACAROSA 30G/L; Carbón activado 2g/l; Caseina Hidrolizada (CH)200mg/l; AIA 0,5mg/l Fitagel: 2,2g PH 5,7	ETAPA. EMBRION.	MS; Completo CH :500MG/L SACAROSA 30g/l; BA 1mg/l; Fitagel: 2,2g/l PH. 5,7	

ANEXO 6. Total de óvulos introducidos in vitro por tratamiento y medio de cultivo.

TRATAMIENTO	MEDIO	T. Óvulos	TRATAMIENTO	MEDIO	T. Óvulos
T1	MICA	120	T2	MICA	120
T1	MICB	120	T2	MICB	120
T1	MICC	120	T2	MICC	120
T1	MICT	120	T2	MICT	120
TOTAL OVULOS /TRAT.		120	TOTAL OVULOS /TRAT.		120
TRATAMIENTO	**MEDIO**	**T. Óvulos**	**TRATAMIENTO**	**MEDIO**	**SEG. HOJAS**
T3	MICA	120	T	MICA	120
T3	MICB	120	T	MICB	120
T3	MICC	120	T	MICC	120
T3	MICT	120	T	MICT	120
TOTAL OVULOS /TRAT.		120	TOTAL HOJAS/TRAT.		120

ANEXO 8. CUADRO COMPARATIVO DE TRATAMIENTOS (OVULOS /CALLOS) ETAPA INTRODUCCION.

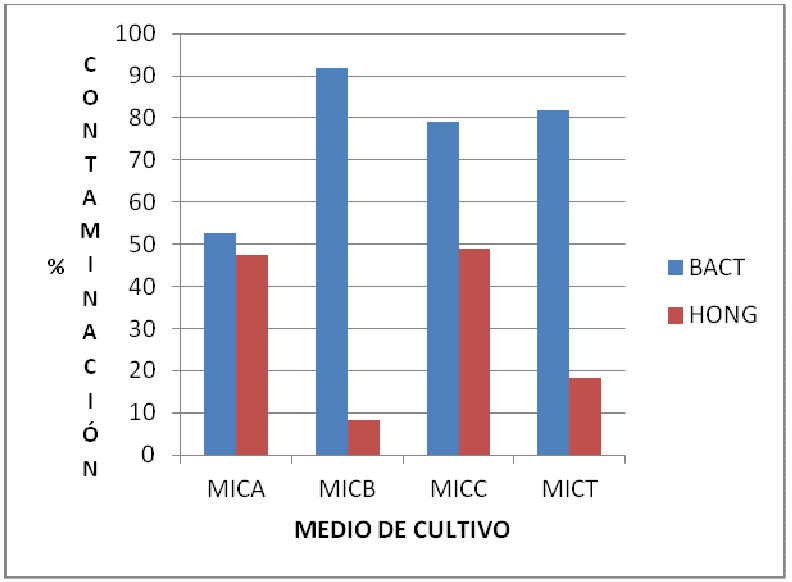
Tratamiento 1					Tratamiento 2					Tratamiento 3					TOTAL.	
T1.Temperatura Ambiente por 0 dias					T2. Temperatura 4 C por 4dias					T3. Temperatura 4 C por 8dias						
Siembra. 22 de Mayo.					Siembra. 26 de Mayo.					Siembra. 30 de Mayo.						
Medio de Inducción de callo	No. Óvulos/ Siembra	No.callos. Final de Etapa	Total Óvulos	Total Óvulos /Callos	Medio de Inducción de callo	No. Óvulos/ Siembra	No.callos. Final de Etapa	Total óvulos	Total Óvulos/Callos	Medio de Inducción de callo	No. Óvulos/ Siembra	No.callos. Final de Etapa	Total Óvulos	Total Óvulos/Callos	suma	Suma Callos
MICA	20	0	0	0	MICA	20	6	14	20	MICA	20	6	6	12	12	68
MICA	20	3	13	16	MICA	20	10	10	20	MICA	20	0	0	0	13	
MICA	20	3	17	20	MICA	20	10	10	20	MICA	20	0	0	0	13	
MICA	20	1	19	20	MICA	20	2	3	5	MICA	20	0	0	0	3	
MICA	20	9	11	20	MICA	20	0	0	0	MICA	20	7	13	20	16	
MICA	20	1	19	20	MICA	20	8	12	20	MICA	20	2	5	7	11	
MICB	20	3	17	20	MICB	20	8	12	20	MICB	20	11	8	19	22	**119**
MICB	20	1	7	8	MICB	20	9	11	20	MICB	20	11	9	20	21	
MICB	20	2	18	20	MICB	20	6	14	20	MICB	20	11	9	20	19	
MICB	20	3	17	20	MICB	20	10	10	20	MICB	20	0	0	0	13	
MICB	20	2	18	20	MICB	20	0	0	0	MICB	20	14	6	20	16	
MICB	20	5	15	20	MICB	20	8	12	20	MICB	20	15	5	20	28	
MICC	20	5	15	20	MICC	20	0	0	0	MICC	20	6	9	15	11	68
MICC	20	9	11	20	MICC	20	5	15	20	MICC	20	5	10	15	19	
MICC	20	3	17	20	MICC	20	4	16	20	MICC	20	4	1	5	11	
MICC	20	6	14	20	MICC	20	2	18	20	MICC	20	3	17	20	11	
MICC	20	3	17	20	MICC	20	3	17	20	MICC	20	2	18	20	8	
MICC	20	2	18	20	MICC	20	4	16	20	MICC	20	2	18	20	8	
MICT	20	8	12	20	MICT	20	0	0	0	MICT	20	0	10	10	8	59
MICT	20	4	16	20	MICT	20	10	10	20	MICT	20	0	18	18	14	
MICT	20	6	14	20	MICT	20	8	12	20	MICT	20	0	0	0	14	
MICT	20	7	13	20	MICT	20	6	14	20	MICT	20	0	16	16	13	
MICT	20	4	16	20	MICT	20	6	14	20	MICT	20	0	20	20	10	
MICT	20	4	16	20	MICT	20	5	15	20	MICT	20	0	20	20	9	
Total	480	94	350	444	Total	480	130	255	385	Total	480	56	261	317	280	

ANEXO 7.1 Distribución y transferencia de óvulos y callos de babaco al final de la primera etapa a medios de Mantenimiento de Callos A, B y C.

		TRANSFERENCIA		
Medio Inicio	TOTAL	MMCA	MMCB	MMCC
MICA	96	30	30	36
MICB	108	46	32	30
MICC	120	40	40	40
MICT	120	40	40	40
TRATAMIENTO 2				
MICA	85	28	28	29
MICB	100	33	33	34
MICC	100	33	33	34
MICT	100	33	33	34
TRATAMIENTO 3				
MICA	39	13	13	13
MICB	99	34	33	32
MICC	95	33	31	31
MICT	68	20	24	24

Anexo 8. Cuadro de contaminación por Bacterias y Hongos en segmentos de hojas en la etapa de introducción in vitro.

Medio	Ovu. Inicio	Bact	0 Días	6 días	8 Días	21 Días	28 días	Suma	%
MICA	120	Bact	0	20	38	5	0	63	52.5
MICA		Hong	0	37	20	0	0	57	47.5
Total Óvulos				63	5	0	0	120	100
MICB	120	Bact	0	45	35	15	15	110	91.6666667
MICB		Hong	0	0	10	0	0	10	8.33333333
Total Óvulos				75	30	15	0	120	100
MICC	120	Bact	0	37	14	8	20	79	65.8333333
MICC		Hong	0	26	15	0	0	41	34.1666667
Total Óvulos				57	28	20	0	120	100
MMCT	120	Bact	0	20	30	22	26	98	81.6666667
MMCT		Hong	0			16	6	22	18.3333333
Total Óvulos				100	70	32	0	120	100



El cuadro anexo 12 y grafico, indican que el medio con mayor % de contaminación por bacteria.

Contaminación por Bacteria los medios MICB demuestra un porcentaje alto de contaminación de 91,7% y el que presento menor porcentaje de contaminación fue MICA con 52.5%

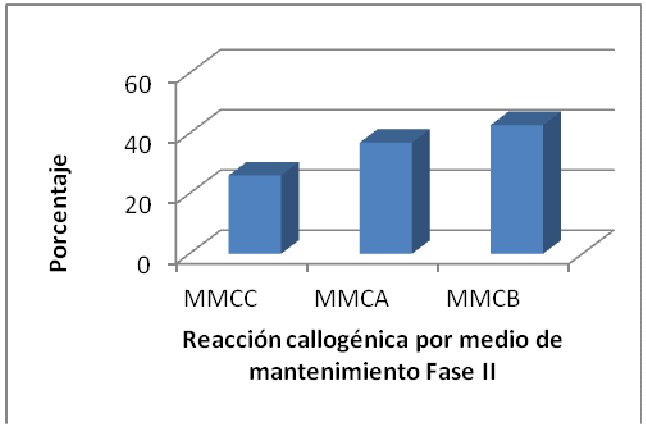
Contaminación por Hongos.

El medio MICC indica un 34,2%, demostrando ser el de menor porcentaje de contaminación por hongos y el medio MMCA con un porcentaje de un 47.5%.

Anexo 9. Análisis de porcentaje de callo génesis en la segunda Etapa .

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo I)					
F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	1733.46	2	866.73	1.76	0.1872
Medios mant	1733.46	2	866.73	1.76	0.1872
Error	16220.02	33	491.52		
Total	17953.48	35			

Test : Duncan Alfa: 0,05			
Error: 491,5158 gl: 33			
Medios mantenimiento	Medias	n	
MMCC	26.05	12	A
MMCA	36.95	12	A
MMCB	42.79	12	A
Letras distintas indican diferencias significativas(p<=0,05)			



ANEXO 10. FOTOGRAFIAS DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO DE TESIS.

El proyecto de tesis se realizo en la Estación Experimental Pichilingue.

Para ejecutar el Proyecto se requirió de varios recursos:

Infraestructura. Laboratorio de Biotecnología de la EET Pichilingue

Materiales y Químicos como fue cristalería, reactivos, autoclave, estufa, pinzas, desinfectantes, cámara de flujo, cajas Petri, entre otros. (Anexo fotos)

Vegetales: Hojas y Frutos de babaco. (Anexo Fotos)

Humanos: Ing. Iván Garzón, Director del Laboratorio de Biotecnología de la EET Pichilingue

Blga. Betthy Castillo encargada del laboratorio de Biotecnología de la EET Pichilingue.

Ing. Jorge Fabara Director de Tesis.

Ing. Norma Quillay, Ejecutora de Tesis.

FOTOGRAFIA DEL ENSAYO.



EET. PICHILINGUE



CRISTALERIA



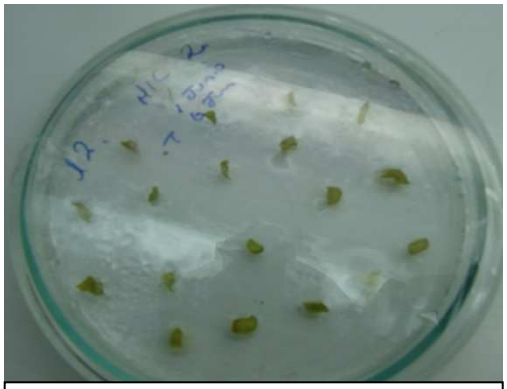
REACTIVOS PARA EL MEDIO



AUTOCLAVE. Para esterilización.



Desinfección de hojas de babaco previa introducción in vitro



Introducción in vitro de segmento de hojas



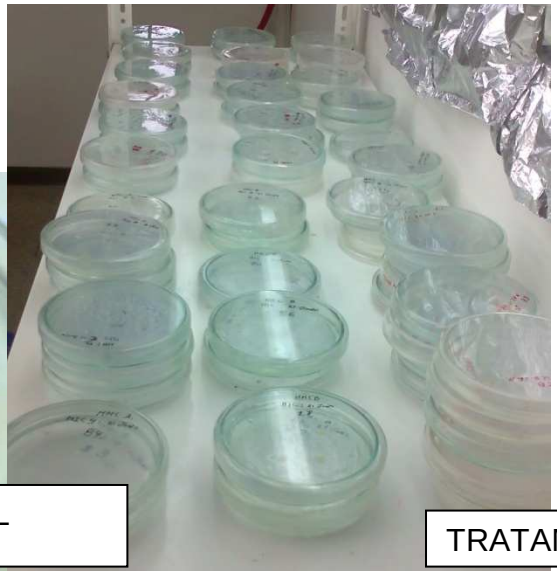
INTRODUCCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL EN CÁMARA DE FLUJO. SALA DE SIEMBRE.



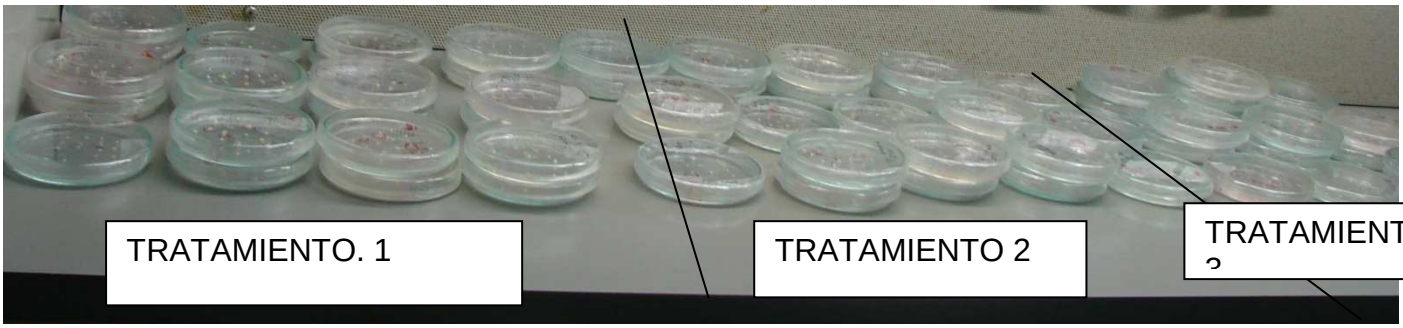
Introducción in vitro de óvulos de



UNIDAD EXPERIMENTAL



TRATAMIENTO



TRATAMIENTO. 1

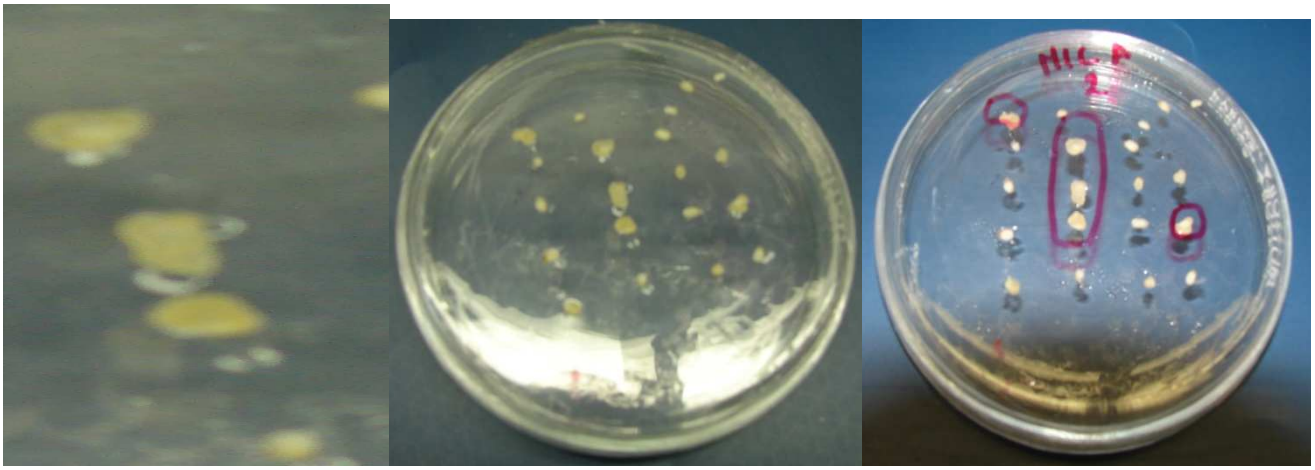
TRATAMIENTO 2

TRATAMIENTO 3

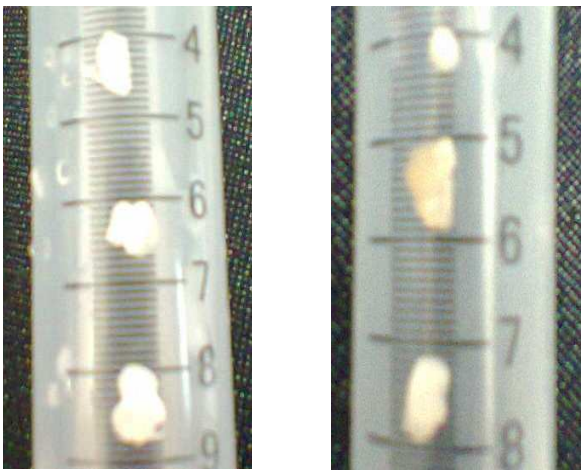


CUARTO DE CRECIMIENTO.

FORMACIÓN DE CALLOS



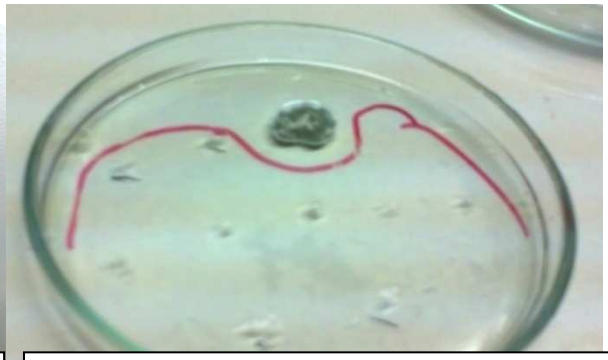
Crecimiento de callos. (Final de la Investigación)



CONTAMINACIÓN.



CONTAMINACIÓN/ BACTERIA/HONGO



CONTAMINACIÓN POR HONGO.



CONTAMINACIÓN POR BACTERIA.



CONTAMINACIÓN POR BACTERIA.

