



**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA**

FECHA DE PRESENTACIÓN: Enero 2011

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Biotecnología

PROYECTO: Biotecnología-Fortalecimiento

SUBPROYECTO: Generación de tecnología de propagación con SITs en cultivos de gran demanda

ACTIVIDAD: Validación de la micropropagación de banano *Musa* AAA var. Williams y mora de castilla sin espinas *Rubus glaucus* Benth bajo Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

UBICACIÓN: Provincia : Pichincha
Cantón : Mejía
Parroquia : Cutuglagua

AUTOR: Egdo. Meneses Montesdeoca Luis Santiago

COAUTORES: Ing. Jacqueline Benítez
Dr. Eduardo Morillo

COLABORADORES: Programa de Fruticultura

DURACIÓN: 9 meses

FECHA DE INICIO: Enero 2011

FECHA DE TERMINACIÓN: Septiembre 2011

PRESUPUESTO: 7768,48 USD

FINANCIAMIENTO: Fondos Fiscales 100 %

1. ANTECEDENTES

El cultivo de tejidos vegetales es una de las herramientas de la biotecnología vegetal de mayor aplicación, técnica basada en colocar un fragmento de planta en un recipiente ayudado con soluciones nutritivas y hormonas vegetales; para propagarla en condiciones de asepsia. Cada fragmento origina una planta genéticamente idéntica a la que se tomó (González L, 2010). Las técnicas clásicas de cultivo de tejidos para micropropagación de plantas normalmente requieren de medios de cultivo semisólidos, gelificados con agar, de gran número de recipientes de cultivo, de cuartos de crecimiento con numerosos estantes y de un personal numeroso para las prácticas de siembra y subcultivo de plantas en las diferentes fases de la micropropagación. Esto sin duda encarece la labor de multiplicación e incrementa los costos de producción de plantas *in vitro* limitando su uso comercial. Lo anterior ha motivado el desarrollo de tecnologías que permitan automatizar los procedimientos de micropropagación, que puedan ser aplicados a diferentes cultivos y que además favorezcan la aclimatación y endurecimiento de plantas en invernadero (CATIE, 2008).

Una técnica viable para la propagación de plantas es la utilización de Sistemas de Inmersión Temporal (SITs) ya que los efectos positivos proporcionados por la misma en la multiplicación de brotes, micro cortes, micro tubérculos y germinación de embriones somáticos está limitada por factores como el tiempo de la inmersión (duración y frecuencia), el volumen del medio de cultivo y el volumen del recipiente, los cuales pueden, de una u otra forma, ser controlados por el investigador. La inmersión temporal mejora generalmente la calidad de la planta al aumentar el vigor del brote producido. (Ribero N, 2004).

El empleo de medios líquidos en protocolos de propagación masiva se ha convertido en una necesidad para abaratar los costos de producción de plantas obtenidas *in vitro*, pero es sólo hasta el desarrollo de los Sistemas de Inmersión Temporal cuando se vislumbra su potencial aplicación. En musáceas la inmersión temporal ha permitido aumentar la eficiencia de la propagación masiva vía inducción de brotes, embriogénesis somática secundaria y en la germinación de los embriones (Colmenares M. y Giménez C, 2003). Las hormonas usadas en estos procedimientos son paclobutrazol que es un triazol que retarda el crecimiento vegetal y Ancymidol que actúa como un potente regulador de crecimiento inhibiendo específicamente una serie de oxidaciones que ocurren en cultivo de tejido (Sarkar *et al*, 2001).

Banano

El banano es una musácea originaria del sur del Asia. A partir de 1940, comenzó a cultivarse a gran escala en nuestro país y con el tiempo su exportación se convirtió en la principal fuente generadora de divisas para el Estado ecuatoriano. En el Ecuador se encuentran cultivadas 229.602 ha, que produjo para el año 2009 un total de 4'478.409 toneladas, y desde enero a junio del 2010 un total de 2'937.869 toneladas, llegando a cubrir el 25% de la demanda internacional, siendo la Unión Europea, los Estados Unidos de Norte América, Japón y Rusia sus principales compradores (AEBE, 2010) lo que represento para el país en exportaciones de este fruto en 1'995.231 miles de dólares FOB en el año 2009 y 1'101.299 miles de dólares FOB desde enero a junio del 2010 (BCE, 2010). El número de hectáreas cultivadas con banano está creciendo a razón de 10 % aproximadamente, por lo que es importante dotar a los agricultores de plantas con alta calidad y sanidad para la implementación de nuevos cultivares y la renovación de los ya existentes (INEC, 2010). En banano se ha logrado con éxito la micropropagación bajo

sistemas de inmersión temporal, aumentando significativamente la cantidad de plántulas. Con la aplicación de esta nueva tecnología se ha logrado coeficientes de multiplicación de 9,4 superiores a los métodos de micropropagación convencional (Castro *et al*, 2002).

Mora de castilla

La mora de castilla es una Rosaceae que crece desde México a Ecuador, expandida generalmente en las tierras altas del trópico (León, 2000). Las provincias productoras de mora en el Ecuador son Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha, Imbabura, Carchi y Bolívar, en una extensión de 5.200 ha, que producen entre 12 y 14 t/ha/año (Espinosa J. 2008). Una nueva variedad de mora de castilla sin espinas esta siendo desarrollada por los investigadores del Programa Nacional de Fruticultura, del INIAP. Este fruto tiene como característica el poseer mayor contenido de sólidos solubles, un tamaño más grande y mejor productividad; además, la ausencia de espinas facilita el manejo del huerto. Según los datos registrados durante la fase de experimentación, esta variedad tiene un rendimiento anual de 12 a 18 kg/planta/año lo que genera productividades entre 20 y 30 t/ha/año, con contenidos superiores a los 12 °Brix. Algunos estudios señalan que en el Ecuador se ha aumentado la demanda de la fruta en 3 %, y que la producción se destina tanto para la elaboración de conservas como para el consumo en producto fresco, por lo que es importante avanzar en este cultivo (INIAP, 2010).

En *Rubus* spp se han utilizado con éxito el sistema de inmersión temporal, obteniendo vitroplantas en menor tiempo y con mayor vigorosidad, al someter a las estacas con yemas laterales a frecuencias cortas de inmersión (Flores y Arguello, 2005) obteniéndose buenos resultados en *Rubus glaucus* elevando la tasa de multiplicación (Jones, 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la micropropagación de los bananos hace parte de la modernización de la agricultura y han contribuido a mejorar las condiciones sanitarias de las plantaciones e incrementar su productividad. La aplicación a escala comercial de las técnicas de micropropagación convencional se ha visto limitada por factores tales como las bajas tasas de multiplicación, calidad de los explantes y altos costos ocasionados por el uso intensivo de mano de obra en las etapas de multiplicación y enraizamiento. La automatización de una o más etapas en los procesos de micropropagación es una opción para la reducción de los costos de manipulación, reducción del espacio e incremento de los volúmenes de producción. Además por los estudios exitosos realizados en banano bajo este sistema serán referencia para la validación de los resultados y la eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP.

En el Ecuador la mora de castilla es uno de los frutales con mayor presencia en los mercados nacionales e internacionales, existiendo en la actualidad un aumento en la demanda, lo cual hace que los productores necesiten nuevas plantas para renovar sus cultivos y expandirlos, siendo necesario que instituciones como el INIAP provean el mayor número de plantas con calidad y sanidad, teniendo en las técnicas de micropropagación una gran herramienta para suplir esas necesidades. La propagación vegetativa tradicional para la producción de plantas de mora es muy lenta y costosa con coeficientes de multiplicación muy bajos, mientras que, los índices de propagación obtenidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del INIAP mediante la micropropagación convencional superan a los anteriores teniendo un coeficiente de 5 y con los SITs se desea mejorar los coeficientes de multiplicación.

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) superan a los sistemas tradicionales de producción de plantas *in vitro* debido a que son menos costosos, dada la sustitución de la materia sólida que sirve de alimentación de las plantas por una solución acuosa mucho más económica, además de asegurar un ambiente uniforme y adecuado para el desarrollo de las células y automatizando algunas etapas de los procesos de micropropagación, consecuentemente se tiene un menor uso de mano de obra. Los SITs es una metodología que permitirá mejorar los resultados obtenidos en la clonación masiva de plantas de banano y mora, utilizando nuevas técnicas de micropropagación que permitan automatizar parte de los procesos mejorando la calidad y cantidad de las plantas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Validar la micropropagación de banano *Musa AAA var. Williams* y mora de castilla sin espinas *Rubus glaucus Benth*, bajo Sistemas de Inmersión Temporal

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar dos frecuencias de inmersión para la formación de brotes en banano *Musa AAA var. Williams*.
2. Validar la capacidad de inducción de dos hormonas a diferentes dosis en la formación de brotes en banano *Musa AAA var. Williams*
3. Desarrollar un protocolo para la formación de brotes de mora de castilla sin espinas *Rubus glaucus Benth*, bajo Sistemas de Inmersión Temporal.
4. Realizar el análisis económico de la aplicación comercial de los Sistemas de Inmersión Temporal en la micropropagación de banano *Musa AAA var. William* y mora de castilla sin espinas *Rubus glaucus Benth*.

4. HIPÓTESIS

Ho: Los Sistemas de Inmersión Temporal bajo esta metodología no responden eficientemente a la propagación masiva en banano y mora.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Materiales de laboratorio

5.1.2 Reactivos

- Ancymidol
- Paclobutrazol

5.1.3 Equipos de laboratorio

- Biorreactor de inmersión temporal

5.1.4 Materiales y equipos de oficina

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Características del sitio experimental

5.2.1.1 Ubicación

La investigación se llevará a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP que se encuentra ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Mejía en la parroquia Cutuglagua.

5.2.1.2 Condiciones experimentales de laboratorio

Temperatura promedio	: 25±2 °C
Horas Luz	: 16
Intensidad de Luz	: 2000 – 2200 lux
Humedad	: 70 %

5.2.2 Factores de Estudio

FACTOR	CULTIVOS	
	BANANO	MORA
Frecuencia (f)	f ₁ = Cada 3 horas por 3 minutos	f ₁ = Cada 3 horas por 3 minutos
	f ₂ = Cada 6 horas por 3 minutos	f ₂ = Cada 6 horas por 3 minutos
Hormonas (h)	h ₁ = Ancyimidol	h ₁ = Ancyimidol
	h ₂ = Paclobutrazol	h ₂ = Paclobutrazol
Dosis (d)	d ₁ = 1,5 mg/l	d ₁ = 1,5 mg/l
	d ₂ = 2,5 mg/l	d ₂ = 2,5 mg/l
	d ₃ = 3,5 mg/l	d ₃ = 3,5 mg/l

5.2.3 Tratamientos

Cuadro 1. Tratamientos para la micropropagación de bananos *Musa* AAA var. Williams y de mora de castilla sin espinas *Rubus glaucus* Benth bajo Sistemas de Inmersión Temporal. INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2011.

ORDEN	SIMBOLO	CODIGO	TRATAMIENTO
1	T1	f1 h1 d1	3 horas por 3 minutos + Ancyimidol + 1,5 mg/l
2	T2	f1 h1 d2	3 horas por 3 minutos + Ancyimidol + 2,5 mg/l
3	T3	f1 h1 d3	3 horas por 3 minutos + Ancyimidol + 3,5 mg/l
4	T4	f1 h2 d1	3 horas por 3 minutos + Paclobutrazol + 1,5 mg/l
5	T5	f1 h2 d2	3 horas por 3 minutos + Paclobutrazol + 2,5 mg/l
6	T6	f1 h2 d3	3 horas por 3 minutos + Paclobutrazol + 3,5 mg/l
7	T7	f2 h1 d1	6 horas por 3 minutos + Ancyimidol + 1,5 mg/l
8	T8	f2 h1 d2	6 horas por 3 minutos + Ancyimidol + 2,5 mg/l
9	T9	f2 h1 d3	6 horas por 3 minutos + Ancyimidol + 3,5 mg/l
10	T10	f2 h2 d1	6 horas por 3 minutos + Paclobutrazol + 1,5 mg/l

11	T11	f2 h2 d2	6 horas por 3 minutos + Paclobutrazol + 2,5 mg/l
12	T12	f2 h2 d3	6 horas por 3 minutos + Paclobutrazol + 3,5 mg/l

5.2.4 Unidad experimental

La unidad experimental estará conformada por un frasco de vidrio de tres litros de capacidad, el cual contendrá 1000 ml de medio de cultivo líquido en el tiempo y frecuencia especificada y en el otro frasco contendrá clusters con diez brotes para el caso de banano y diez explantes con tres yemas laterales cada una para el caso de mora de castilla.

5.2.5 Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 2 x 2 x 3 (dos frecuencias de inmersión por dos hormonas por tres dosis) con 4 observaciones por cada tratamiento y en cada especie.

5.2.6 Análisis Estadístico

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) se presenta a continuación:

Cuadro 3. ADEVA para la micropropagación de bananos *Musa* AAA var. Williams y de mora de castilla sin espinas *Rubus glaucus* Benth bajo Sistemas de Inmersión Temporal. INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2011.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (GL)
Total	47
Tratamientos	11
Frecuencia(F)	1
Hormonas (H)	1
F x H	1
Dosis (D)	2
lineal	1
cuadrático	1
F x D	2
H x D	2
F x H x D	2
Error Experimental	36
PROMEDIO	
CV (%)	

5.2.7 Análisis funcional

5.2.7.1 Pruebas de significación

Se realizará la prueba de Tukey al 5%, para las dosis e interacciones que presenten diferencias estadísticas significativas y DMS al 5% para frecuencias y hormonas que presenten diferencias estadísticas significativas.

5.2.7.2 Polinomios ortogonales

Se realizará polinomios ortogonales para dosis.

5.2.7.3 Correlaciones

Se realizará correlaciones entre frecuencias y porcentaje de brotes hiperhidratados.
Se realizará correlaciones entre hormonas y número de brotes.

5.2.8 Variables y métodos de evaluación

- Coeficiente de multiplicación

Para esta variable se tomará en cuenta el número de brotes introducidos en el medio líquido al inicio, comparados con el número de brotes al final del proceso.

$$\text{Coeficiente de multiplicación} = \frac{\text{Número total de brotes al final del proceso}}{\text{Número de brotes introducidos}}$$

- Número de brotes

Se contará el número de brotes por explante y se obtendrá un promedio del número de brotes por cada tratamiento a los 21 días para banano y 30 días para mora

- Tamaño de brotes

Se determinará la longitud en centímetros de los brotes y se obtendrá un promedio de la longitud de brotes por cada tratamiento a los 21 días para banano y 30 días para mora

- Porcentaje de brotes hiperhidratados

Se establecerá mediante relación porcentual entre el número brotes con hiperhidratación y el número total de brotes. Se evaluará a los 21 días para banano y 30 días para mora

$$\text{Porcentaje de hiperhidratación} = \frac{\text{Número de brotes hiperhidratados}}{\text{Número de total de brotes.}} \times 100$$

- Porcentaje de brotes competentes

Se establecerá mediante relación porcentual entre en número de brotes competentes y el número total de brotes. Se evaluará a los 21 días para banano y 30 días para mora.

$$\text{Porcentaje de brotes competentes} = \frac{\text{Número de brotes competentes}}{\text{Número de total de brotes.}} \times 100$$

- Peso fresco

Para esta variable se pesará el material vegetal resultante en una balanza de precisión. Se evaluará a los 21 días para banano y 30 días para mora.

5.2.9 Manejo específico del experimento

La primera etapa incluye la introducción de explantes de banano y mora en medio sólidos, luego la micropropagación convencional de los brotes, al mismo tiempo se eliminará el material contaminado. En la segunda etapa se sembrarán los explantes obtenidos de la micropropagación convencional en medio líquido para ser sometidos al Sistema de Inmersión Temporal.

5.2.9.1 Banano

- **Introducción del material vegetal**

El material vegetal inicial consistirá en plantas de banano variedad Williams las cuales deberán ser vigorosas y presentar follaje sin lastimaduras, además de no presentar síntomas de enfermedades. Las plantas se adquirieron en la provincia de los Ríos en la Estación Experimental Tropical Pichilingue.

De las plantas seleccionadas, se eliminarán las hojas con una cuchilla limpia hasta obtener el ápice. Posteriormente, el explante se lavará en una solución de agua con jabón líquido. Este procedimiento se realizará en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

Los explantes se someterán a una desinfección descrita por Rodríguez *et al*, 2007 (Anexo1). Posteriormente, bajo cámara de flujo laminar, con ayuda de pinzas y bisturí esterilizado se procederá a sembrar en un medio de introducción. Los frascos sembrados se colocarán en un cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 27 ± 2 °C de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo, durante 30 días (Martínez *et al* 2006)

- **Micropropagación en medio sólido**

En una cámara de flujo laminar, a los explantes introducidos no contaminados, con la ayuda de pinzas y bisturí estériles, se procederá a sembrar en medio de inducción y proliferación de brotes. Posteriormente los frascos sembrados se colocarán en un cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 27 ± 2 °C de temperatura, humedad relativa de 55 – 60 % y 16 horas luz de fotoperiodo, durante 30 días

- **Preparación de los biorreactores y medio líquido**

El Sistema de Inmersión Temporal empleado será el propuesto por Alvard *et al*, en 1993 con algunas modificaciones. Como recipientes se utilizarán frascos de tres litros de capacidad, los cuales se interconectarán por parejas mediante mangueras de silicona. En un frasco se colocará el medio de cultivo líquido y en el otro los brotes. Cada frasco se conectará a un sistema de entrada de aire proveniente de un compresor, el cual se accionará por un programador automático para el control de la frecuencia, la duración de las inmersiones, la luminosidad y el flujo de gases. El aire entrante o saliente se esterilizará a través de filtros hidrófobos de 0,2 μm , de tal manera que cada recipiente se

manipulará independientemente sin riesgos de contaminación. Todo el material será previamente esterilizado en una autoclave a 121 ° C.

Los clusters con brotes de banano se multiplicarán en medio líquido MS Murashige y Skoog, se suplementará con 1,0 mg/l de tiamina, 4,0 mg/l de BAP y el 3,0 % de sacarosa, se adicionara los retardantes de crecimiento Ancymidol y Paclobutrazol en la dosis que corresponda al tratamiento. El pH se ajustará a 5,8 antes de la esterilización a 121 ° C. Los cultivos se mantendrán en un cuarto de crecimiento con luz natural, a un temperatura de 27±2 °C. La frecuencia de inmersión en el SIT será de 3 minutos cada 6 horas y de 3 minutos cada 3 horas. Cultivos que conviven en medio semisólido se transferirán a medio líquido cada 21 días.

5.2.9.2 Mora

- **Introducción del material vegetal**

El material vegetal inicial consistirá en plantas de mora de castilla sin espinas, las cuales deberán ser vigorosas y presentar follaje sin lastimaduras, además de no presentar síntomas de enfermedades. Las estacas seleccionadas serán adquiridas en la provincia de Pichincha en la Granja Experimental Tumbaco del Programa de Fruticultura.

De los brotes seleccionados, se eliminarán las hojas en exceso con una cuchilla limpia. Posteriormente, el explante se lavará en una solución de agua con jabón líquido y aislando segmentos nodales de 3 - 4 cm de longitud, los cuales se someterán por 30 minutos a una solución con fungicida, Luego son transferidos a una solución de hipoclorito de sodio 2,5% en combinación con tween 20 al 1 %, durante 20 minutos y serán sometidos a cuatro lavados con una solución de antioxidantes. Este procedimiento se realizará en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

Posteriormente, bajo cámara de flujo laminar, con ayuda de pinzas y bisturí esterilizado se procederá a retirar las hojas, sembrando en un medio de introducción. Los frascos con los explantes sembrados se colocarán en un cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 21±2 °C de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo, durante 15 días

- **Micropropagación en medio sólido**

A los explantes introducidos no contaminados, bajo cámara de flujo laminar, con ayuda de pinzas y bisturí estériles, se procederá a sembrar en un medio de inducción y proliferación de brotes. Posteriormente los frascos con los explantes sembrados se colocarán en un cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 21±2 °C, humedad relativa de 55 – 60 % de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo, durante 60 días

- **Preparación de los biorreactores y medio líquido**

Se realizará de acuerdo a lo desarrollado en el punto 5.2.9.1

Los brotes de mora se multiplicarán en medio líquido MS Murashige y Skoog, se suplementará con 1,0 mg/l de AG₃, 4,0 mg/l de BAP, 100mg/l de ácido ascórbico y el 3,0% de sacarosa, se adicionara los retardantes de crecimiento Ancymidol y

Paclbutrazol en la dosis que corresponda al tratamiento. El pH se ajustará a 5,5 antes de la esterilización a 121 ° C. Los cultivos se mantendrán en un cuarto de crecimiento con luz natural, a un temperatura de 21±2 °C. La frecuencia de inmersión en el SIT será de 3 minutos cada 6 horas y de 3 minutos cada 3 horas. Cultivos que conviven en medio semisólido se transferirán a medio líquido cada 30 días.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Meses								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Revisión de literatura	x	x						x	x
Elaboración y aprobación del proyecto	x								
Introducción de brotes de banano y mora en medio sólido	x	x	x						
Micropropagación convencional de brotes de banano y mora		x	x	x					
Eliminación de brotes contaminados		x	x	x					
Siembra de brotes de banano y mora en medio líquido			x	x	x	x	x	x	
Análisis de datos				x	x	x	x	x	x
Redacción de manuscrito								x	x

7. PRESUPUESTO

7.1 Personal

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Becario	Mensual	323,85	9	2914,65
SUBTOTAL				2914,65

7.2 Equipos

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Valor depreciado a un año (USD)
Biorreactor de inmersión temporal	Biorreactor	50,00	28	1400,00
Agitador magnético	Unidad	432,00	1	17,28
Autoclave	Unidad	900,00	1	36,00
Balanza de precisión	Unidad	2500,00	1	100,00
Cámara de flujo laminar	Unidad	12500,00	1	500,00
Dispensador de medio	Unidad	100,00	1	4,00
Estufa	Unidad	1500,00	1	60,00
Microondas	Unidad	170,00	1	6,80
pH-metro	Unidad	760,00	1	30,40
Refrigeradora	Unidad	600,00	1	198,00
SUBTOTAL				2352,48

7.3 Reactivos

Rubro	Unidad	Precio Unitario	Cantidad	Total
Ancymidol	mg	1,590	360,000	572,400
Paclobutrazol	mg	2,500	360,000	900,000
Medio M&S	l	11,000	10,800	118,800
Ácido Indol acético (AIA)	g	25,800	0,004	0,113
Phytigel	g	0,300	75,600	22,680
Agua destilada	l	0,300	55,000	16,500
Alcohol	l	1,000	10,500	10,500
Benciladenina (BA)	mg	0,030	51,840	1,555
Ácido Indol butírico (IBA)	g	19,000	0,001	0,020
Kinetina (KIN)	g	46,320	0,052	2,401
Hipoclorito de Calcio	l	10,000	0,400	4,000
Hipoclorito de Sodio	l	10,000	0,480	4,800
Tween 20	ml	0,618	3,000	1,854
Ácido cítrico	g	0,220	0,600	0,132
Ácido ascórbico	g	0,880	0,400	0,352
Agry-Gent plus 800	g	0,680	4,000	2,720
Benlate	g	0,002	4,000	0,008
Sulfato de Adenina	g	4,920	0,864	4,251
Tiamina	mg	1,820	4,320	7,862
Mio-inositol	g	0,750	0,001	0,001
Azúcar	kg	0,800	0,324	0,259
Agua de Coco	l	3,000	0,540	1,620
SUBTOTAL				1672,828

7.4 Materiales de Laboratorio

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Barras Magnéticas	Unidad	3,00	2	6,00
Espátula mando de madera	Unidad	4,00	2	8,00
Mandil	Unidad	8,00	1	8,00
Mangos de Bisturí	Unidad	5,00	2	10,00
Marcadores	Unidad	2,00	2	4,00
Mecheros de Alcohol	Unidad	4,00	1	4,00
Pinzas	Unidad	20,00	3	60,00
Pipeta 10 ml	Unidad	2,00	1	2,00
Pipeta 1ml	Unidad	1,89	1	1,89
Probeta Graduada 500ml	Unidad	16,40	1	16,40
Probeta Graduada 25ml	Unidad	6,30	1	6,30
Tijeras	Unidad	2,00	1	2,00
Cinta autoclavable	Rollo	10,00	1	10,00
Desinfectante	l	1,00	4	4,00
Frascos de vidrio 5.6x9.0 cm	Unidad	0,50	100	50,00
Fundas	Unidad	0,01	150	1,50
Guantes	Par	0,65	20	13,00

Hoja Bisturí	Unidad	0,20	100	20,00
Jabón Líquido	l	2,50	1	2,50
Papel Absorbente	Paquete	1,50	2	3,00
Papel Aluminio	Paquete	4,00	2	8,00
Servilletas	Paquete	1,20	3	3,60
Zapatos	Unidad	30,00	1	30,00
Rolopac	Paquete	3,20	2	6,40
Mascarilla	Unidad	0,20	10	2,00
SUBTOTAL				282,59

7.5 Materiales de Oficina

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Copias	Unidad	0,03	1200	36,00
Empastado del texto	Unidad	15,00	8	120,00
CD	Unidad	5,00	4	20,00
SUBTOTAL				176,00

7.6 Costo total

Rubro	Total (USD)
Personal	2914,65
Equipos	2352,48
Reactivos	1672,83
Materiales de laboratorio	282,59
Materiales de oficina	176,00
SUBTOTAL	7398,55
Imprevistos 5%	369,93
TOTAL	7768,48

7.7 Fuentes de financiamiento

Institución	Proyecto	USD	Porcentaje (%)
INIAP	BIOTECNOLOGIA	7768,48	100

8. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- AEBE (Asociación de Exportadores Bananeros del Ecuador, EC) 2010, Historia del Banano Ecuatoriano, Guayaquil EC
- Alvard D. y Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid medium for banana micropropagation. *Plant Cell Tiss Org.* 32: 55-56.
- BCE (Banco Central del Ecuador, EC) 2010 Estadísticas mensuales de exportación. Quito EC boletín 1901
- Castro D. Diaz J. y Montoya N. 2002. Propagación clonal de bananos en Biorreactores de Inmersión Temporal. Medellín, COL, UCO. p 44
- CATIE 2008. (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR) Los Biorreactores el puente del laboratorio a la tierra. 2 p.
- Colmenares M, Giménez. 2003. Multiplicación *In Vitro Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Revista Facultad. Agronomía Luz.* 20: 468-477
- Espinosa J. 2008. Estudio de la sustitución parcial de mora por remolacha en la elaboración de mermelada para la industria pastelera. Tesis Ing. Agroindustrial. Quito, EC, EPN. p. 5
- Flores D. y Argüello F. 2005 Cultivo de la mora innovaciones tecnológicas. 1 ed. Cartago, CR. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 176 p.
- González L. 2010 Cultivo de tejidos vegetales. Consultado 13 septiembre 2010. Disponible en <http://www.notadiario.com/naturaleza/mexico-a-la-vanguardia-en-cultivo-de-tejidos-vegetales>
- INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, EC) 2010. Estadísticas Agropecuarias, Encuesta de superficie y producción agropecuaria. Consultado el 13 de octubre 2010. Disponible en http://www.inec.gov.ec/web/guest/ecu_est/est_agr
- Jones F. 2006. Establecimiento *In Vitro* y micropropagación de frambuesa *Rubus idaeus* L. utilizando medio semisólido y medio líquido en RITA. Tesis Ing. Biotecnólogo. Cartago, CR, ITCR. P 36
- León J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales: *Rubus glaucus*. 3 ed. San José, CR. Agroamérica. 183 p.
- Martínez M. y Pacheco J. 2006. Protocolo para la micropropagación de la *Furcraea macrophylla* Baker. Consultado el 15 de octubre del 2010. Disponible en <http://www.scielo.org.co/scielo>
- Rivero N. Barbón R. y Camacho W. 2004 Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *In Vitro* de brotes de *Anthurium andraeanum* Lind. var. Lambada. *Biotecnología Vegetal* 4(2) 97-100
- Rodríguez A. Rodríguez de la O J. Solano J. y Castellanos J. 2007. Propagación *In Vitro* del maguey bruto una especie amenazada de interés económico. México. Consultado el 15 de octubre del 2010. Disponible en <http://www.chapingo.mx/...4002007b104f62a47c712fd986aa3565pdf>
- Sarkar D. Chakrabarti S. y Naik. P.S. 2001. Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage *in vitro*. *Euphytica* 117:133-142
- INIAP, 2010. Nueva variedad de mora sin espinas. *Revista informativa INIAP* 1(3): 29

9. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de desinfección con hipoclorito de sodio para banano (Rodríguez *et al*, 2007)

- Los explantes son lavados y desinfectados con agua, jabón, Tween 20 y agua estéril
- Sumergir durante tres minutos en alcohol al 70%
- Posteriormente, en hipoclorito de sodio al 10% durante 5 minutos.
- Enjuagar tres veces consecutivas con agua estéril.

Anexo 2. Medio sólido de introducción para bananos

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
MS más Vitaminas	4,4 g/l
Sucrosa	30 g/l
AIA	0,1 ppm
BAP	5,0 ppm
Gelride	2,5 %
Agua de coco	10 %

Fuente: Protocolos de laboratorio de biotecnología del INIAP

Anexo 3. Medio sólido de multiplicación para bananos

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
MS más Vitaminas	4,4 g/l
Sucrosa	30 g/l
AIA	0,1 ppm
BAP	3,0 ppm
Gelride	2,5 %
Agua de coco	10 %

Fuente: Protocolos de laboratorio de biotecnología del INIAP

El medio de cultivo debe ser regulado a un pH de 7,7 antes de la esterilización a 121 °C por 25 minutos. Las condiciones de cultivo deben ser mantenidas en un cuarto aclimatado a una temperatura de 27±2 °C, humedad relativa de 55 – 60 % y con un fotoperiodo de 16 horas con lámparas de luz blanca a una intensidad de 2000 – 2200 lux.

Anexo 4. Medio líquido de multiplicación para bananos con ancymidol

REACTIVO	CONCENTRACIÓN		
	d1	d2	d3
MS más Vitaminas	4,4 g/l	4,4 g/l	4,4 g/l
Sucrosa	30 g/l	30 g/l	30 g/l
Tiamina	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
BAP	4 mg/l	4 mg/l	4 mg/l
Ancymidol	1,5 mg/l	2,5 mg/l	3.5 mg/l

Anexo 5. Medio líquido de multiplicación para bananos con paclobutrazol

REACTIVO	CONCENTRACIÓN		
	d1	d2	d3
MS más Vitaminas	4,4 g/l	4,4 g/l	4,4 g/l
Sucrosa	30 g/l	30 g/l	30 g/l
Tiamina	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
BAP	4 mg/l	4 mg/l	4 mg/l
Paclobutrazol	1,5 mg/l	2,5 mg/l	3.5 mg/l

Los medios de cultivo deben ser regulados a un pH de 5,8 antes de la esterilización a 121 °C por 25 minutos. Las condiciones de cultivo deben ser mantenidas en un cuarto aclimatado a una temperatura de 27°C, humedad relativa de 55 – 60 %y con un fotoperiodo de 16 horas con lámparas de luz blanca a una intensidad de 2000 – 2200 lux.

Anexo 6. Protocolo de desinfección con hipoclorito de sodio para mora

- Los explantes son lavados en una solución de agua más jabón líquido y aislando segmentos nodales de 1- 2 cm de longitud.
- Luego se someterán por 30 minutos a una solución con fungicida (Piridin y Benlate 2 g/l cada una).
- Luego son transferidos a una solución de hipoclorito de sodio (NaClO 2,5%) en combinación con Tween 20 (1 %), durante 20 minutos.
- Posteriormente son sometidos a cuatro lavados con una solución de antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico 0,125 g/l cada una).

Anexo 7. Medio sólido de introducción para mora protocolo de laboratorio.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
MS	4,3 g/l
Sucrosa	30 g/l
ANA	0,5 ppm
AG3	0,3 ppm
BAP	1,0 ppm
Phytigel	3,7g/l

Anexo 8. Medio sólido de multiplicación para mora protocolo de laboratorio.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
MS	4,3 g/l
Sucrosa	30 g/l
ANA	0,1 ppm
AG3	0,3 ppm
BAP	0,3 ppm
Pantotenato	0,6 ppm
Phytigel	3,7 g/l

El medio de cultivo debe ser regulado a un pH de 7,7 antes de la esterilización a 121 °C por 25 minutos. Las condiciones de cultivo deben ser mantenidas en un cuarto aclimatado

a una temperatura de 21 ± 2 °C, humedad relativa de 55 – 60 % y con un fotoperiodo de 16 horas con lámparas de luz blanca a una intensidad de 2000 – 2200 lux.

Anexo 9. Medio líquido de multiplicación para mora con ancymidol

REACTIVO	CONCENTRACION		
	d1	d2	d3
MS más Vitaminas	4,4 g/l	4,4 g/l	4.4 g/l
Sucrosa	30 g/l	30 g/l	30 g/l
AG ₃	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
BAP	4 mg/l	4 mg/l	4 mg/l
Ácido ascórbico	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l
Ancymidol	1,5 mg/l	2,5 mg/l	3,5 mg/

Anexo 10. Medio líquido de multiplicación para mora con paclobutrazol

REACTIVO	CONCENTRACION		
	d1	d2	d3
MS más Vitaminas	4,4 g/l	4,4 g/l	4.4 g/l
Sucrosa	30 g/l	30 g/l	30 g/l
AG ₃	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
BAP	4 mg/l	4 mg/l	4 mg/l
Ácido ascórbico	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l
Paclobutrazol	1,5 mg/l	2,5 mg/l	3,5 mg/

Los medios de cultivo deben ser regulados a un pH de 5,5 antes de la esterilización a 121 °C por 25 minutos. Las condiciones de cultivo deben ser mantenidas en un cuarto aclimatado a una temperatura de 21 °C, humedad relativa de 55 – 60 % y con un fotoperiodo de 16 horas con lámparas de luz blanca a una intensidad de 2000 – 2200 lux.