

# 2022

## Informe Anual Biotecnología



Autores: Quiala E., Tapay I., Osorio B, Ruiz N, Zambrano C., Martínez G., Velez P., Mejía, A., Puga M., Viteri G., Roberto C., Mosquera E., Moreira R., Quiroz J., Mestanza S., & Parada N.

Estación Experimental Litoral Sur  
Instituto Nacional de Investigaciones  
Agropecuarias-INIAP

**Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias**

Dirección: Km 26 Vía Durán - Tambo, al Oeste de Guayaquil,  
Cantón Yaguachi

Teléfono: 593-4-2724260 / 2724261

[www.iniap.gob.ec](http://www.iniap.gob.ec)

## Tabla de contenido

INFORME ANUAL 2022.....	3
1. Departamento:.....	3
2. Nombre director de la Estación Experimental:.....	3
4. Equipo técnico multidisciplinario I+D.....	3
5. Financiamiento .....	4
6. Proyectos .....	4
8. Publicaciones .....	6
9. Participación en eventos de difusión científica, técnica o de difusión: .....	6
10. Propuestas de investigación presentadas:.....	7
11. Hitos/Actividades ejecutadas por el departamento (POA 2022).....	7
Proyecto 1. Proyecto FIASA-EELS-2022-008_Fortalecimiento de los programas de mejoramiento genético mediante herramientas biotecnológicas aplicadas en cinco cultivos de interés agrícola. ....	7
Proyecto 2. Proyecto FIASA-EELS-2022-009_Desarrollo e implementación de tecnologías productivas en el cultivo de arroz, para aumentar la resiliencia de pequeños y medianos productores al cambio climático en Ecuador. ....	47
Proyecto 3: Proyecto FIASA-EELS-2022-015_Enfermedades letales en la Palma Aceitera en Ecuador. ....	56
Proyecto 4. Proyecto AIEA_Fortalecimiento de capacidades para la prevención y el manejo de la marchitez por Fusarium de las Musáceas en América Latina y el Caribe.....	69

## INFORME ANUAL 2022

1. **Departamento:** Biotecnología

2. **Nombre director de la Estación Experimental:**

Ing. José Quiroz Camacho, M.Sc. Enero- Septiembre.

Ing. Edgar Eloy Orellana Hidalgo, M.Sc. Septiembre hasta la actualidad.

3. **Responsable del Departamento de la Estación Experimental:** Elisa Quiala Mendoza, Ph.D

4. **Equipo técnico multidisciplinario I+D:**

### Personal técnico:

- ✓ Elisa Quiala Mendoza, Ph.D Investigador Auxiliar 1
- ✓ Inés Tapay Mendoza, Ing. Agrónoma. Técnico FIASA. Abril-Diciembre.
- ✓ Noely Ruiz Ocampo, Ing. Biotecnología. Técnico FIASA. Abril-Diciembre.
- ✓ Bertín Osorio Villegas, Ing. Agrónomo. Técnico FIASA. Mayo-Diciembre.
- ✓ Gerardo Martínez Jiménez. Biólogo. Técnico FIASA. Mayo-Diciembre.
- ✓ Paul Vélez Chávez. Ing. Agrónomo. Técnico FIASA. Mayo-Diciembre.
- ✓ Raphael Peñafiel Portilla. Ing. Agrónomo. Técnico FIASA. Mayo-Junio.
- ✓ Cristian Zambrano Mendoza. Ing. Biotecnología. Agosto-Diciembre.
- ✓ Alejandro Mejía García. Ing. Informática. Técnico FIASA. Agosto-Diciembre

### Personal de apoyo:

- ✓ Laura Mónica Puga (apoyo de laboratorio)
- ✓ Rolando Chavarro (apoyo en campo)
- ✓ José Anchundia (apoyo en campo)
- ✓ Alfredo Alvarado (apoyo en campo)
- ✓ Darwin Arriaga (apoyo en campo)

### Técnicos asociados de otros programas, departamentos e instituciones externas:

Roberto Celi (Programa de arroz), Edinson Mosquera (Programa de arroz), Saúl Mestanza, James Quiroz (Programa de café y cacao), Gladys Viteri (Dpto. de Planificación y Econ. Agrícola), Eloy Orellana (Dirección técnica), Luis Peñaherrera (Dpto. Protección vegetal)

sección Malezas), Eduardo Morillo (Departamento de Biotecnología EESC), Johanna Buitrón (Departamento de Biotecnología EESC), Digner Ortega (Programa de palma aceitera EESD), Silvia Zambrano (Programa de palma aceitera EESD).

**Estudiantes de prácticas pre-profesionales:**

- ✓ Gabriel Toala Vera (UAE)
- ✓ Isaac Velasco Morales (UNEMI)
- ✓ Kevin Torres Espinoza (UNEMI)

**5. Financiamiento:** Gasto Corriente Estación Experimental Litoral Sur y Fondos del proyecto FIASA-EELS-2022-008

**6. Proyectos:**

**Proyecto 1. Proyecto FIASA-EELS-2022-008\_Fortalecimiento de los programas de mejoramiento genético mediante herramientas biotecnológicas aplicadas en cinco cultivos de interés agrícola.**

**Tipo propuesta:** Proyecto I+D

**Fondos:** FIASA y Gasto corriente INIAP

**Fecha inicio:** Abril 2022

**Responsable:** Elisa Quiala

**Equipo multidisciplinario:** Inés Tapay, Noely Ruiz, Bertin Osorio, Cristiam Zambrano, Gerardo Martínez, Paul Velez, Alejandro Mejía, Gladys Viteri, James Quiroz, Saúl Mestanza, Ricardo Moreira, Eloy Orellana, Nathalia Parada, Lenin Paz, Daniel Navia, Luis Peñaherrera, Digner Ortega (EESD), Silvia Zambrano (EESD), Mercedes Navarrete (EESD), Alicia Romero (EESD), Iván Garzón (EETP), Antonio Bustamante (EETP), Eduardo Murillo (EESC), Johanna Buitrón (EESC), Santiago Meneses (EESC).

**Colaboradores:** Mónica Puga, Luis Duicela (ESPAM), Jorge Chilam (ESPAM)

**Presupuesto:** \$ 647 299.7384 USD (\$ 381 308.5400 USD del FIASA)

**Duración proyecto:** 4 años

**Estado:** 1er año de ejecución.

**Proyecto 2. Proyecto FIASA-EELS-2022-009\_Desarrollo e implementación de tecnologías productivas en el cultivo de arroz, para aumentar la resiliencia de pequeños y medianos productores al cambio climático en Ecuador.**

**Tipo propuesta:** Proyecto I+D

**Fondos:** FIASA y Gasto corriente INIAP

**Fecha inicio:** abril 2022

**Responsable:** Roberto Celi

**Equipo multidisciplinario:** miembros del Programa de arroz, Lenin Paz, Luis Peñaherrera, Daniel Navia, Gladys Viteri, Elisa Quiala, Inés Tapay y Mónica Puga.

**Presupuesto:** \$ 884 418.00 USD

**Duración proyecto:** 4 años

**Estado:** 1er año de ejecución.

**Proyecto 3. Proyecto FIASA-EELS-2022-015\_Proyecto de investigación sobre enfermedades letales en la palma aceitera en Ecuador.**

**Tipo propuesta:** Proyecto I+D

**Fondos:** FIASA y Gasto corriente INIAP

**Fecha inicio:** abril 2022

**Responsable:** Digner Ortega

**Equipo multidisciplinario:** Silvia Zambrano, Mercedes Navarrete, Manuel Carrillo, Wuellins Durango, Ernesto Cañarte, Bernardo Navarrete, Wilmer Ponce, Danilo Vera, Karina Solis, Jimmy Pico, Julio Macas, Silvana Defaz, Darwin Hernández, Lenin Paz, Elisa Quiala, Noely Ruiz, Luis Peñaherrera, Eduardo Morillo.

**Presupuesto:** \$ 1 367.377,80 USD

**Duración proyecto:** 4 años

**Estado:** 1er año de ejecución

**Proyecto 4. Proyecto AIEA\_Fortalecimiento de capacidades para la prevención y el manejo de la marchitez por Fusarium de las Musáceas en América Latina y el Caribe.**

**Tipo de propuesta:** Proyecto Internacional. Participación con un componente en la inducción de mutaciones y la regeneración de plantas vía embriogénesis somática de banano William.

**Fondos:** OIEA, RFA/FONTAGRO y BID

**Responsable:** Antonio Bustamante

**Fecha de inicio:** Febrero de 2022

**Equipo multidisciplinario:** Elisa Quiala, Inés Tapay, Danilo Vera, Karina Solís, Eduardo Morillo, Iván Garzón, Walter Reyes, José Ochoa.

**Presupuesto:** 200.000 euros

**Duración proyecto:** 36 meses

**Estado:** 1er año de ejecución.

**Fecha probable inicio ejecución:** Febrero de 2022

#### **8. Publicaciones: (artículos científicos, manuales, boletines, etc.)**

- Quiala, E., Barbón, R., Mestanza, S. *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf of the interspecific hybrid of mahogany (*Swietenia macrophylla* King × *S. mahagoni* (L.) Jacq.). *Trees* **36**, 167–178 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02192-x>
- Elisa Quiala, Inés Tapay, Saúl Mestanza, Eloy Orellana, Gloria Cobeña, Gladys Viteri, Eddie Zambrano, Mónica Puga, Alma Mendoza, Sandy Díaz, Luis Peñaherrera. Tecnología para la producción de semilla de camote de sanidad controlada. Plegable No. 466. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5953>

#### **9. Participación en eventos de difusión científica, técnica o de difusión:**

- Taller de capacitación sobre embriogénesis somática, cultivo de anteras, citometría y uso de biorreactores de inmersión temporal. Impartido a técnicos contratados del proyecto de la AIEA y de Edición génica de la EETP y a dos técnicas del INIA de Venezuela. Celebrado del 26 al 28 de Octubre en el laboratorio de biotecnología EELS. Cuatro técnicos capacitados (2 técnicos FIASA- EETP y 2 investigadoras INIA, Venezuela)
- Charla de capacitación Aplicación de la biotecnología en la propagación y mejora de plantas. Auditorio de la EELS, Yaguachi, 16 de mayo de 2022. Impartida a 26 Estudiantes Universidad de Guayaquil - Facultad de Agronomía.
- Charla de capacitación en Estadística aplicada a las ciencias de la vida. Auditorio de la EELS, Yaguachi, 19 de mayo de 2022. Impartida a 31 personas entre técnicos de la EELS y pasantes de la Universidad de Guayaquil.

- Charla de capacitación en mejoramiento genético del cultivo de arroz, asistido por Biotecnología. Auditorio de la EELS, Yaguachi, 27 de junio de 2022. Impartida a 35 estudiantes de la Universidad Agraria del Ecuador.

#### **10. Propuestas de investigación presentadas:**

#### **11. Hitos/Actividades ejecutadas por el departamento (POA 2022)**

**Proyecto 1. Proyecto FIASA-EELS-2022-008\_Fortalecimiento de los programas de mejoramiento genético mediante herramientas biotecnológicas aplicadas en cinco cultivos de interés agrícola.**

#### **Objetivo general:**

Fortalecer los programas de mejoramiento genético mediante herramientas biotecnológicas aplicadas en cinco cultivos de interés agrícola.

#### **Objetivos Específicos**

- Componente 1. Establecer protocolos de regeneración de plantas vía embriogénesis somática en diferentes cultivos agrícolas de interés económico para el Ecuador.
- Componente 4. Determinar el impacto de las técnicas biotecnológicas implementadas y de la capacitación en el fortalecimiento de los programas de fitomejoramiento.

**Componente 1. Establecer protocolos de regeneración de plantas vía embriogénesis somática en diferentes cultivos agrícolas de interés económico para el Ecuador.**

**Actividad. 1.2 Desarrollo e implementación de un protocolo de embriogénesis somática a partir de dos híbridos F1 seleccionados de cafeto.**

#### **1.0 Antecedentes**

El Ecuador es uno de los 14 países del mundo donde se cultiva café arábigo (*Coffea arabica* L.) y café robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), las dos especies del género *Coffea* de mayor importancia en el mundo (Loor *et al.*, 2017). La producción de la especie *C. arabica* L. se concentra en Manabí especialmente en Jipijapa y la provincia de Loja; mientras que, *C. canephora*, puede encontrarse principalmente en Sucumbíos y Orellana. El país tiene condiciones agroclimáticas para fomentar el cultivo. Sin embargo, el café ecuatoriano, no compite con los principales exportadores de este cultivo en el mundo, como son Brasil y Vietnam, debido

a la pérdida de competitividad en el mercado por varias causas. La baja producción nacional provocada por la reducción del área cafetalera, prevalencia de cafetales improductivos, generalmente constituidos por variedades no mejoradas de baja producción de grano y susceptibles a roya, el uso de prácticas de manejo agronómico deficientes que generan una baja productividad. A lo anterior se añade, el efecto negativo del comportamiento errático del clima, que en los últimos años ha favorecido la incidencia de plagas y enfermedades como broca del fruto (*Hypothenemus hampei Ferr.*) y la roya anaranjada (*Hemileia vastatrix Berk& Br.*)(Sotomayor & Duicela, 1995; Cumbicus & Jiménez, 2012).

En estas circunstancias, la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí implementó un proyecto institucional orientado al desarrollo de híbridos intervarietales, a partir del cruzamiento de variedades resistentes a la roya como Catimor (Caturra x Híbrido de Timor), Cavimor (Catuai x Catimor) y Sarchimor (Villa Sarchí x Híbrido de Timor) con variedades arábigas puras (Caturra, Pache y Bourbón) e híbridos de tipo robusta procedentes de la región amazónica. Eso con el objetivo de generar nueva variabilidad donde se puedan identificar y seleccionar individuos que reúnan las características de alta producción por planta, morfológicamente de porte bajo y con tolerancia o resistencia a la roya. Estos híbridos deben multiplicarse de manera clonal para sembrarse en diferentes zonas productoras del país con el objetivo de validar la alta productividad y nivel de resistencia a la roya.

Sin embargo, en cafeto los métodos convencionales de propagación como esquejes o semillas, pueden perder rápidamente su viabilidad y requieren mucha mano de obra, al contrario, las técnicas biotecnológicas permiten la micropropagación masiva de genotipos deseables en menos tiempo (Gatica et al., 2007). En este sentido, la ESPAMMFL ha iniciado trabajos de investigación para lograr la propagación clonal de los materiales mediante el cultivo in vitro, sin resultados satisfactorios.

La embriogénesis somática, es un método de regeneración eficiente en café, a través de la manipulación del medio de cultivo y la aplicación de reguladores de crecimiento, se obtiene una tasa de multiplicación elevada, formando embriones a partir de células somáticas (directa), o requiriendo una fase de callo previa (indirecta), no solo permitiendo la propagación clonal, sino también multiplicar células con genes específicos (Avila-Victor et al., 2018; Gatica et al., 2007; Rica et al., 2008).



Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar un protocolo de propagación in vitro vía embriogénesis somática de cuatro híbridos de café con características superiores en cuanto a rendimiento y resistencia a roya.

## 2. Metodología

### 2.1 Selección de los materiales de café a propagar in vitro vía embriogénesis somática.

La selección de los materiales de café se realizó por parte del equipo técnico de la ESPAMMFL (Calceta, Manabí) y técnicos INIAP de la EEP. La colección se localiza en la ESPAMFL, en dos lotes uno con los híbridos de café tipo arábigo y el segundo lote con híbridos tipo robusta.

### 2.2 Colecta y establecimiento in vitro de explantes foliares (Fase de Formación de callos).

Se etiquetaron las plantas seleccionadas y se procedió al tratamiento fitosanitario para reducir la carga contaminante y facilitar el posterior establecimiento in vitro. Se aplicó una fertilización con Nitrógeno foliar una vez por semana para mejorar el estado fisiológico de la planta y sobre todo para estimular la emisión de nuevas hojas y su crecimiento. Además, se aplicó un tratamiento con fungicida (sulfato de cobre pentahidratado, 0.5 l. ha<sup>-1</sup>). A partir de los 15 días posteriores al tratamiento se inició la colecta de los explantes.

#### Localización y ubicación del ensayo.

La investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental Litoral Sur, ubicada en el Km 26 vía Duran- Tambo.

#### Ubicación Geográfica:

<b>Provincia</b>	Guayas
<b>Cantón</b>	San Jacinto de Yaguachi
<b>Parroquia</b>	Virgen de Fátima
<b>Sitio</b>	EELS
<b>Altitud (msnm)</b>	17 m.s.n.m
<b>Latitud</b>	79° 38' 35"
<b>Longitud</b>	2° 3'

**Material genético:** Se utilizaron hojas recolectadas a partir de los cuatro híbridos seleccionados en los lotes de campo de la ESPAMMFL.

**Colecta:** Se seleccionaron ramas ortotrópicas, se etiquetaron y colocaron en baldes con 2 L de una solución de cisteína (100 mg. l<sup>-1</sup>), cada balde se cubrió con una funda plástica para evitar la excesiva transpiración y secado de las hojas. El material colectado se trasladó al laboratorio de biotecnología de la EELS.

### 2.2.1 Ensayo 1: Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes foliares de cuatro híbridos de café.

#### Factores en estudio

- Genotipos de cafeto: cuatro híbridos (2 arábigos y 2 robusta)
- Tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio al 2,5%: Tres tiempos (20, 30 y 40 minutos)

#### Diseño experimental y análisis de datos:

Se utilizó un diseño de Bloques completo al Azar (DBCA) con arreglo factorial de 4x3. El ensayo estuvo conformado por 12 tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos para evaluar el efecto de diferentes tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio al 2,5 % en desinfección de explantes foliares de cuatro genotipos de cafeto.

Tratamientos	Genotipo	Tiempo de desinfección con NaOCl	Réplica (No. tubos/Trat.
1	K3	D1	25
2	K3	D2	25
3	K3	D3	25
4	F10	D1	25
5	F10	D2	25
6	F10	D3	25
7	LG-SO2	D1	25
8	LG-SO2	D2	25
9	LG-SO2	D3	25
10	COF-01	D1	25
11	COF-01	D2	25
12	COF-01	D3	25

**Metodología para la desinfección:** Se lavaron las hojas con abundante agua y la ayuda de una mota de algodón y una solución jabonosa (detergente líquido) para eliminar el polvo. Posteriormente se sumergieron en una solución de Celest (Fludioxonil) a una dosis de 1,5 ml.l<sup>-1</sup> por 1h y luego en la solución al 2.5% de hipoclorito de sodio durante 20, 30 y 40 min. En la cabina de flujo laminar, se retiró el hipoclorito de sodio y se enjuagaron dos veces con agua estéril y una vez con una solución estéril de agua con cisteína (100 mg. l<sup>-1</sup>). Seguidamente, se seleccionaron las hojas que sin síntomas de afectación por el hipoclorito y se cortaron en segmentos de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, eliminando la nervadura central y nervaduras

secundarias, los márgenes de la hoja, así como la zona apical y basal. Los segmentos se sembraron en los tubos de ensayo con el haz de la hoja en contacto con el medio de cultivo.

La evaluación del ensayo se realizó a los siete días y se determinaron las siguientes variables:

- Número de explantes contaminados (%)
- Número de explantes libre de contaminantes microbianos visibles (%)
- Número de explantes vivos (%)

El ensayo se repitió dos veces y a partir del análisis estadístico se eligió el mejor tratamiento para la desinfección de los explantes foliares. Con el tratamiento seleccionado se realizaron un total de cuatro siembras y los explantes establecidos se utilizaron para montar el ensayo de formación de callos.

### 2.2.2 Ensayo 2. Efecto del 2,4-D y la kinetina en la formación de callos a partir de segmentos foliares de cuatro híbridos de café.

#### Factores en estudio

- Genotipos de cafeto: segmentos de hoja de cuatro híbridos (K3, F10, LG-SO2 y COF-01)
- Dosis de 2,4 D + Kinetina: (D1, D2 y D3)

#### Diseño experimental y análisis de datos:

Se utilizó un diseño de Bloques completo al Azar (DBCA) con arreglo factorial de 4x3. El ensayo estuvo conformado por 12 tratamientos (Tabla 2).

**Tabla 2. Tratamientos para evaluar el efecto del 2,4-D y la Kinetina en la formación de callos.**

Tratamientos	Genotipo	Dosis de 2,4-D + Kinetina	Réplica (No. tubos/Trat.
1	K3	D1	25
2	K3	D2	25
3	K3	D3	25
4	F10	D1	25
5	F10	D2	25
6	F10	D3	25
7	LG-SO2	D1	25
8	LG-SO2	D2	25
9	LG-SO2	D3	25
10	COF-01	D1	25
11	COF-01	D2	25
12	COF-01	D3	25

**Metodología:** Los explantes (segmentos de hoja) establecidos in vitro (libres de contaminantes microbianos visibles) resultantes de las diferentes siembras se subcultivaron en tubos de ensayo con medio de cultivo descrito por Zamarripa, (1991) pero variaciones en la dosis de la auxina 2,4-D combinada con la kinetina, para evaluar la respuesta callogénica de los diferentes materiales. Se utilizaron 25 tubos por cada tratamiento y en cada tubo se distribuyó 20 ml de medio de cultivo (Tabla 2).

El cultivo se desarrolló en condiciones de oscuridad total a una temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ . A partir de la cuarta semana se inició la observación y evaluación de la respuesta de los explantes hasta la aparición de los callos.

A las ocho semanas se determinaron las siguientes variables:

- Número de explantes que formaron callos expresados en % (frecuencia de formación de callos).
- Tipo de crecimiento del callo de acuerdo a la escala de Santana (1992): se establecieron niveles del 0 al 4: donde el "0" se corresponde al no crecimiento de callo por los bordes del segmento y el "4" cuando hay un crecimiento de callo por los cuatro bordes del segmento foliar, correspondiendo al 90-100 % de crecimiento.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Infostat versión 2020 para Windows. Se aplicó un ANOVA factorial, para lo cual los datos fueron transformados con la ecuación  $x = \sqrt{x^{\circ} + 0.5}$ . La información que se muestra en el gráfico corresponde a las cifras originales sin transformar.

### **2.3 Inducción de callos embriogénicos (Fase de diferenciación).**

#### **Ensayo 3. Efecto del 6-BAP en la inducción de callos embriogénicos.**

Durante esta fase para la inducción de los callos embriogénicos en especies leñosas se requiere añadir al medio de cultivo un regulador del crecimiento del grupo de las citoquininas, en el caso específico del café el más utilizado es la 6-Bencilaminopurina (6-BAP).

#### **Factores en estudio**

- Genotipos de café: Callos de cuatro híbridos.
- Dosis de 6-BAP: (D1, D2 y D3)

#### **Diseño experimental y análisis de datos:**

Se utilizó un diseño de Bloques completo al Azar (DBCA) con arreglo factorial de  $4 \times 3$ . El ensayo estuvo conformado por 12 tratamientos (Tabla 3). El diseño experimental se muestra en la Tabla 3.

**Metodología:** Los explantes con callos obtenidos de los diferentes genotipos se fragmentaron transversalmente en cuatro porciones, se eliminó la porción de hoja y los fragmentos de callos

de aproximadamente 1 cm de longitud se distribuyeron a razón de cuatro en frascos de vidrio de 220 ml de capacidad. Los frascos de cultivo contenían 30 ml de medio de cultivo de diferenciación para la inducción de callos embriogénicos. Cada tratamiento contó con 16 réplicas (frasco), para un total de 66 callos sembrados por cada variante estudiada.

**Tabla 3. Tratamientos para evaluar el efecto del 6-BAP en la inducción de callos embriogénicos durante la Fase de diferenciación.**

Tratamientos	Genotipo	Dosis de 6-BAP	Nro de explantes/frasco	Réplica (No. tubos/Trat.
1	K3	D1	4	16
2	K3	D2	4	16
3	K3	D3	4	16
4	F10	D1	4	16
5	F10	D2	4	16
6	F10	D3	4	16
7	LG-SO2	D1	4	16
8	LG-SO2	D2	4	16
9	LG-SO2	D3	4	16
10	COF-01	D1	4	16
11	COF-01	D2	4	16
12	COF-01	D3	4	16

El cultivo se desarrolló en condiciones de oscuridad total a una temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ . A partir del tercer mes se inició la observación y evaluación de la respuesta de los explantes hasta la aparición de los callos embriogénicos o de embriones somáticos. Este ensayo tiene tres meses y se encuentra en curso.

### 3. Resultados

#### 3.1 Selección de los materiales de café a propagar in vitro vía embriogénesis somática.

La colaboración del equipo técnico de la ESPAMMFL y el programa de café y cacao de la EEP, INIAP permitió identificar dentro de las dos colecciones de la Politécnica de Manabí, cuatro híbridos con características superiores de rendimiento y resistencia a roya, de ellos dos de cada especie, para desarrollar el protocolo de clonación de plantas vía embriogénesis somática.

Los cuatro materiales seleccionados presentaban las mejores características productivas y fitosanitarias, de acuerdo a las evaluaciones periódicas realizadas por el equipo multidisciplinario



participante, donde se determinó la productividad de café cereza por planta y por año; así como el nivel de resistencia a roya (*Hemileia vastratrix* Verkeley & Brome).

En la Tabla 1 se muestran las características de los dos híbridos arábigos (F10 y K3) y en la Tabla 2 las características de los dos híbridos robusta (LG-S0-2 y COF-01).

**Tabla 1. Características de los híbridos de cafeto arábigos seleccionados por la ESPAMMFL**

<p>Híbrido F1 -F10</p> 	Lote de Origen	Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAMMFL), Cantón Bolívar, provincia de Manabí
	Ubicación de lote recolección material	ESPAMMFL
	Parentales	Bourbon rojo x Catimor
	Porte	Medio
	Respuesta a Roya	Resistente
	Potencial de rendimiento por planta	586 gramos café oro
	Respuesta a estrés hídrico	Medio
	Calidad en taza	En evaluación
<p>Híbrido F1 -K3</p> 	Lote de Origen	Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí MFL del Cantón Bolívar, provincia de Manabí
	Ubicación de lote recolección material	ESPAMMFL
	Parentales	Catuaí amarillo x Sarchimor 4260
	Porte	Medio
	Respuesta a Roya	Resistente
	Potencial de rendimiento por planta	650 gramos café oro
	Respuesta a estrés hídrico	Medio
	Calidad en taza	En evaluación

**Tabla 2. Características de los híbridos de cafeto robusta, seleccionados por la ESPAMMFL.**

<p>LG-S0-2</p> 	Lote de Origen	Parroquia Sevilla, Cantón Dorado de Cáscales, provincia Sucumbíos
	Ubicación de lote recolección material	Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí MFL del Cantón Bolívar, provincia de Manabí
	Parentales	Estación Napo Payamino Introducción 2024 – 4024 - 3013
	Porte	Medio
	Respuesta a Roya	Resistente
	Potencial de rendimiento por planta	689 gramos café oro
	Respuesta a estrés hídrico	Medio
	Calidad en taza	En evaluación
 <p>COF – 01</p>	Origen	Consejo Cafetalero Nacional Selección 01 provincia de Orellana
	Ubicación de lote recolección material	Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí MFL del Cantón Bolívar, provincia de Manabí
	Parentales	Mezcla café robusta amazónico
	Porte	Medio
	Respuesta a Roya	Resistente
	Potencial de rendimiento por planta	1170 gramos café oro
	Respuesta a estrés hídrico	Medio
	Calidad en taza	En evaluación

### 3.2 Colecta y establecimiento in vitro de explantes foliares (Fase de Formación de callos).

#### 3.2.1 Ensayo 1. Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes foliares de cuatro híbridos de café.

El tiempo de desinfección influyó significativamente en el porcentaje de explantes establecidos in vitro. El análisis factorial demostró que la respuesta al tratamiento de desinfección estuvo determinada en mayor medida por el genotipo (interacción tiempo de desinfección\*Híbrido) (ver análisis de la varianza Anexo 1). En el híbrido COF-01, K3 y LG-SO2, con un tiempo de 20 min

se lograron porcentajes de desinfección cercanos o superiores al 80%, mientras que el híbrido F10, registró los porcentajes más bajos (Fig. 1).

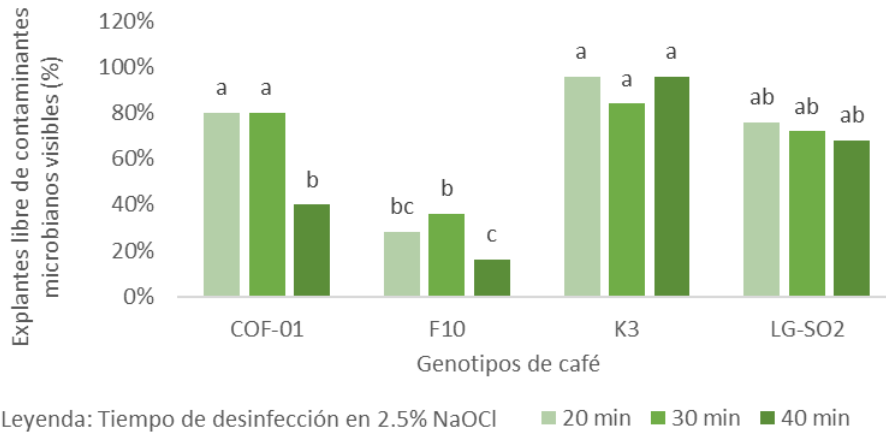


Figura 1. Efecto del tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio al 2.5% en la desinfección de explantes foliares de cuatro híbridos de café.

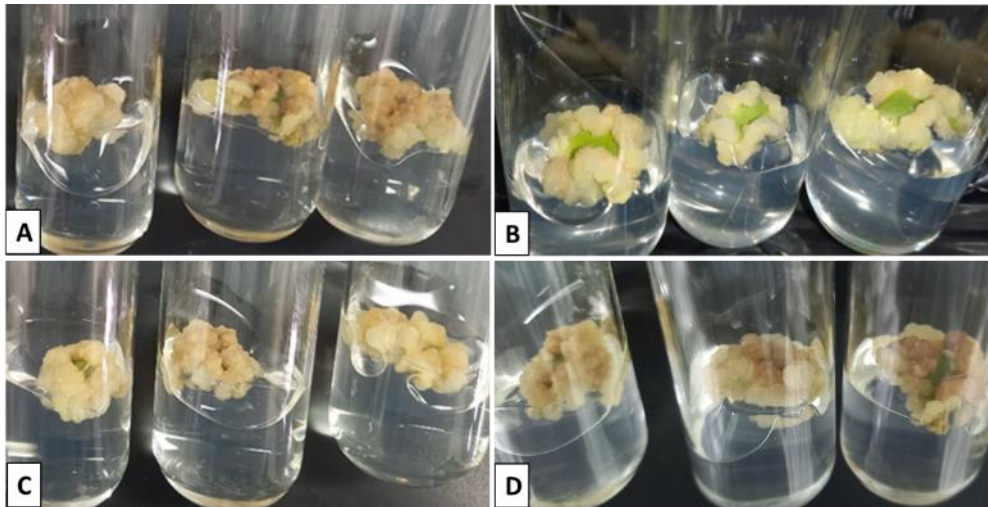
Se debe señalar que el error y el CV del ensayo son elevados, esto se debe a que se ha trabajado con material directamente colectado de campo y a esto se agrega que la hoja es un tipo de explante con una carga contaminante elevada, es por eso que en café la mejor estrategia para incrementar el número de explantes establecidos in vitro es realizar sucesivas siembras hasta alcanzar la cantidad deseada. Otra alternativa es clonar mediante enraizamiento de estaquillas la planta madre y cultivar un seto clonal en invernadero para pre-adaptar el material clonado mediante el control de los parámetros de cultivo, logrando así que los tratamientos preventivos sean estables y efectivos.

### 3.2.2 Ensayo 2. Efecto del 2,4-D y la kinetina en la formación de callos a partir de segmentos foliares de cuatro híbridos de café.

El 2,4-D y la kinetina fueron efectivas para la formación de callo a partir de los segmentos foliares en los cuatro híbridos de café. No existió diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de formación de callos, ya que la totalidad de los explantes en todos los tratamientos formaron callos tipo 4. Sin embargo, se observó diferencia en cuanto a la apariencia del callo mientras que en los tratamientos D2 y D3 se observaron callos de color blanco-cremoso (típico de esta especie) (Fig. 2), en el tratamiento D1 el callo formado fue de color blanco y aspecto esponjoso.



Probablemente esto se debe a que con esta concentración se crea un desbalance hormonal que favorece la acción citoquinínica de la kinetina con respecto a la auxina 2,4-D, lo que afectaría la consistencia del callo y su capacidad embriogénica. No obstante, este efecto solo se podrá comprobar cuando se evalúe la respuesta de estos callos en la inducción de callos embriogénicos durante la fase de diferenciación.



**Figura 2. Formación de callos tipo 4 en cuatro híbridos de café seleccionados por su rendimiento y resistencia a roya.**

### **3.3 Inducción de callos embriogénicos (Fase de diferenciación).**

#### **3.3.1 Ensayo 3. Efecto del 6-BAP en la inducción de callos embriogénicos.**

Los callos transferidos a medio de diferenciación adquirieron un color café después de la transferencia, de acuerdo a la literatura internacional esto es lo que debe ocurrir previo a la formación de los embriones somáticos o los callos embriogénicos (Fig. 3). La aparición de estas estructuras debe comenzar a partir del cuarto o quinto mes en adelante. Sin embargo, aunque este ensayo se encuentra en curso y apenas han transcurrido tres meses en los híbridos robusta ya se puede observar la formación de callos o agregados embriogénicos en estado primarios de desarrollo, muy homogéneos de color amarillo-cremoso (Fig. 4A), lo que se conoce como embriogénesis de alta frecuencia (ESAF); así como la formación de embriones somáticos en etapa avanzada de desarrollo (etapa de torpedo) conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF) (Fig. 4B) y este tipo de callo es el material ideal para el establecimiento de suspensiones celulares.

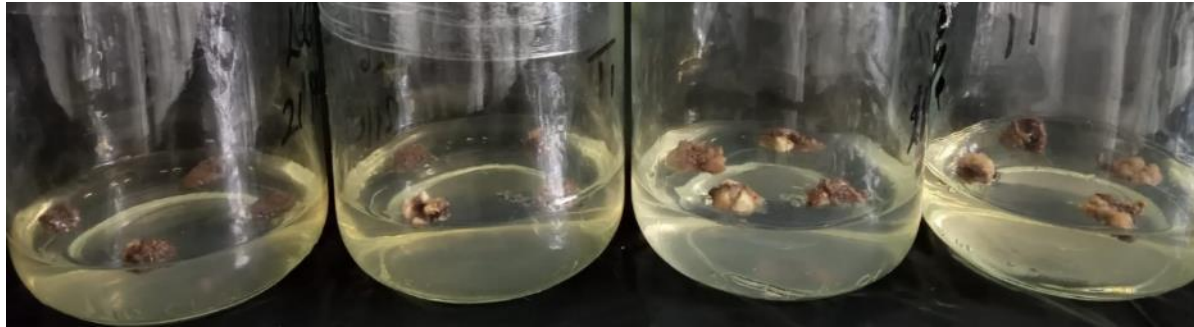


Figura 3. Callos de cuatro híbridos de café en medio de cultivo de diferenciación para inducir la formación de estructuras embriogénicas y embriones somáticos.

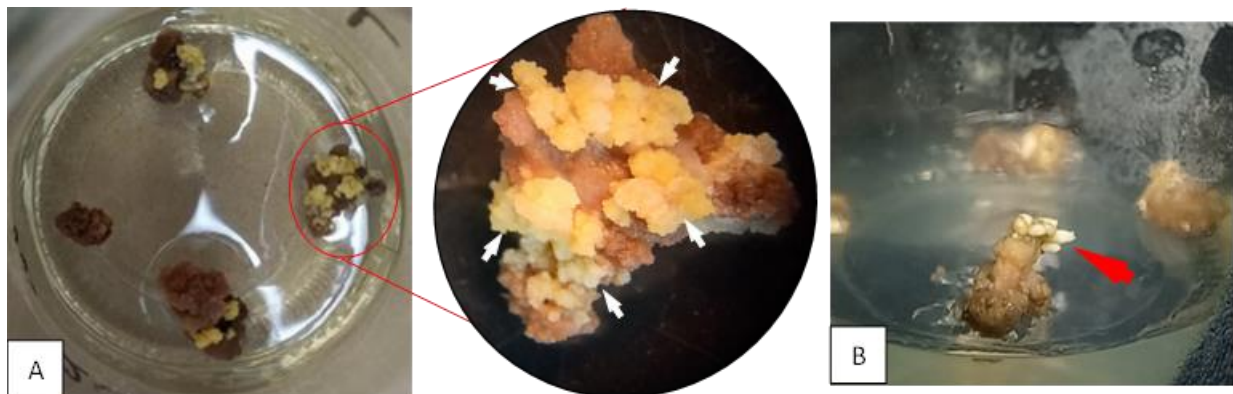


Figura 4. A) Callos de café en fase de diferenciación con formación de estructuras embriogénicas de alta frecuencia (ESAF, flecha blanca). B) Callos con la presencia de embriones somáticos en etapa de torpedo conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF, flecha roja).

#### 4. Conclusiones

- Se aprobó en comité técnico el protocolo para la fase de formación de callos a partir de segmentos foliares de café.
- Se estandarizó el protocolo de desinfección y se logró el establecimiento in vitro de material sano de los cuatro híbridos, con más de 264 explantes establecidos libres de contaminantes microbianos visibles.

- Se logró formar callos a partir de segmentos de la hoja de los cuatro híbridos, estos callos una vez repicados rindieron más de 900 fragmentos de callos, los cuales se transfirieron a la fase de diferenciación para la inducción de estructuras embriogénicas.
- Se cuenta con agregados embriogénicos ideales para el establecimiento de suspensiones celulares en los dos híbridos robusta.

### 5. Recomendaciones

- Iniciar el establecimiento de suspensiones celulares en aquellos materiales que ya han formado estructuras embriogénicas de alta frecuencia.

### 6. Bibliografía

Sondahl M.R, Spahlinger D y Sharp W.R. 1979. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in culture leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z Pflanzenphysiol* 94: 185-188.

Sondahl M.R, Nakamura T, Sharp W.R. 1991. Propagación in vitro del café. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M y Mroginsky L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 622- 642.

Tisserat, B. 1991. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. EN: *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. Dixon, R.A (ed). Oxford University Press. Oxford, England. pp 79-105. (Practical Approach Series)

van Boxtel, J y Berthouly, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from Coffee leaves: Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 7-17.

Barry- Etienne D, Bertrand B, Vasquez N, Etienne H. 2002. Comparison of somatic embryogenesis- derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated in vitro or ex vitro: morphological, mineral and water characteristics. *Annals of Botany* 90: 77-85.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Anexo 1. Análisis estadístico de varianza de dos factores (tiempo de desinfección y genotipo) y su interacción. Los datos fueron transformados con la ecuación  $x = \sqrt{x^o + 0.5}$

Nueva tabla : 5/2/2023 - 17:09:05 - [Versión : 30/4/2020]

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Libre de contam	300	0.37	0.34	60.62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	25.97	11	2.36	15.06	<0.0001
Tiempo Desinf	1.44	2	0.72	4.58	0.0110
Híbrido	15.21	3	5.07	32.34	<0.0001
Tiempo Desinf*Híbrido	9.32	6	1.55	9.91	<0.0001
Error	45.15	288	0.16		
Total	71.11	299			

Nueva tabla : 5/2/2023 - 17:39:51 - [Versión : 30/4/2020]

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Libre de contam	300	0.23	0.22	65.90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	16.65	5	3.33	17.97	<0.0001
Tiempo Desinf	1.44	2	0.72	3.88	0.0218
Híbrido	15.21	3	5.07	27.36	<0.0001
Error	54.47	294	0.19		
Total	71.11	299			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.14288

Error: 0.1853 gl: 294

Tiempo Desinf Medias n E.E.

30 min	0.51	100	0.04	A
40 min	0.38	100	0.04	A B
20 min	0.35	100	0.04	B

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

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.18088

Error: 0.1853 gl: 294

Híbrido Medias n E.E.

COF-01	0.70	75	0.05	A
F10	0.57	75	0.05	A
K3	0.21	75	0.05	B
LG-SO2	0.17	75	0.05	B

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

## **Actividad 1.4. Desarrollo de un protocolo de embriogénesis somática a partir de inflorescencias masculinas inmaduras de banano Williams (Método de las inflorescencias).**

### **1.0 Antecedentes**

El protocolo de embriogénesis somática a partir de inflorescencias masculinas inmaduras de banano es más corto que el método de los *Scalps*, ya que abarca entre 14 a 16 meses hasta que se logra la regeneración de plantas a partir de los embriones somáticos, el tiempo está en dependencia del genotipo y la condición fisiológica del explante inicial (inflorescencia).

### **2.0 Metodología**

#### **2.1. Inducción de callos embriogénicos a partir de inflorescencias masculina inmaduras.**

**Material vegetal:** Se recolectaron inflorescencias masculinas de banano Williams en las fincas BANAPORTI y ORHID, ubicadas en el cantón el Triunfo. Las inflorescencias se redujeron a 2,5 cm de largo (Escalant et al., 1994), se desinfectaron superficialmente con etanol al 70% por 5 min y luego se realizó un enjuague con agua destilada, previamente esterilizada en autoclave.

**Obtención de callo embriogénico:** En condiciones de cabina de flujo laminar, con ayuda de un estereoscopio se procedió a la extracción de cada inflorescencia (manos florales) ubicadas entre los nudos siete a dieciséis, contados a partir del ápice floral. De manera inmediata las manos florales se transfirieron al medio de inducción de callo MIC descrito por Escalant et al. (1994), el cual contiene auxinas ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). Se gelificó el medio con 7 g. l<sup>-1</sup> de agar-agar y se distribuyó a razón de 30 ml por frasco de vidrio de 220 ml de capacidad. Las manos florales se mantuvieron bajo oscuridad a 26 ± 1 °C hasta la formación de los callos embriogénicos.

A partir del cuarto mes de cultivo se inició la observación y evaluación de la respuesta de los explantes a la formación de callos.

#### **2.2 Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas**

Se inocularon aproximadamente 240 mg de callo embriogénico, que contenía abundantes embriones somáticos en etapa de torpedo, en 10 ml de MIC contenidos en frascos de cultivo de 135 ml de capacidad (frascos no idóneos) para el establecimiento de la suspensión celular embriogénica I (SCE I). Los frascos con los cultivos en suspensión se mantuvieron en oscuridad a 26 ± 1 °C bajo agitación orbital a 100 rpm y con recambio de medio fresco (50% del medio) cada siete días.

### **3.0 Resultados**

### 3.1 Inducción de callos embriogénicos a partir de inflorescencias masculina inmaduras.

Se realizaron siembras semanales de inflorescencias masculinas inmaduras de banano siguiendo el protocolo del CATIE (Fig. 1A, 1B y 1C). Se logró establecer in vitro 2900 inflorescencias a partir del banano William Gigante, de las cuales el 95% formó callos (Fig. 1D). De los primeros 300 explantes evaluados, el 17,5% formó callos embriogénicos ideales (Fig. E y 1F)

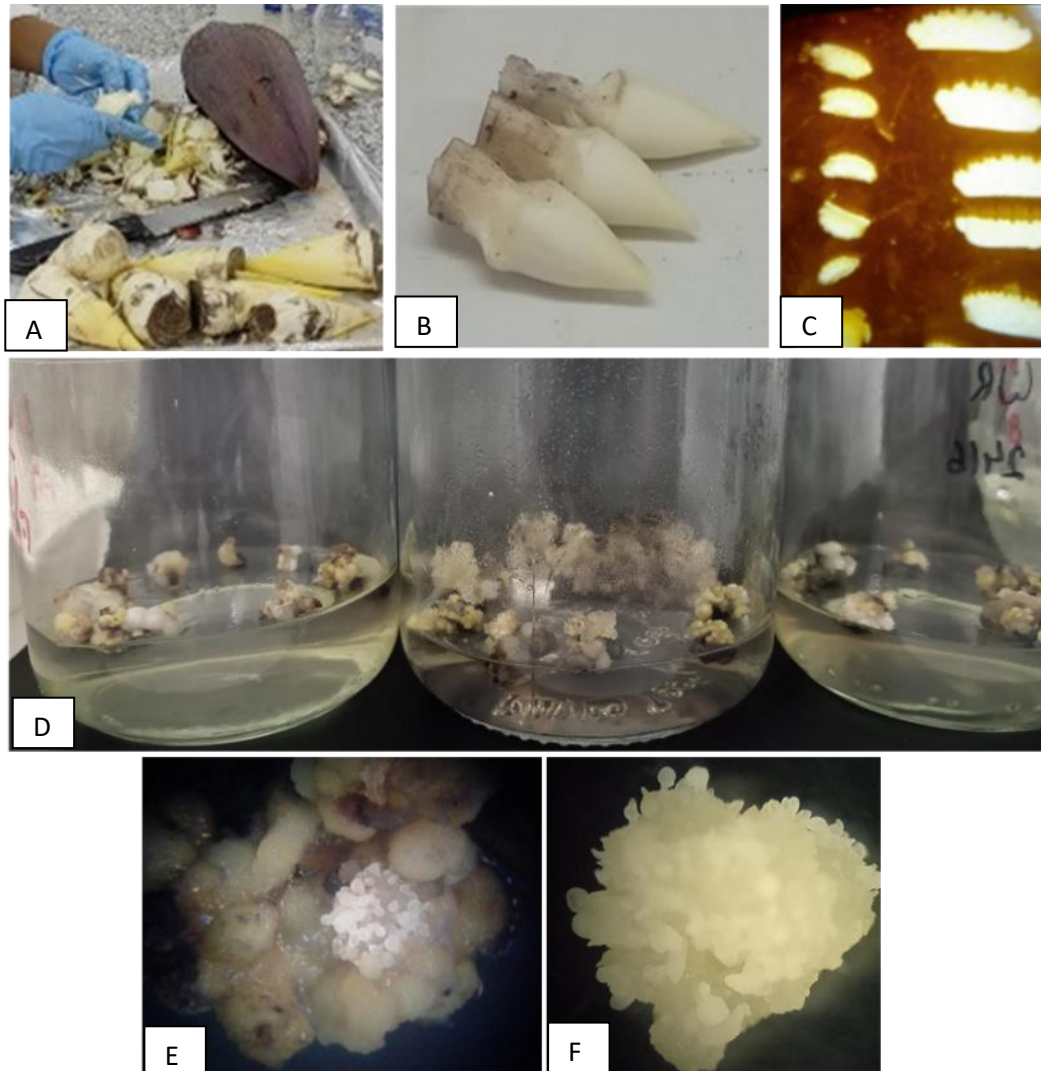


Figura 2. Inducción de callos embriogénicos en banano Williams. A, B) Chiras colectadas en plantas de campo (3 a 10 semanas) y reducidas a 2,5 cm en el laboratorio. C) Inflorescencias extraídas de las chiras. D) Callos formados en medio de cultivo semisólido. E y F) Callos embriogénicos de alta frecuencia ideales para el establecimiento de suspensiones celulares.

### 3.2 Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas.

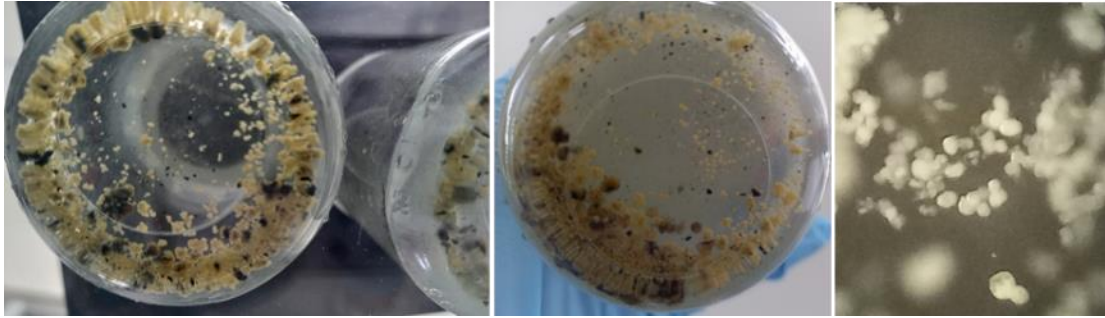


Figura 1. A y B) Callos embriogénicos ideales inoculados en frascos de 135 ml establecidos con medio de cultivo líquido y mantenidos en agitación constante para la formación de la suspensión celular. C) Proembriones en formación, observados en la suspensión de agregados embriogénicos.

#### 4. Conclusiones

- Se logró establecer la fase de formación de callos embriogénicos en el protocolo de embriogénesis somático de banano y la inducción de callos ideales.

#### 5. Recomendaciones

- Continuar con el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas y realizar nuevos establecimientos de inflorescencias para mantener el banco de callos in vitro.

#### 6. Bibliografía

- Barranco, L.A. (2001): Embriogénesis somática en banano (*Musa AAAB*, cv. „FHIA-18”) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba; 107p
- Cabrera, M., J. López, R. Gómez, N. Montano, M. Reyes, D. Reynaldo, J.C Ventura, A. Santos, M. García, M. Basail y E. Espinosa (2002): Multiplicación, histodiferenciación y regeneración de Suspensiones Celulares Embriogénicas en plátano „Navolean” (AAB). *Biotecnología Vegetal*. 2: 115-117.
- Chong, B., R. Gómez, M. Reyes, I. Bermúdez Carballoso, J. Gallardo, M. Freire, L. Posada, I. Herrera y R. Swennen (2005): Nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares de „Grande naine” (AAA). *InfoMusa*. 14(1):13-17.

- Côte, F., M. Folliot, R. Domergue y C. Dubois (2000): Field performance of embryogenic cell suspension-derived banana plants (Musa AAA, cv. Grand Naine). *Euphytica*. 112: 245-251.
- Cronauer, S.S. y A.D. Krikorian (1983): Somatic embryos from cultured tissue of triploid plantains (Musa ABB). *Plant Cell Reports*. 2: 289-291.
- Daniels, D., R.G. Kosky y M.R. Vega (2002): Plant regeneration system via somatic embryogenesis in the hybrid cultivar FHIA-21 (Musa sp. AAAB group). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 38: 330-333.
- Escalant, J.V., C. Teisson y F. Côte (1994): Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (Musa spp.). *In vitro Cell. Dev. Biol.* 30: 181-186.
- Escalant, J.V. y S.M. Jain (2004): Banana improvement with cellular and molecular biology, and induced mutations: Future and perspectives. En: S.M. Jain y R. Swennen (eds), *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations*. pp. 359-367. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA



## **Actividad 1.6 Desarrollo e implementación de un protocolo de embriogénesis somática en el laboratorio de Biotecnología de la EELS a partir de dos híbridos seleccionados de cacao.**

### **1.0 Antecedentes**

El Ecuador en el año 2019 se convirtió en el primer exportador de cacao en grano en América y ocupa el cuarto puesto en el mundo, lo que representa un aumento del 168% en los últimos 10 años (Revista Vistazo 2020). En el país actualmente se cultivan varios tipos de cacao, pero la variedad conocida como NACIONAL es la más buscada entre los fabricantes de chocolate, por la calidad de sus granos y la finura de su aroma (ANECACAO 2015).

El cultivo es afectado por enfermedades como la moniliasis, escoba de bruja y mazorca negra, las cuales causan pérdidas económicas. El control más apropiado sería el uso de genotipos resistentes; sin embargo, según Arévalo et al. (2004), hasta el momento no se ha conocido genotipos de cacao con resistencia a estas tres enfermedades. No obstante, existen clones con diferente grado de tolerancia que podrían utilizarse en un plan de mejoramiento genético; estos planes de mejora, puede acelerarse con el uso de la biotecnología. En este sentido, en cacao las técnicas de reproducción asexual como el cultivo in vitro y la regeneración de plantas vía embriogénesis somática permiten la reproducción masiva en poco tiempo, la conservación de los recursos fitogenéticos (Villalobos y Aguilar 1990) y facilitan la implementación de técnicas avanzadas de ingeniería genética para la obtención de materiales mejorados.

En consecuencia, el laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP desarrollará en el marco del proyecto FIASA-EELS-2022-008 un protocolo de regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de estaminodios de la flor de los clones de cacao EETP-800, EETP-801 y el híbrido T22, materiales seleccionados por el Programa de Café y Cacao. En este informe se presentan los avances alcanzados durante el establecimiento de la fase de formación de callos primarios y secundarios.

**Objetivo General:** Implementar un protocolo de embriogénesis somática en el laboratorio de Biotecnología de la EELS a partir de híbridos seleccionados de cacao.

#### **Objetivos específicos**

- Seleccionar materiales de cacao de alta productividad para iniciar el cultivo in vitro.
- Establecer la fase de formación de callos primarios a partir de explantes florales de materiales de cacao del programa de café y cacao del INIAP.

## 2.0 Metodología

### 2.1 Selección de materiales de cacao

La selección de los materiales de cacao se realizó por parte del Programa de Café y Cacao de la EELS. Los materiales seleccionados corresponden al cacao fino y de aroma 800 y 801 y al híbrido T22, este último resultante de un cruzamiento de CNN x Criollo realizado por el Programa de Café y Cacao de la EELS. Las características de los materiales se muestran en la tabla 1 de Anexos.

### 2.2 Establecimiento de la fase de formación de callos en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) del programa de café y cacao del INIAP.

#### Localización y ubicación del ensayo.

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología, en la Estación Experimental Litoral Sur ubicado en la Parroquia Virgen de Fátima (km 26), perteneciente al cantón San Jacinto de Yaguachi, provincia del Guayas.

#### Material Genético.

Se utilizaron botones florales recolectados en árboles ubicados en la EELS, identificados como: EETP-800, EETP-801, EEB01 y EEB008. Se utilizaron estos clones para establecer el método de desinfección más efectivo, debido a que los árboles del T22 no tenían flores al momento de establecer el ensayo in vitro.

Para el desarrollo del protocolo de embriogénesis somática se utilizó el protocolo descrito por García et al. (2018). El medio de cultivo para la formación de callos primarios estuvo compuesto por: ½ MS sin vitaminas (2.15 g), Tiamina (2 mg), Mio-inositol (200 mg), Ácido cítrico (25 mg), 2,4-D (2 mg), Glicina (2 mg), Glutamina (250 mg), Glucosa (20 g), dosis de TDZ (0; 0,005; 0,0125 y 0.025 mg), Phytigel (2 g) y pH 5.8.

#### 2.2.1 Ensayo 1: Efecto del tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio al 1% en la desinfección de explantes florales de cacao.

**Material vegetal:** Se utilizarán flores cerradas colectadas de diferentes clones de cacao seleccionados al azar con el objetivo de estandarizar un tratamiento de desinfección que sea efectivo y estándar para la mayoría de los clones. En este caso se incluyeron los clones EEB01 y EEB008 de la colección Isabella de la EELS

#### Factor en estudio

- Tres tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio al 1,0 %: 20, 25 y 30 minutos.

#### Diseño experimental y análisis de datos:

Se utilizó un diseño de Bloques completo al Azar (DBCA) con arreglo grupal de 3x3. El ensayo estuvo conformado por 15 tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos para evaluar el efecto de diferentes tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio al 1,0% durante la desinfección de explantes florales de cacao.

Tratamientos	Tiempo de desinfección	No. Exp/frasco (estaminodio)	Réplica (No. frasco/ Tratamiento)
1	20 min	20	25
2	30 min	20	25
3	40 min	20	25
4	20 min	20	25
5	30 min	20	25
6	40 min	20	25
7	20 min	20	25
8	30 min	20	25
9	40 min	20	25

La evaluación del ensayo se realizó a los 7 días y se determinaron las siguientes variables:

- Número de explantes contaminados (%)
- Número de explantes libre de contaminantes microbianos visibles (%)
- Número de explantes vivos (%)

A partir del análisis estadístico se eligió el mejor tratamiento para la desinfección de los explantes florales.

### **2.2.2 Ensayo 2: Efecto del 2,4-D y el Thidiazuron (TDZ) en la formación de callos primarios y callos secundarios, a partir de explantes florales de cuatro clones de cacao del programa de café y cacao de la EELS.**

Este ensayo se estableció hace cinco días, por lo que se encuentra en curso.

#### **Factor de estudio:**

En el actual estudio se evaluarán los siguientes factores:

- Cuatro genotipos: EETP-800, EETP-801, EEB1 y EEB008 (*Theobroma cacao* L).
- Cuatro dosis del regulador del crecimiento TDZ: D0; D1; D2; D3; D4.

#### **Diseño experimental y análisis de datos:**

En la presente investigación se utilizó un diseño Bloques completo al Azar (DBCA) con arreglo grupal 4 x 4.

Tabla 2. Tratamientos para evaluar el efecto del 2,4-D combinado con diferentes dosis de TDZ en la FCP y FCS de cuatro clones de cacao.

Tratamientos	Genotipos	Dosis de 2,4-D (mg l <sup>-1</sup> )	Dosis de TDZ (mg l <sup>-1</sup> )	No. Exp/ placa (estaminodios)	Réplica (No. placas/Tratamiento)
1	EETP-800	2	0	20	25
2	EETP-801	2	0	20	25
3	EEB1	2	0	20	25
4	EEB008	2	0	20	25
5	EETP-800	2	D1	20	25
6	EETP-801	2	D1	20	25
7	EEB1	2	D1	20	25
8	EEB008	2	D1	20	25
9	EETP-800	2	D2	20	25
10	EETP-801	2	D2	20	25
11	EEB1	2	D2	20	25
12	EEB008	2	D2	20	25
13	EETP-800	2	D3	20	25
14	EETP-801	2	D3	20	25
15	EEB1	2	D3	20	25
16	EEB008	2	D3	20	25

Se evaluarán las siguientes variables:

**Porcentaje de contaminación:** Por simple visualización se procederá a contar el número de explantes contaminados al finalizar la primera etapa del cultivo (a los 14 días).

**Frecuencia de formación de callo (%):** Se determinará sobre la base del número de explantes con presencia de callos versus el número de explantes sembrados al inicio del ensayo x 100 y el resultado se expresará en porcentaje de formación de callo por cada tratamiento a los (14, 21 y 28 días).

**Tamaño del callo:** Al finalizar la segunda etapa del cultivo (20 días) esta variable se medirá y por observación de acuerdo a una escala de 0-4, donde cero es el valor nulo de formación de callo y 4 el máximo valor de formación de callo embriogénico.

#### **Análisis estadístico**

Se utilizará el paquete de programas INFOSTAT versión 2020 para el análisis estadístico de los datos. Una vez determinado que los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se aplicó un ANOVA factorial y para determinar el grado de

significación entre las medias se empleó la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). En el caso de los datos de frecuencia de formación de callos existían valores nulos por lo que se procederá a transformar los datos mediante la ecuación  $x' = \sqrt{x + 0.5}$ . Los valores que se muestran en los gráficos corresponden a los valores sin transformar.

### 3. Resultados

#### 3.2.1 Ensayo 1: Efecto del tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio al 1% en la desinfección de explantes florales de cacao.

El tratamiento de las flores con una solución de hipoclorito de sodio al 1% fue efectiva independientemente del tiempo de desinfección utilizado, ya que no existió diferencias significativas entre los tratamientos. En todos los casos se logró más del 99% de explantes libres de contaminantes microbianos. Por lo que se establece el tratamiento con hipoclorito de sodio al 1% durante 20 min como el más adecuado para la desinfección de las flores de los cuatro clones en estudio.

Los explantes establecidos in vitro se mantuvieron en observación para dar seguimiento a su posible respuesta en el medio de formación de callo utilizado, recomendado por García et al. (2018). Y se pudo determinar que todos los explantes formaron callo en un porcentaje superior al 60%. Este resultado es alentador teniendo en cuenta que la formación de callos primarios en cacao puede ser difícil de lograr en algunos clones. Lo observado en este ensayo sirvió para diseñar el ensayo 2 que en estos momentos se encuentra en curso y donde se evalúan diferentes tratamientos para la formación de callos primarios. En la figura 1 se puede observar la formación de callos a los 21 días de cultivo y la formación de callos secundarios después que estos fueron transferidos a medio de cultivo fresco.

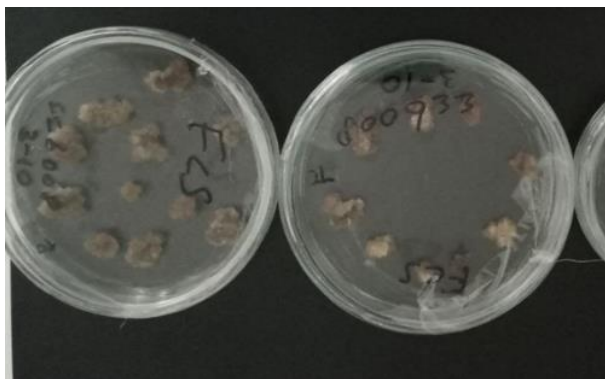


Figura 1. Formación de callos primarios (FCP) a partir de los estaminodios de la flor de cacao de los materiales EEB1 y EEB008, en el medio de cultivo recomendado por García et. al. (2018).

En la figura 2 se muestra el esquema de trabajo para el establecimiento in vitro libre de contaminantes microbianos visibles y la inducción de los callos a partir de los estaminodios de la flor de cacao. Toda vez que se tenga el resultado del Ensayo 2 donde se prueban diferentes combinaciones hormonales, quedaría estandarizado el protocolo para la fase de formación de callos primarios y secundarios.

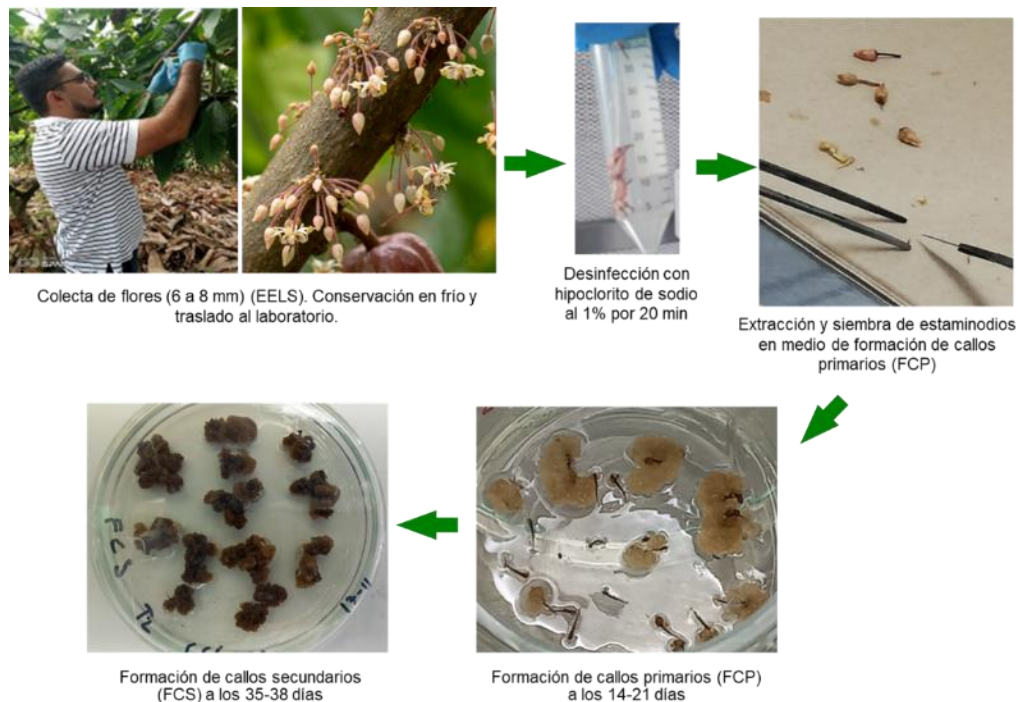


Figura 2. Procedimiento para el establecimiento in vitro y la inducción de callos a partir de estaminodios de la flor de cacao (Laboratorio de Biotecnología EELS).

#### 4. Conclusiones

El protocolo descrito en la literatura, elegido como modelo a seguir y adaptar para desarrollar la embriogénesis en los materiales de cacao del INIAP permitió en corto tiempo y desde el primer ensayo lograr el establecimiento in vitro exitoso de los explantes florales y la inducción de los callos primarios.

#### 5. Recomendaciones

- Continuar estandarizando las diferentes fases de la embriogénesis somática, utilizando el protocolo descrito por García et al. (2018) como base para realizar las adaptaciones necesarias para los materiales de cacao INIAP.

## 6. Bibliografía

ANECACAO. (2015). Asociación Nacional de Exportadores de cacao. Ecuador.

Arévalo, E., Zuñiga, L., Arévalo, C., & Adriazola, J. (2004). Manejo integral del cultivo y transferencia de tecnología en la Amazonía. Instituto de cultivos tropicales, Peru-Lima.

Esan, E. B. (1977). Tissue culture studies on cocoa (*Theobroma cacao* L.). A supplementation of current research en: proceeding fith international coference on cocoa. Nigeria.

López Baez, O., Bollon, H., Álvarez, M., & Pétiard, V. (1990). Ex-vitro perfomance and nuclear DAN ploidy of cocoa plants regenerated by somatic embryogenesis. International cocoa research conference, Nigeria.

Reinert, J. (1958). Morphogenese and ihre kontrolle an gewegerkulturen aus karotten. Naturewissenschaften.

Revista Vistazo. (2020). Análisis de las exportaciones del cacao Ecuatoriano en grano en el periodo 2008 al 2018. Revista metropolitana de Ciencia Aplicadas. 19(1-9).




Solano Sánchez, W. (2008). Embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*THEOBROMA CACAO* L.) Obtenidos en el programa de mejoramiento genético del CATEI. Soluciones para el ambiente y desarrollo, Turrialba-costa Rica.

Valarezo Cueva, R. (2015). Obtención de callos embriogénesis apartir de explantes florales en 2 clonoes de cacao (*Theobroma cacao* L.). Universias Técnica de Machala, Unidad Académica de Ciencias Agropecuaria, Ecuador-Machala.

Villalobos, V. M., & Aguilar, M. E. (1990). Production of cacao plants (*Theobroma cacao* L.) Via micrografting of somatic embryos.

## Anexos

Tabla 1. Principales características de los clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados para iniciar el cultivo in vitro.

CARACTERÍSTICAS			
	INIAP-EETP-800 “Aroma Pichilingue”	INIAP-EETP-801 “Fino Pichilingue”	Híbrido CCN x Criollo T22
<b>ORIGEN</b>	ECUADOR	ECUADOR	ECUADOR
<b>FRUTO</b>	Forma: Elíptico, Lomos: Pareados y ligeramente rugosos, Color inmaduro: Verde, Color maduro: Amarillo intenso, Índice: 20 mazorca	Forma: Oblongo, Lomos: Pareados y rugosos, Color inmaduro: Verde, Color maduro: Amarillo verdoso, Índice: 18 mazorcas.	Por describir por parte de programa de café y cacao
<b>FLOR</b>	Pigmentación de estambres: Roja.	Pigmentación de estambres: Rojo claro.	Por describir por parte de programa de café y cacao
<b>SEMILLA</b>	Forma: Elíptica, Tipo: Mediana, Color: Morado claro, Índice: 1,3 g.	Forma: Elíptica, Tipo: Grande, Color-. Orado oscuro, Índice: 1,4g.	Por describir por parte de programa de café y cacao
<b>HOJA</b>	Color de brotes tiernos: Rojo oscuro.	Color de brotes tiernos: Rojos claro.	Por describir por parte de programa de café y cacao
<b>REACCION A PRINCIPAL ENFERMEDADES</b>	Escoba de bruja: Resistente, Monilla: Resistente, Mal de machete: N.D.	Escoba de bruja: Resistente, Monilla: Resistente, Mal de machete: N.D.	Por describir por parte de programa de café y cacao
<b>RANGO DE RENDIMIENTO</b>	Kg/Ha: 2.500 a 3.030	Kg/ Ha: 2.740 a 3.000	Por describir por parte de programa de café y cacao
<b>SABOR, AROMA y % GRASA</b>	Cacao y frutal, Floral y N.D.	Cacao, Floral 3.5/5 y N.D.	Por describir por parte de programa de café y cacao
<b>Fenotipo del árbol</b>			



## **Actividad 1.8 Desarrollo e implementación de un protocolo de embriogénesis somática a partir de embriones de palma aceitera obtenidos por autofecundación.**

### **1. Antecedentes**

La palma de aceite se ha constituido en uno de los cultivos más importantes por su alta productividad, unida a su naturaleza perenne, ha llevado a una expansión acelerada de las áreas sembradas y su agroindustria tiene el potencial de impactar en las áreas económicas, sociales y ambientales. La palma aceitera es una especie monocotiledónea, leñosa, y alógama dispone de tallo único, con un solo ápice de crecimiento con ausencia de brotes o ramas laterales, lo cual representa un problema para la propagación vegetativa convencional como injertos o acodos (Kanchanapoom et al., 2010). Por esta razón, la micropropagación constituye una alternativa para la clonación de híbridos y parentales con excepcionales características, tales como alta producción de racimos, estípites cortos o de crecimiento lento, frutos de mayor tamaño con alta tasa de extracción de aceite, aceite con altos contenidos de ácidos grasos monoinsaturados y resistentes o tolerantes a la pudrición del cogollo (Rocha, 2007). Se ha demostrado que la productividad de los clones élites de palma aceitera son del 40 a 50% superior que las plantas producidas a partir de semillas (Rohani et al., 2003). En el caso de la palma de aceite, la embriogénesis somática es la técnica de cultivo in vitro que mejor funciona para estos fines. En este proceso morfogénico las células somáticas se convierten en estructuras que se asemejan a embriones cigóticos a través de una serie ordenada de etapas embriológicas características sin fusión de gametos (Jiménez et al., 2001). Esta ruta de desarrollo puede ser inducida por muchos factores, como explantes, medios, hormonas y condiciones de cultivo (Fehér et al., 2003). Entre los diferentes análogos de auxina, el 2,4-D ha sido el más comúnmente aplicado para la inducción de SE. Sin embargo, aunque existe un grado de similitud muy elevado entre los diferentes protocolos descritos, no existe una dosis de auxina universal que funcione para todos los individuos, con lo cual es necesario diseñar ensayos con diferentes concentraciones para encontrar la dosis óptima en función del genotipo. Después de la fase de inducción de callos siguen cuatro fases que son necesarias hasta obtener una planta completa de palma aceitera (diferenciación, maduración, germinación y aclimatización) el proceso completo de embriogénesis somática en palma aceitera comprende entre 14 a 16 meses.

El desarrollo de este protocolo de regeneración de plantas a partir de la región meristemática de embriones germinados in vitro, abre la posibilidad de clonar plantas que se seleccionen in vitro

por su tolerancia a diferentes factores abióticos, por lo que podría convertirse en una técnica complementaria para el mejoramiento genético en palma aceitera.

### **Objetivo**

Establecer un protocolo de regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de la región meristemática de plántulas in vitro de palmas aceiteras del Ecuador.

### **Objetivos específicos**

Identificar genotipos de palma *E. guinnensis* para la obtención de genotipos autofecundados.

Desarrollar un protocolo de embriogénesis somática a partir de meristemas de embriones de palma aceitera germinados in vitro.

## **2. Metodología**

### **2.1 Identificación de genotipos para los cruzamientos y autofecundaciones**

Esta actividad se desarrolla en dos estaciones la EESD y la EELS. El programa de palma aceitera de la EESD realizó en el 2022 seleccionó plantas progenitoras duras y pisíferas para realizar autopolinizaciones y cruzamientos dirigidos entre progenitores guinnensis. Lo anterior con el objetivo de garantizar la entrega de material vegetal de partida (frutos inmaduros de palma aceitera) para que el laboratorio de biotecnología pudiera germinar in vitro los embriones cigóticos y formar plántulas a partir de las cuales se extraerían las regiones meristemáticas para iniciar la fase de formación de callos del protocolo de embriogénesis somática.

Material Genético: De acuerdo con el programa de palma, se realizaron tres cruzamientos dirigidos entre *E. guineensis* Dura x *E. guineensis* Pisífera identificadas como las plantas 388-A x 12-366, la planta 3A-360 x 3B-08 y la planta 13B-56 X 12-366. Una vez que los racimos alcanzan las 13 semanas después de la antesis se cosechan y los frutos se entregan al laboratorio de biotecnología.

Germinación de embriones: Los embriones cigóticos fueron extraídos de los frutos y se establecieron en medio para la germinación. Una vez que estos embriones formaron plantas robustas (de 2-3 meses) fueron utilizados para establecer el ensayo 1.

### **2.3 Ensayo 1 Efecto de la dosis de 2,4-D en la formación de callos a partir de regiones meristemáticas de plantas in vitro.**

Las plántulas obtenidas de embriones germinados in vitro se decapitaron a una altura de 2 cm. Se tomaron las regiones meristemáticas y se fraccionaron en tres segmentos de aproximadamente 0.5 cm de longitud. Los fragmentos fueron sembrados en forma vertical en un medio de cultivo basal N6 con diferentes dosis de 2,4-D (50, 100, 150, 200 mg/L). Se

distribuyeron tres segmentos por frasco de 135 ml de capacidad con 30 ml de medio de cultivo de formación de callos con las diferentes concentraciones de 2,4-D. A partir del 3er mes se comenzará a monitorear y a registrar la frecuencia de formación de callos.

Este ensayo dura de cinco a seis meses y cada mes a partir del tercer mes se registra la frecuencia de formación de callos y los explantes se transfieren, cada mes, a medio de cultivo fresco de igual composición durante todo el proceso de inducción (n=50). Cada mes se evaluará la frecuencia de formación de callos a los 3, 4, 5 y 6 meses.

Este ensayo tiene menos de un mes de establecido, por lo que se encuentra en curso. En la Figura 1, se puede apreciar un esquema del procedimiento utilizado para el protocolo de embriogénesis somática a partir de la región meristemática de plantas in vitro de palma aceitera.

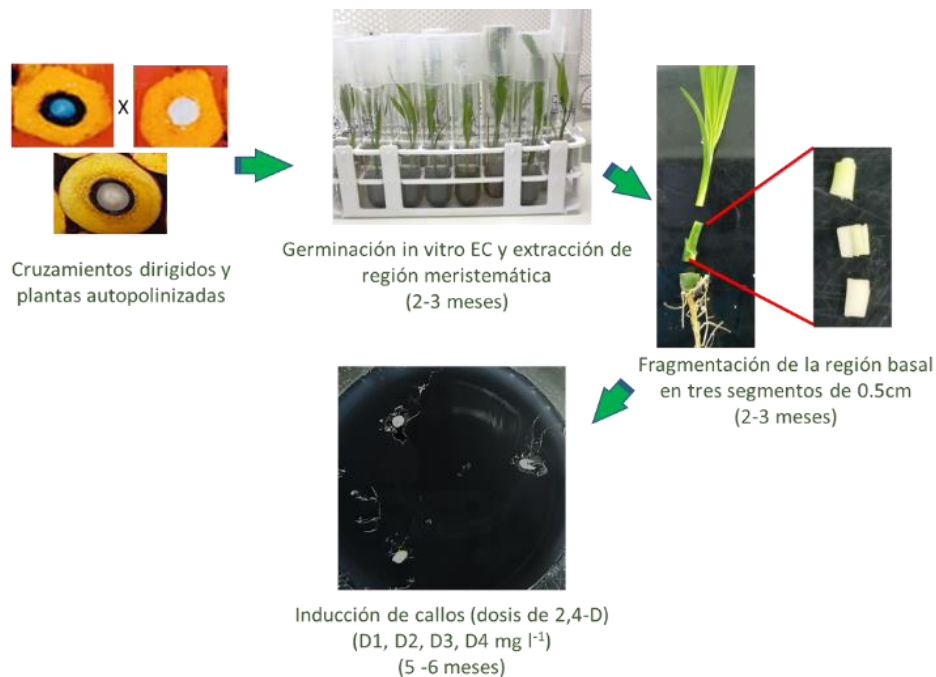


Figura 1. Esquema de trabajo para la inducción de callos a partir de regiones meristemáticas de plantas in vitro de palma aceitera.

#### 4. Conclusiones

Se logró establecer el primer ensayo para la inducción de callos a partir de regiones meristemáticas de plantas in vitro de palma aceitera.

#### 5. Recomendaciones

Establecer más réplicas de este ensayo, para evaluar con mayor precisión el efecto de la dosis de 2,4-D en la formación de callos de palma aceitera.

**Actividad. 1.9** Desarrollo e implementación de un protocolo de embriogénesis somática para la obtención de genotipos de mandarina sin semilla.

**Responsables de la actividad:** Cristian Zambrano y Elisa Quiala

**Actividad 1.** Identificación de genotipos de mandarina para la obtención de materiales sin semilla

**Colaboradores:** Ricardo Moreira, Inés Tapay, Bertin Osorio, Jean Vélez, Alejandro Mejías, Gerardo Martínez y Noely Ruiz.

### **1. Antecedentes:**

El Ecuador podría formar parte de los grandes países exportadores de mandarina. El país cuenta con condiciones agroclimáticas que le permiten obtener cosechas durante todo el año, en dependencia de las diversas variedades (Zabala, 2021). La necesidad de aumentar y mejorar la producción y calidad de las frutas cítricas, como la mandarina, es lo que ha hecho imprescindible mejorar su manejo en los huertos, para controlar la incidencia de plagas, enfermedades y malezas) (Valarezo et al, 2014). La poliploidía representa un factor importante de evolución para las especies vegetales, lo que permite su diversificación y diferenciación, y es considerada como un importante mecanismo de especiación y adaptación (Honscho et al., 2016). En cítricos, la importancia de los genotipos triploides radica en que producen fruta sin semillas ya que en general son estériles y no inducen la formación de semillas en otras variedades mediante polinización cruzada (Navarro et al., 2015).

La identificación varietal es uno de los aspectos básicos para el estudio del material vegetal utilizado en la producción y su importancia aumenta cuando este se utiliza para la generación de conocimiento científico. La observación y descripción de las características morfológicas constituye el primer paso para lograr la identificación de una variedad y se utilizan para ello diferentes partes de la planta: tallo, hoja, flores, frutos o semillas, lo que permite precisar las principales características de las plantas y permite distinguirla de otras más o menos similares (Orduz, et al., 2012).

### **Objetivo General**

Determinar las características morfo agronómicas de diversos cultivares de mandarina para localizar plantas elite, para la obtención de materiales sin semilla.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar los parámetros físico químicos de frutos de distintos arboles de las variedades de mandarina de Loja y Mandarina.
- Implementar descriptor para cítricos en frutos de distintos arboles de las variedades de mandarina de Loja y Mandarina.
- Determinar el estado de desarrollo del polen mediante tinción previo al establecimiento in vitro de las anteras.

## 2. Metodología:

### Equipos y materiales

- Licuadora
- Potenciómetro
- Agitador magnético
- Balanza analítica
- Vaso de precipitación
- Bureta graduada
- Soporte Universal
- Refractómetro Manual
- Pie de rey

### Reactivos:

- NaOH 0.2N
- Fenolftaleína

Se realizó el muestreo durante los meses de septiembre y octubre para las variedades de Chone y Loja. Para lo anterior, 12 frutos fueron colectados al azar por material en cada muestreo. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con cinco tratamientos que correspondieron a la variedad de Loja y 14 tratamientos correspondientes a la variedad de Chone. Fueron recolectados 10 frutos al azar por cada árbol de la variedad de Loja y Chone (En el caso de que no existan tal número por árbol se colectará el mayor número posible). En cada muestreo se determinó peso de los frutos, con la ayuda de una balanza de precisión; diámetro polar y ecuatorial, medido con un calibrador Vernier; los sólidos solubles totales (SST) se midieron con un refractómetro manual de rango 0 a 35% a 20°C; la acidez total titulable (ATT) (con base en el ácido cítrico) se determinó teniendo en cuenta el volumen de NaOH (0,2N) incorporado en 20mL de jugo, aplicando la ecuación 1 para estimar dicho valor, en una titulación potenciométrica hasta pH de 8,2; y la relación de madurez (RM) se calculó con la relación SST/ATT.

$$\text{Acidez Titulable (\%)} = \frac{V_{\text{NaOH}}(\text{mL}) * N * \text{meq} * V_t(\text{mL})}{P_m(\text{g}) * V_a(\text{ml})}$$

Donde:

$V_{\text{NaOH}}$  = Volumen de hidróxido de sodio consumidos en la titulación.

$N$  = Normalidad del Hidróxido de Sodio

$\text{Meq}$  = mili equivalente del ácido predominante, Acido cítrico=0.064

$V_t$  = Volumen final

$P_m$  = Peso muestra

$V_a$  = Volumen de la alícuota

#### **Procedimiento para el cálculo del porcentaje de Acidez Titulable.**

- Pesar 30 g de muestra, licuar y llevar a un volumen conocido (200 ml) con agua destilada.
- Tomar un alícuota (20 ml).
- Calibrar el pH - metro, utilizando las soluciones buffer de pH = 4 y pH = 7.
- Medir en la muestra el pH inicial.
- Titular con hidróxido de sodio 0,2 N estandarizado hasta que el pH-metro marque 8,2 que es el viraje del indicador fenolftaleína.

#### **Determinación del estado de desarrollo del polen mediante tinción**

La determinación del estado de desarrollo del polen se realizó tiñendo al menos una antera por botón floral, la tinción se realizó con acetocarmin.

- Las anteras se sumergen en ácido carmínico (1% acetocarmin, 45 % ácido acético).
- Se procede a observar al microscopio el estado del desarrollo del polen.

### **3. Resultados**

En los frutos recolectados en Loja existe un mayor rango en cuanto al peso, se tiene frutos en estado maduro que van desde 128,63 hasta 168,3 g, en cuanto a los frutos recolectados en Chone de las potenciales plantas elite existe una mayor uniformidad en cuanto al peso, este va desde los 141,2 a los 154,18 g en el fruto de menor tamaño.

Tabla 1. Características fisicoquímicas evaluadas en madurez de consumo de los frutos de algunos árboles de mandarinas de las variedades de interés.

Parámetros	Cultivar-Variiedad				
	Loja			Chone	
	1	2	3	8	11
<b>Físicos</b>					
Peso (g)	128,63	168,31	150,7	141,2	154,18
Diámetro (mm)	72	77,44	77	74	72
Numero de semillas	5-9	5-9	5-9	5-9	5-9
Densidad de glándulas oleaginosas	45-65	45-66	45-67	>70	>70
Numero de gajos por fruto	10-14	10-14	10-14	10-14	10-14
<b>Químicos</b>					
SST (°Brix)	10,2	9,8	10,7	8,58	8,8
AAT(%)	0,46	0,41	0,35	0,16	0,17
pH	3,82	3,93	4,09	3,94	3,96
RM(SST/AAT)	22,17	23,90	30,57	53,63	51,76

Nota<sup>1</sup>: De las catorce plantas muestreadas de la variedad Chone fueron seleccionadas para la valoración 2 plantas que fueron la número 8 y 11, que en primera instancia presentaron los valores más elevados de °Brix (7.9-10) teniendo el esto de árboles valores comprendidos entre (5-6) °Brix.

De manera general en los frutos de la variedad de Loja existen valores más altos en cuanto a los °Brix, así mismo existe un valor mayor en cuanto a la acidez titulable. Pero existe un valor mayor en la Relación de Madurez (RM) en los frutos de la variedad de Chone que en los frutos de la variedad de Loja.

En el ensayo de tinción para la viabilidad del polen se determinó los granos de polen en estado uninucleado en botones florales de entre 3-5 mm, mismos que fueron colectados en Chone y almacenados a 4°C durante 15 días como lo indica el protocolo.

El ensayo de tinción se realizó con seis botones con un tamaño promedio entre 3-5 mm, debido a la escasez de botones florales.

#### 4. Conclusiones:

Debido a variaciones como el peso, AAT% y SST incluso entre plantas de la misma variedad es indispensable la implementación de un descriptor morfo agronómico y la medición de variables físico-químicas para una adecuada determinación de plantas elite para la introducción al cultivo in vitro para la generación de materiales sin semillas mediante androgénesis.

#### 5. Recomendaciones

Debido al retraso en la floración en este año, se ha visto afectada la recolección de los botones florales y así mismo se presenta un retraso en el establecimiento in vitro de anteras para la formación de los microcallos.

## 6. Bibliografía

Honsho, C., Sakata, A., Tanaka, H., Ishimura, S., & Tetsumura, T. (2016). Single pollen genotyping to estimate mode of unreduced pollen formation in *Citrus tamuranacv.* NishiuchiKonatsu. *Plant reproduction*, 29(1), 189-197.

Navarro, L., Aleza, P., Cuenca, J., Juárez, J., Pina, J. A., Ortega, C., ... & Ortega, V. (2015). The mandarin triploid breeding program in Spain. *Acta Horti*, 1065(31), 389- 396.

Orduz-Rodríguez, J. O., Monroy, J., Barrera, S., Núñez, V., & Ligarreto, G. (2012). Caracterización morfo-agronómica y molecular de mandarina 'Arrayana' en el piedemonte del Meta (Colombia). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(1), 5-12.

Toledo, D. (2010). Determinación del valor nutritivo y funcional de tres clones seleccionados de araza (*Eugenia stipitata*) y seis de borojo (*Borojoa patinoi*), y evaluación del proceso para la obtención de pulpas pasteurizadas y congeladas.

Zabala, I. (2021). Manejo agronómico del cultivo de Mandarina (*Citrus reticulata*), en el Ecuador (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2021).

Valarezo, A., Valarezo, O., Mendoza García, A., & Alvarez, H. (2014). Guía técnica sobre el manejo de los cítricos en el Litoral ecuatoriano.

## Anexos:





Figura 1. Observación y conteo de glándulas oleaginosas ubicadas en la corteza del fruto de mandarina.



Figura 2. Caracterización de materiales de Loja. Valor de °Brix de fruto elevado en variedad de Loja (10).

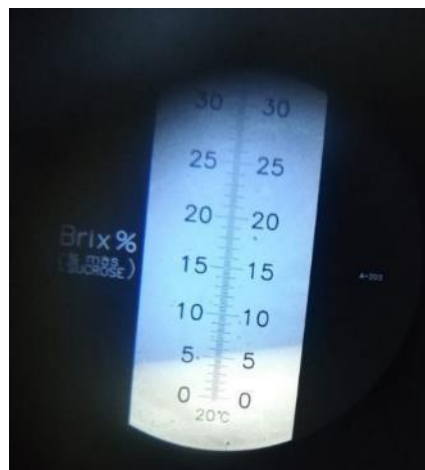


Figura 3. Valor de °Brix de planta descartada en variedad de Chone



Figura 4. Frutos recolectados de la variedad de Chone (el fruto maduro presenta una coloración anaranjada)



Figura 5. Refractómetro utilizado para la obtención del valor de °Brix



Figura 6. Frutos recolectados de la variedad de Loja (el fruto maduro presenta una coloración amarillosa)

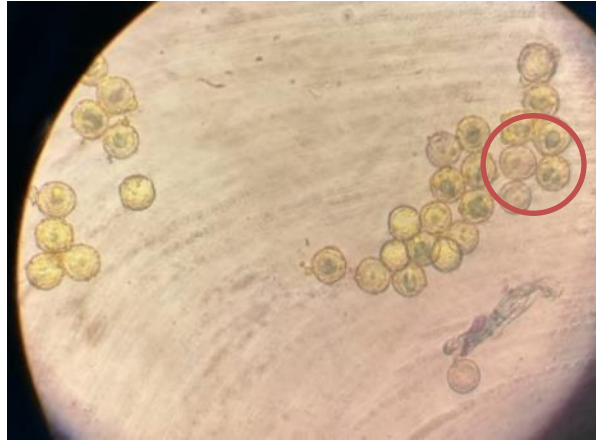


Figura 7. Ensayo de tinción para la observación de la viabilidad del polen en botones florales de 3 a 5 mm

**Componente 4. Determinar el impacto de las técnicas biotecnológicas implementadas y de la capacitación en el fortalecimiento de los programas de fitomejoramiento.**

**Actividad 1.** Diagnóstico sobre la aplicación de la embriogénesis somática en los laboratorios de biotecnología comerciales, de investigación y docencia dedicados al cultivo in vitro de plantas en el Ecuador.

**Responsables de la actividad:** Gladys Viteri, Bertin Osorio y Elisa Quiala

**Colaboradores:** Valeria Bolaños, Cristian Zambrano, Inés Tapay, Paul Velez, Gerardo Martínez, Noely Ruiz, Eloy Orellana, Eduardo Morillo Velastegui e Iván Garzón.

**1. Antecedentes**

La biotecnología contribuye a una agricultura sostenible, utilizando recursos más acordes con el medio ambiente, es decir, ayuda a satisfacer las necesidades actuales sin comprometer las futuras. Estas posibilidades han sido reconocidas por la FAO al señalar que “la biotecnología ofrece instrumentos poderosos para el desarrollo sostenible de la agricultura, la pesca y la actividad forestal, así como de las industrias alimentarias y puede contribuir a satisfacer las necesidades de una población en aumento y cada vez más urbanizada”.

De manera general en el país existen pocos equipos de trabajo relacionados con la investigación agropecuaria, que cuentan con esta poderosa herramienta en sus programas. Por lo que la

finalidad de este proyecto es Contribuir al fortalecimiento de los programas de mejoramiento genético con base en el uso de técnicas de cultivo in vitro como la embriogénesis somática y la formación de especialistas para incrementar la eficiencia de la mejora de plantas, asistida por biotecnología.

En una primera etapa del proyecto se utilizarán técnicas de diagnóstico para determinar el estado actual del uso de la ES en los laboratorios de biotecnología del país y actualizar con mayor precisión la línea base del proyecto. Se seleccionaron cinco cultivos de interés (café, cacao, palma aceitera, mandarina y banano), cuyos programas contaban con materiales resultantes del mejoramiento convencional y que pueden ser acelerados con el uso de la biotecnología.

Se espera establecer una línea base actualizada sobre las herramientas biotecnológicas empleadas por los laboratorios de biotecnología para la propagación y la mejora genética de plantas en el país. Un estudio de impacto del proyecto en el fortalecimiento de la capacidad técnica de los laboratorios de biotecnología que participen de las capacitaciones impartidas.

### **Objetivo general**

Realizar un diagnóstico de la aplicación de la embriogénesis somática en los laboratorios de biotecnología comerciales, de investigación y docencia dedicados al cultivo in vitro de plantas en el Ecuador

### **Objetivos específicos**

- Identificar los laboratorios que aplican la embriogénesis somática como técnica de cultivo in vitro
- Determinar la mayor área de aplicación de la embriogénesis somática de acuerdo a las distintas categorías (academia, pública, privada).
- Identificar los cultivos en los cuáles se ha trabajado.
- Determinar las posibles causas que influyen en el estado de aplicación registrado.

## **2. Metodología**

La presente investigación se iniciará en el mes de diciembre del 2022, por los Departamentos de Gestión de Planificación y de Biotecnología de la EELS.

### **2.1 Criterios para el desarrollo del diagnóstico:**

- **Definición de Zonas de Intervención (ZI).** A nivel nacional
- **Levantamiento de información secundaria.** Obtener información de varias fuentes (páginas institucionales, publicaciones anteriores relacionadas al tema, etc.).

- **Sondeo.** Establecer contacto previo con personas de instituciones públicas o privadas que laboran en áreas relacionadas a la Biotecnología.
- **Diagnóstico.** Mediante encuestas directas a los laboratorios participantes. La encuesta corresponde a la aplicación de un formulario estructurado y codificado cuya tabulación y análisis generará el diagnóstico.
- **Tamaño de la muestra.** Se realizará un censo, es decir que se encuestará a toda la población de laboratorios existentes a nivel nacional, considerando su predisposición para facilitar la información requerida.

## 2.2 Encuestas.

Se encuestará a las personas encargadas de los laboratorios a nivel nacional, teniendo criterios de selección: ubicación, disponibilidad de participar, infraestructura acorde al laboratorio, aceptación a facilitar la información con los demás laboratorios.

Las encuestas se realizarán en línea mediante un formato preestablecido y aprobado (ver encuesta en Anexos). Este formato será enviado mediante correo electrónico a los encargados de los laboratorios participantes, los cuales enviarán de regreso sus respuestas.

Durante la implementación de la encuesta se recopilará la siguiente información:

- Ubicación del laboratorio
- Tipo de uso de la ES
- Tiempo de uso
- Especies utilizados
- Problemas con la implementación
- Sistema de cultivo utilizados.

## 2.3 Análisis estadístico

El Departamento de Planificación realizará la compilación de toda la información obtenida en tablas dinámicas de una hoja de cálculo Excel.

Una vez tabulada la información será analizada mediante estadística descriptiva e interpretada conjuntamente con técnicos del Laboratorio de Biotecnología de la EELS.

## 3. Bibliografía

Taípe, M., Morillo E. (2009). Informe final de Consultoría "Diagnóstico del estado del arte de la Agrobiotecnología en el Ecuador". PROCIANINDINO-INIAP-IICA. 110 p.

Diamante, A., & Izquierdo, J. (2004). *Manejo y gestión de la Biotecnología Agrícola apropiada para pequeños productores: ESTUDIO DE CASO ARGENTINA*. Obtenido de <https://chilebio.cl/wp-content/uploads/2015/09/Manejo-y-gesti%C3%B3n-de-la-Biotecnolog%C3%ADa-Agr%C3%ADcola-apropiada-para-peque%C3%B1os-productores-estudio-del-caso-Argentina.doc>.

Freire Seijo, M. (2003). *Aspectos básicos de la embriogénesis somática*. Obtenido de Biotecnología Vegetal: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/263/html>

INIAP. (2016). *Informe Técnico Anual del Programa de Arroz*. Estación Experimental Litoral Sur.

Tello Suárez, V. E. (2016). *Despliegue diferencial de genes candidatos del proceso de embriogénesis somática en tomate de árbol (Solanum betaceum L.)*. Obtenido de Universidad Central del Ecuador: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9209/1/T-UCE-0004-68.pdf>

## Anexos

Encuesta diseñada para realizar el diagnóstico sobre la aplicación de la embriogénesis somática

### DIAGNOSTICO SOBRE LA APLICACIÓN DE LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA EN LABORATORIOS COMERCIALES, DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA DEDICADOS AL CULTIVO IN VITRO Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS EN EL ECUADOR

La presente es una encuesta para el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Ecuador, el objetivo de la misma es realizar un Diagnóstico del estado de aplicación de la embriogénesis somática en los laboratorios biotecnológicos comerciales, de investigación y docencia dedicados al cultivo in vitro de plantas en el Ecuador. Este diagnóstico forma parte de una actividad del proyecto "Fortalecimiento de los Programas de Mejoramiento Genético mediante herramientas biotecnológicas aplicadas en cinco cultivos de interés agrícola". Usted ha sido seleccionado (a) al azar y la encuesta tendrá una duración aproximada de 10 minutos. De antemano, queremos darle las gracias por su participación. Igualmente, le informamos que sus datos personales no serán públicos y la información suministrada será utilizada sólo para fines científicos, por lo que sus respuestas no afectarán ningún beneficio o subsidio que reciba o pueda recibir, o impuestos que deba pagar.

#### 1. IDENTIFICACIÓN DEL ENCUESTADO

1.1 Nombre del encuestado: \_\_\_\_\_ 1.2 Fecha de la encuesta: dd/mm/año \_\_\_\_\_

1.3 Nombre de la Institución o Empresa: \_\_\_\_\_ 1.4 Actividad: Comercial \_\_\_\_\_ Investigación \_\_\_\_\_ Docencia \_\_\_\_\_

#### 2. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL LABORATORIO

Provincia \_\_\_\_\_ Cantón \_\_\_\_\_ Parroquia \_\_\_\_\_

#### 3. ¿HA IMPLEMENTADO ALGUNA VEZ LA TÉCNICA DE EMBRIOGENESIS SOMÁTICA COMO HERRAMIENTA PARA EL CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES? MARQUE CON UNA CRUZ.

Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

#### 4. EN CASO DE RESPONDER SI EN LA PREGUNTA 3, MENCIONE LOS CULTIVOS EN LOS CUALES HA IMPLEMENTADO LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA.

\_\_\_\_\_

#### 5. ¿CUÁNTOS AÑOS TIENE EN LA ACTIVIDAD? \_\_\_\_\_

1

### DIAGNOSTICO SOBRE LA APLICACIÓN DE LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA EN LABORATORIOS COMERCIALES, DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA DEDICADOS AL CULTIVO IN VITRO Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS EN EL ECUADOR

#### 6. EN CASO DE RESPONDER NO EN LA PREGUNTA 3 SEÑALE LAS CAUSAS

- FALTA DE EQUIPOS
- FALTA DE REACTIVOS
- FALTA DE PERSONAL
- FALTA DE CAPACITACIÓN
- NO HAY DEMANDA
- OTROS: \_\_\_\_\_

#### 7. MARQUE CON UNA X ¿EL OBJETIVO POR EL QUE HA IMPLEMENTADO LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA EN PLANTAS?

- MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL
- PROPAGACIÓN MASIVA DE PLANTAS
- OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
- ESTUDIOS BÁSICOS DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

#### 8. ¿HA IMPLEMENTADO EL USO DE MEDIOS DE CULTIVOS LÍQUIDOS PARA LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA?, MARQUE CON UNA X

Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

#### 9. EN CASO DE RESPONDER SI EN LA PREGUNTA 8, SEÑALE EN QUE SISTEMA DE CULTIVO HA UTILIZADO EL MEDIO LÍQUIDO PARA LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA.

- Cultivo en agitación (agitadores orbitales o zaranda)
- Cultivo en biorreactores de atmósfera controlada
- Cultivo en biorreactores de atmósfera temporal
- Cultivo estático

**Proyecto 2. Proyecto FIASA-EELS-2022-009\_Desarrollo e implementación de tecnologías productivas en el cultivo de arroz, para aumentar la resiliencia de pequeños y medianos productores al cambio climático en Ecuador.**

**Actividad 1. Obtención de plantas doble haploides homocigóticas de arroz mediante cultivo de anteras de cruzamientos para mejora a la salinidad y la sequía.**

**Responsable de Proyecto: Roberto Celi**

**Responsable de la actividad: Elisa Quiala**

**Colaboradores:** Inés Tapay (Dpto. Biotecnología, Técnico FIASA), Roberto Celi (Programa de Arroz), Paul Velez (Dpto. Biotecnología, Técnico FIASA), Gerardo Martínez (Dpto. Biotecnología, Técnico FIASA), Edinson Mosquera (Programa de Arroz), Olga Calle (Programa de Arroz, técnico FIASA), Gladys Viteri (Dpto. de Planificación y Econ. Agrícola), Valeria Bolaños (Dpto. de Planificación y Econ. Agrícola)

**Trabajadores de apoyo:** Mónica Puga, Juan Pérez, Iván Romero, Mario Muñoz, Marcos Calero.

## **1. Antecedentes**

El cambio climático constituye uno de los principales factores que afecta la agricultura, debido a que este influye severamente en la disponibilidad de agua para los cultivos. El déficit de agua causa estrés y grandes pérdidas en los cultivos y en el caso del arroz de una manera muy marcada, porque es un cultivo con una alta demanda hídrica para su desarrollo (Serraj et al., 2011). La mayor parte del arroz en el mundo se cultiva bajo riego, pero debido a los efectos del cambio climático los períodos de lluvia son cada vez más cortos, con una desigual distribución de las precipitaciones durante las estaciones, a esto se agrega las variaciones biofísico-químicas del suelo por el incremento de la concentración de las sales durante los períodos secos (Serraj et al., 2009). La sequía es uno de los principales factores que determina la productividad del arroz bajo riego (Fukai et al., 2009), por lo que el desarrollo de variedades que se adapten con alta productividad en ambientes secos puede ser una solución para aquellas zonas arroceras donde

los recursos hídricos son limitados (Foley et al., 2011). Sumado a esto la salinidad es otro factor abiótico que afecta zonas arroceras de la región costera

En el período del 2019-2020 se implementó en el laboratorio de Biotecnología un protocolo que permite regenerar plantas verdes a partir de anteras de cruzamientos entre materiales tipo indica, y la entrega de estos al programa de arroz para su evaluación en campo. En el año 2021 se obtuvo nuevas líneas a partir de anteras de cruzamientos realizados por el programa entre materiales del IRRI tolerantes a salinidad y sequía con variedades del INIAP de alto rendimiento. Estas líneas fueron sembradas en invernadero, evaluadas en el 2022 y sus progenies entregadas al PA. En este año se continuó con la aplicación de este protocolo para generar nuevas líneas a partir de cruzamientos realizados para la mejora de la tolerancia a la salinidad y la sequía.

**Objetivo General:** Obtener plantas a partir del cultivo in vitro de anteras de arroz de cruzamientos para mejora de la tolerancia a la salinidad y la sequía.

**Objetivos específicos:**

- Evaluar en invernadero líneas regeneradas en el 2021 y entregar las progenies al PA
- Establecer plantas F1 y F2 en invernadero para obtener inflorescencias para el cultivo de anteras, establecer in vitro anteras y formar microcallos.
- Regenerar plantas in vitro a partir de los microcallos.

**2.0 Metodología**

**2.1 Siembra y evaluación en invernadero de líneas regeneradas en el 2021 y entrega de progenie al PA.**

Se evaluaron y cosecharon en el invernadero 60 plantas del C10 procedentes de cultivo de antera y 38 plantas del cruce 6. Se evaluó la altura de planta, número de macollos, longitud de la panícula. Las panículas recibieron un tratamiento por desecación en estufa a 38°C por 48 horas para eliminar la humedad. Posteriormente, las semillas se conservaron en frío hasta que se realice la evaluación de las características del grano (Fig. 1B).

En cuanto a la entrega de materiales al PA, se realizaron tres entregas en el año para un total de 98 líneas entregadas (Anexo 1)





Figura 1. A) Plantas del cruce 6 y cruce 10 regeneradas por cultivo de anteras evaluadas en invernadero en fase de maduración del grano. B) Semillas cosechadas del cruce 6 y cruce 10, conservadas en frío después del secado.



Figura 2.- Panículas de arroz del cruce C10 en proceso de evaluación

## 2.2 Cruzamientos dirigidos por parte del PA y entrega a Laboratorio de Biotecnología de progenies F1 y F2

En este año no hubo disponibilidad de semillas de nuevos cruces. Sin embargo, se continuó trabajando con la semilla F2 obtenida a partir de la multiplicación de semillas de las progenies F1, con lo cual no se afectó esta actividad.

Se trabajó con semillas de cuatro cruzamientos realizados por el PA entre variedades del IRRRI registradas como tolerantes a sequía y variedades del INIAP con atributos de buena calidad de grano (Cruce 6, Cruce 7, Cruce 8 y Cruce 13). Se debe señalar que las semillas del C6 (INIAP FL-ARENILLAS/GO-03606) no germinaron, por lo que este año no se pudo obtener anteras de este cruzamiento.

El protocolo se desarrolló en dos etapas (inducción de microcallos y regeneración de plantas), de acuerdo con el protocolo descrito por Lentini (1995) y adaptado por Quiala et al. (2019) para materiales del INIAP (Informe anual Biotecnología 2019). Se sembraron 8125 anteras obtenidas a partir de plantas de tres cruzamientos, 4375 anteras del Cruce 7 (C7), 625 anteras del Cruce 8 (C8) y 3125 anteras del Cruce 13 (C13). (Fig. 5). Los detalles de los tres cruzamientos utilizados para el cultivo de anteras se muestran en la Tabla 1.

Las variables evaluadas durante el proceso de androgénesis fueron la frecuencia de formación de microcallos por cada 100 anteras sembradas (número de microcallos/frasco) (%), número total de microcallos por cruzamiento, número de plantas verdes/100 anteras sembradas (%), número total de plantas verdes y albinas regeneradas.

Tabla 1. Información de los cruzamientos para mejora de la tolerancia a la salinidad y la sequía realizados por el Programa de Arroz, a partir de los cuales se regeneraron las líneas de plantas por cultivo de anteras

Cruzamiento	Identificación	Objetivo de la mejora
INIAP FL-ARENILLAS/GO-03607	C7	Tolerancia a la sequía
INIAP FL-ARENILLAS/GO-03609	C8	Tolerancia a la sequía
GO-03606/GO-01718	C13	Tolerancia a la sequía

### 2.3 Establecimiento de plantas donantes en invernadero, establecimiento in vitro de anteras y formación de microcallos.

#### Procedimientos generales

El protocolo se desarrolló en dos etapas (inducción de microcallos y regeneración de plantas), de acuerdo con el protocolo descrito por Lentini (1995) y adaptado por Quiala et al. (2019) para materiales del INIAP (Informe anual Biotecnología 2019) y validado en los años 2020, 2021

durante la regeneración de plantas de diferentes cruces realizados para la mejora de la tolerancia a la salinidad y la sequía.

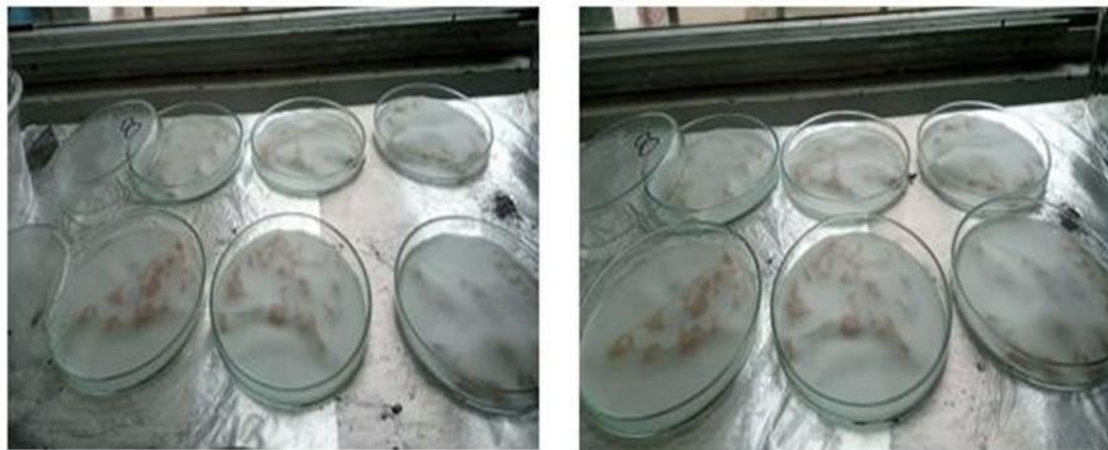


Figura. 3) Semillas de diferentes cruces en proceso de germinación.



Figura. 4) Plantas de diferentes cruces en proceso de trasplante a camas con sustrato para la obtención de plantas donantes de panículas para iniciar el cultivo de anteras.

### 3. Resultados

Los resultados obtenidos durante la evaluación de la frecuencia de formación de microcallos por cada 100 anteras sembradas y el número total de microcallos por cruzamiento puestos a regenerar se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Número de microcallos formados por cada 100 anteras inoculadas en medio de cultivo para la formación de callos, a partir de anteras de plantas F2 de cruzamientos simple entre variedades INIAP y variedades del IRRI tolerantes a sequía.

Cruzamientos	Nro. Total de anteras sembradas	Nro. total de microcallos formados
C7	4375	440
C8	625	61
C13	3125	840



Figura. 5) Montaje de ensayo con nanopartículas de plata en cultivo de anteras del cruce 7, cruce 13 y cruce 15.

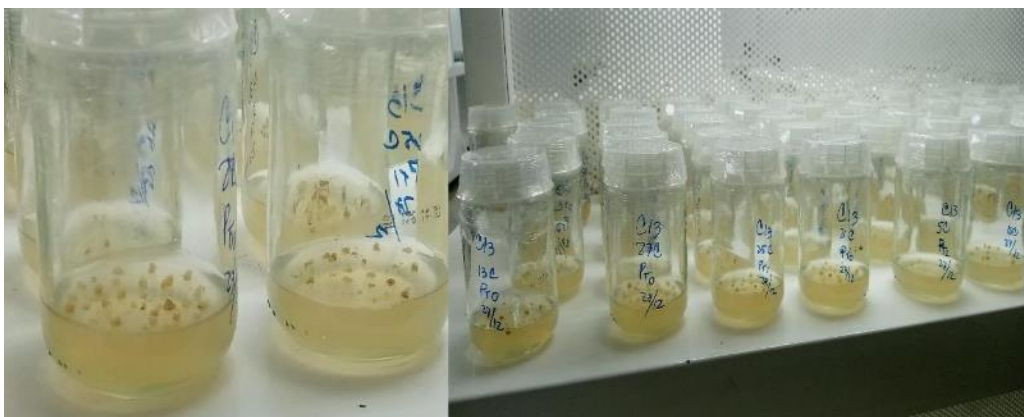


Figura. 6) Fase de regeneración de microcallos, formados a partir de anteras de arroz del cruce 7, cruce 8 y cruce 13.

En este ensayo la fase de regeneración se encuentra en curso por lo que aún no se ha realizado la evaluación de las variables correspondientes a esta fase como son el número de plantas verdes regeneradas y de plantas albinas.

#### 4. Conclusiones

- Los resultados obtenidos permitieron generar progenies de 98 nuevas líneas a partir del cultivo de anteras con el objetivo de la mejora a la salinidad y la sequía, las cuales se entregarán al PA.

#### 5. Recomendaciones

- Realizar nuevos cruzamientos para ampliar las posibilidades de flujo génico entre variedades foráneas tolerantes al estrés por salinidad y sequía y las variedades del INIAP.
- Continuar aplicando el protocolo establecido para generar nuevas líneas e incrementar el número de materiales para la entrega al Programa de Arroz.

#### 6. Referencias bibliográficas

- Akbar M.R., Purwoko B.S., Dewi I.S., Suwarno W.B. & Sugiyanta M.R. (2018). Agronomic and drought tolerance evaluation of doubled haploid rice breeding lines derived from anthers culture. *SABRAO J. Breed. Genet.* 50 (2) 115-128.
- Foley J. A., Ramankutty N., Braumann K. A., Cassidy E. S., Gerber J. S., Johnston M., Mueller N. D., O'Connell C., Ray D. K., West P. C., Balzer C., Bennett E. M., Carpenter S. R., Hill J., Monfreda C., Polasky S., Rockström J., Sheehan J., Siebert S., Tilman D., Zaks D. P. M. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478: 337-342.
- Fukai S, Basnayake J, Makara O. (2009). Drought resistance characters and variety development for rainfed lowland rice in Southeast Asia. In: Serraj R, Bennett J, Hardy B, editor. *Drought Frontiers in Rice: Crop Improvement for Increased Rainfed Production*. IRRI, Los Banos. pp. 75-89.
- Furuta T., Ashikari M., Jena K. K., Doi K. & Reuscher S. (2017). Adapting genotyping-by-sequencing for rice F2 populations. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(3), 881-893.
- IRRI. (2002). *Standard Evaluation System for Rice*. International Rice Research Institute, Philippine, p56.
- Lentini Z., Reyes P., Martínez C. P., Núñez V. M. y Roca W. (1995). Mejoramiento del arroz con cultivo de anteras. Aplicaciones en el desarrollo de germoplasma adaptado a ecosistemas Latinoamericanos y el Caribe. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia, 80 p
- Méndez L & Garro G. (2018, Enero). Una nueva era de la biotecnología en el mejoramiento genético. Recuperado de [http://revistas.tec.ac.cr/index.php/investiga\\_tec/article/view/3473](http://revistas.tec.ac.cr/index.php/investiga_tec/article/view/3473).

Serraj R, McNally K L, Slamet-Loedin I, Kohli A, Haefele S M, Atlin G, Kumar A (2011). Drought resistance improvement in rice: an integrated genetic and resource management strategy. Plant Prod. Sci. 14: 1-14.

**Anexos 1** Actas de entrega de materiales al Programa de Arroz, obtenidos durante el 2022 a partir del cultivo de cultivo de anteras



**Proyecto 3: Proyecto FIASA-EELS-2022-015\_Enfermedades letales en la Palma Aceitera en Ecuador.**

**Nombre del coordinador del proyecto:** PhD. Digner Ortega Cedillo

**Responsables de la actividad:** PhD, Elisa Quiala e Ing. Noely Ruiz Ocampo.

**Colaboradores:** Silvia Zambrano, Mercedes Navarrete, Silvana Defaz, Inés Tapay y Gerardo Martínez.

**Trabajadores de apoyo**

Emilio Menendez, Mónica Puga, Cinthia Minaya.

**Actividad 1.** Generación y validación de un protocolo de propagación clonal de plantas progenitoras del híbrido INIAP-TENERA de palma aceitera.

**1. Antecedentes:**

El cultivo de palma aceitera se inició en la zona de La Concordia en la década de los 50. Las plantaciones se fundaron con material *Elaeis guinensis* Dura Deli. Posteriormente en la Estación Experimental Santo Domingo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), a través del Programa de Palma Africana se logró mejorar el material y se obtuvo la segregación de plantas Pisíferas locales que sirvieron para la obtención del híbrido INIAP-Tenera (Vegas *et al.*, 2016). Durante más de 40 años, el INIAP ha ofrecido al palmicultor material de este híbrido mejorado, destacado por su alto rendimiento (INIAP, 2003). El banco de germoplasma de la estación ha sufrido una fuerte afectación provocada por la PC, con la pérdida de la mayoría de las plantas progenitoras del híbrido INIAP Tenera, pero se ha observado que algunas plantas aún se mantienen sanas, por lo que es necesaria su clonación. Sin embargo, la palma de aceite tiene un solo punto de crecimiento, y no produce retoños como algunas otras especies de palma, de manera que los clones no pueden ser producidos por las técnicas comunes tales como enraizamiento de esquejes, injertos o acodos (Corley y Tinker, 2003). Por lo que, solo a través de la biotecnología basada en las técnicas de cultivo de tejido *in vitro* se podría obtener plantas clonales (Muniran *et al.*, 2008). En este sentido, existen diversos protocolos en la literatura internacional que describen la regeneración de plantas de palma de aceite a partir de embriones cigóticos (Muniran *et al.*, 2008; Thuzar *et al.*, 2011), segmentos de hojas de la flecha (Hanower and Pannetier 1982); (Mondjeli *et al.* 2015) y de inflorescencias masculinas inmaduras (Jayanthi *et al.*, 2015). No obstante, solo la embriogénesis a partir de los segmentos de hojas de la flecha



y las inflorescencias masculinas inmaduras son los materiales que han permitido desarrollar un protocolo de clonación de plantas vía embriogénesis somáticas. Al respecto, en el 2018 se inició un protocolo de clonación en el laboratorio a partir de inflorescencias y segmentos de raíces y hojas de 25 plantas madres de las cuales solo una respondió favorablemente, las inflorescencias aisladas de la Planta 530 (*E. Guinnensis* Dura) y aún está por validar la fidelidad genética de las cinco plantas regeneradas. Por lo que, se requiere probar este protocolo con otras plantas madres para validar su eficiencia y que sea una alternativa para la clonación de las plantas sobrevivientes a la PC presentes en el banco de germoplasma de la Estación Experimental Santo Domingo.

**Objetivo:** Generar y validar un protocolo de propagación clonal de plantas progenitoras del híbrido INIAP-TENERA de palma aceitera.

## 2. Metodología:

La investigación se realizará en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Santo Domingo, INIAP.

Se colectarán cinco plantas progenitoras donde se obtendrán las inflorescencias masculinas y femeninas, meristemo, primordios foliares cercano al meristemo y hojas de la flecha Tabla 1. Además, se utilizará un segundo material vegetal con embriones inmaduros obtenidos por autofecundación de las plantas progenitoras en el cual se germinará in vitro. Este método es poco invasivo para la planta, por lo que una vez fecundada la flor y formado el fruto, el embrión inmaduro puede ser rescatado y germinado in vitro.

Se ha trabajado hasta la fecha con los siguientes materiales:

**Tabla 1. Plantas Progenitoras para cultivo in vitro.**

Plantas	Tipo de Explante	Condición de la Planta
3C-578	Inflorescencias, hojas de la flecha, meristemo	Enferma con Pc
13B-76	Inflorescencias, hojas de la flecha, meristemo	Enferma con Pc
3C-74	Inflorescencias, hojas de la flecha, meristemo y hojas de meristemo.	Enferma con PC
Planta madre Pisífera autofecundada	Rescate de embrión obtenido por autofecundación	Enferma con PC

Se elaboró medio de cultivo de formación de callo y medio de cultivo de regeneración. A continuación, se realizó el protocolo de desinfección para el material vegetal. Seguido se establecieron in vitro las espiguillas de las inflorescencias, primordios foliares cercanos al meristemo, hojas de la flecha en medio de formación de callo y el meristemo se estableció en medio de regeneración.

También se trabajó en la aclimatización de las cinco plantas regeneradas a partir de las inflorescencias inmaduras de la planta madre 530. Estas plantas se encontraban en fase de enraizamiento in vitro y solo se requería su aclimatización para culminar el protocolo de clonación establecido a partir de las modificaciones realizadas al protocolo de Jayanthi, et al. (2015). Las plantas se transfirieron a tarrinas plásticas de 500 ml de capacidad, las cuales contenían un sustrato compuesto por turba+vermiculita, para evitar la excesiva transpiración se redujo al 75% el área foliar y se mantuvieron las tarrinas en camas de invernadero, bajo la sombra de plantas de yuca procedentes del cultivo in vitro con 45 días de aclimatación en el invernadero del laboratorio de biotecnología de la EELS.

### 3. Resultados:

Hasta la fecha el material vegetal establecido en medio de formación de callos de las tres plantas madres solo respondió positivamente la planta 3C-74 (Tabla 2). De la cual existen 10 frascos con formación de callos provenientes de las inflorescencias, 1 frasco de hojas de flecha y 1 frasco con hojas del meristemo. En el collage de la Figura 1 y Figura 2 se pueden apreciar imágenes del proceso.

**Tabla 2. Respuesta in vitro de formación de callo en las tres plantas progenitoras.**

Plantas	Respuesta in vitro de F. callo	Observaciones
3C-578	Sin formación de callos	Inflorescencias dañadas
13B-76	Sin formación de callos	Inflorescencias dañadas
3C-74	Inicio de formación de callo	Inflorescencias femeninas y masculinas
Planta madre Pisífera autofecundada	Cuatro embriones viables germinados in vitro	Cuatro plantas regeneradas

Las cinco plantas obtenidas vía embriogénesis somática a partir de las inflorescencias de la planta madre 530, se establecieron satisfactoriamente en el invernadero (Fig. 3, Anexos)

### 4. Conclusiones:

- Las inflorescencias de la planta 3C-74 presentan una respuesta positiva en la formación de callo.
- Se logró el rescate de material autofecundado de una planta madre Pisífera que ya fue eliminada por la PC.

### 5. Recomendaciones:

Se recomienda proporcionar más material vegetal sano de las plantas progenitoras para poner en marcha los diferentes ensayos o como alternativa ante la escasa cantidad de plantas sanas, realizar autopolinizaciones de las plantas sobrevivientes para proceder con el rescate de embriones.

### 6. Bibliografía

- Vegas A, Ortega D, Woaloto W, paredes E, Rebolledo E, Quintero L, Ortega J (2016) Respuesta de la palma Africana híbrido INIAP-Tenera cultivada in vitro según el tipo de explante y niveles de ácido naftalenacético.
- Corley RHV y Tinker PB (2016) Vegetative Propagation and Biotechnology. En: The Oil Palm, Fifth Edition, Corley RHV y Tinker PB (Eds). John Wiley & Sons, Ltd. 208- 224
- Muniran et al., (2008). Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. Dura: Comparison of three basal media for eficiente regeneration. En: Indian Journal of Experimental Biology. Vol 46.
- Thuzar M, Vanavichit A, Tragoonrung S, Jantasuriyarat C (2011) Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv Tenera through somatic embryogenesis. *ActaPhysiol Plant* 33:123–128
- Hanower, J. and Pannetier, C. (1982) In vitro vegetative propagation of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Plant Tissue Culture*, supp, 745-746.
- Mondjeli C, Nchu WA, Godswill N-N, Wiendi NMA, Wachjar A, Frank GNE (2015) Induction of oil palm (*Elaeisguineensis* Jacq. var. Tenera) callogenesis and somatic embryogenesis from young leaf explants. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 3:004-010
- Jayanthi M, Susanthi B, Mohan NM, Mandal PK (2015) In vitro somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature male inflorescence of adult dura and tenera palms of *Elaeis guineensis* (Jacq.). *Springer Plus* (2015) 4:256

Anexos:



**Figura 1.** Proceso de extracción, desinfección y establecimiento in vitro de material vegetal de plantas madre de palma aceitera.



**Figura 2.** Plántulas obtenidas por autofecundación de planta madre Pisífera y rescate de embriones.



**Figura 3.** Plantas in vitro en fase de aclimatización clonadas mediante embriogénesis somática a partir de inflorescencias masculinas inmaduras de la planta madre 530 del programa de palma aceitera de la EESD (30 días).

**Actividad 2.** Obtener nuevos materiales para ampliar la base genética del proyecto de palma aceitera mediante mejoramiento genético asistido por biotecnología.

### 1. Antecedentes

El programa de palma aceitera ante la grave afectación por PC que sufre su banco de germoplasma, tiene la necesidad de generar nuevos materiales que sean tolerantes a la PC. Esta enfermedad, es el resultado de un trastorno fisiológico desencadenado por uno o más tipos de estrés (Albertazzi-Leandro et al., 2005) que podrían dar lugar a la susceptibilidad de las palmas a microorganismos que normalmente no son patógenos.

El desorden afecta a todas las edades del cultivo (Cristancho et al., 2007) se caracteriza por lesiones que se van expandiendo y que empiezan en la base de la hoja de lanza y se extienden a través de los haces vasculares hasta las hojas no diferenciadas, afectando el crecimiento de nuevas hojas. No obstante, el daño más importante se produce en la corona. En cuanto a las condiciones de estrés predisponentes a este desorden, los suelos con tendencia al encharcamiento, arcillosos en superficie (principalmente caolinita), con pH ácido (<5) en el estrato superficial, con alta saturación de aluminio ( $Al^{3+}$ ) (>60%), con bajo contenido de material orgánico superficial (aprox. 1%). Además de la práctica del plateo, ambientes muy húmedos con temperaturas tropicales, parecen ser detonadores del debilitamiento de las palmas debido al lavado de minerales y a la solubilización de  $Al^{3+}$  (Cristancho et al., 2007; Laing, 2010; Rivera et al., 2016).

Esta actividad parte de la teoría de que algunos factores abióticos como la acidez del suelo por exceso de aluminio podrían provocar un desbalance nutricional en las plantas de palma aceitera y por lo tanto predispone para la incidencia de la enfermedad de Pudrición de del Cogollo (PC). La toxicidad por aluminio produce la degradación de las raíces, lo cual a su vez, impide la absorción de nutrientes pasivos como el calcio ( $Ca^{2+}$ ) por parte del sistema radicular y de los pelos radiculares. El  $Ca^{2+}$  es fundamental para el desarrollo y crecimiento del tejido meristemático (McLaughlin y Wimmer, 1999). Ante este análisis, en teoría si se logra seleccionar desde la fase in vitro individuos que muestren tolerancia a la acidez por aluminio en el medio de cultivo y posteriormente mediante la embriogénesis somática regenerar a partir de él, el programa podría contar con una metodología para la selección y producción de clones in vitro de plantas progenitoras e híbridos tolerantes a la acidez del suelo y probablemente menos susceptibles a la PC. En esta actividad se pretende mediante

la selección in vitro y la embriogénesis somática regenerar plantas tolerantes a la acidez del suelo provocada por el aluminio.

**Objetivo:** Obtener nuevos materiales para ampliar la base genética del proyecto de palma aceitera mediante mejoramiento genético asistido por biotecnología.

## 2. Metodología:

La investigación se realizará en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Santo Domingo, INIAP.

Se realizarán cruzamientos dirigidos entre parentales seleccionados por el Programa de Palma Africana (Tabla 1) y después de 13 semanas de ocurrida la antesis los embriones serán extraídos de los frutos.

**Tabla 1. Cruzamientos dirigidos de Plantas progenitoras**

<b>Cruzamientos Dirigidos</b>	<b>Plantas (<i>E. Dura</i> x <i>E. Pisífera</i>)</b>
<b>1</b>	3 A-388 x 12-366
<b>2</b>	13B-56 X 12-366
<b>3</b>	3 A-360 X 3B-08

Se aplicó el protocolo de regeneración de plantas a partir de embrión cigótico inmaduro, establecido en el laboratorio en el año 2018. Se procedió a la desinfección del material vegetal (embriones cigóticos inmaduros cubiertos por parte del mesocarpo). Seguidamente, se establecieron in vitro los embriones cigóticos en medio de germinación donde permanecerán por 2 a 3 meses para su desarrollo. Posteriormente, las plántulas serán cultivadas en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de  $AlCl_3$  para determinar la Dosis Mínima Letal (DML) por diferentes tiempos de cultivo. La dosis más baja de  $AlCl_3$  que elimine el 100% de las plantas será considerada la DML y se utilizará para tratar y seleccionar masivamente plántulas con tolerancia al aluminio.

Se extraerá el meristemo de las plantas sobrevivientes y se establecerán en un medio de cultivo de formación de callo (Fig.1) para la propagación de clones mediante embriogénesis somática.

Adicional se obtuvieron otros frutos de híbridos tenera como alternativa para disponer de plántulas in vitro para este ensayo de selección y para el ensayo de formación de callos a partir de la región meristemática (Fig.2).

### 3. Resultados:

Fueron establecidos aproximadamente 187 embriones cigóticos de los tres cruzamientos dirigidos.

Se sembraron en medio de germinación y estarán por un tiempo de 2 a 3 meses para luego extraer la región meristemática. Estos embriones cigóticos establecidos se encuentran iniciando la fase de germinación (Fig. 2). Los embriones cigóticos establecidos de los otros híbridos tenera ya presentan plántulas de 2,5 meses que serán utilizadas para los ensayos (Fig. 3).

### 4. Conclusiones:

- Las plántulas de los cruzamientos dirigidos estarán listas, aproximadamente para el mes de enero 2023.
- Se ha trabajado con embriones cigóticos de otros híbridos tenera para establecer el ensayo de selección con  $AlCl_3$  y determinar la DML; así como para determinar la mejor dosis de 2,4-D para la formación de callo. Este último ensayo tributa al proyecto FIASA-EELS-2022-008.

**5. Recomendaciones:** Se recomienda proporcionar más material vegetal de los cruzamientos dirigidos para acelerar los diferentes ensayos

### 6. Bibliografía:

Albertazzi-Leandro, H., Bulgarelli-Mora, J. M., & Chinchilla-López, C. M. (2005). Onset of spearrot symptoms in oil palm and contemporary events. Eventos previos y contemporáneos a la aparición de los síntomas de la pudrición del cogollo en palma aceitera. ASD Oil Palm Papers., (28), 11-41.



Cristancho, J. Á., Castilla, C. E., Rojas, M., Munevar, F., & Ch, J. H. S. (2007). Relación entre la saturación de Al, Mg, K y la tasa de crecimiento de la pudrición de cogollo de la palma de aceite en la Zona Oriental Colombiana. *Revista palmas*, 28(2), 25-35.

Laing, D. R. (2010). La causa de la pudrición de cogollo en la palma de aceite: papel del calcio en una hipótesis abiótica-edáfica. *Sociedad ecuatoriana de la Ciencia del Suelo*, 1-25.

Rivera, Y., Moreno, L., Herrera, M., & Romero, H. M. (2016). La toxicidad por aluminio (Al<sup>3+</sup>) como limitante del crecimiento y la productividad agrícola: el caso de la palma de aceite. *Palmas*, 37(1), 11-23.

McLaughlin, S. B., & Wimmer, R. (1999). Tansley review no. 104. *New Phytologist*, 142(3), 373-417.

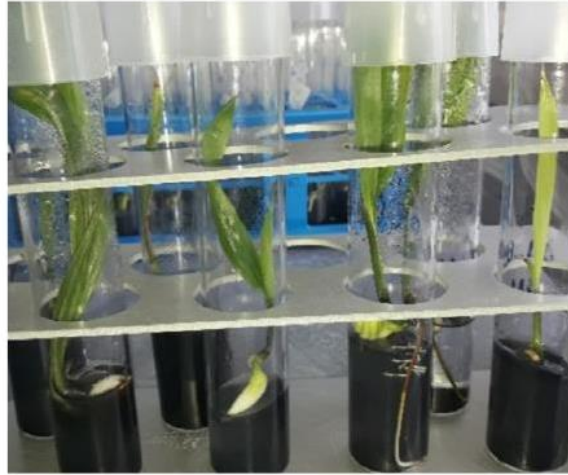
**Anexos:**



**Figura 1.** Los tres cruzamientos dirigidos del híbrido Tenera. Extracción de frutos, desinfección y establecidos in vitro.



**Figura 2.** Frutos de híbridos Tenera establecidos in vitro para obtener plántulas para los ensayos de selección y establecimiento de la DLM con  $AlCl_3$



**Figura 3.** Embriones cigóticos germinados in vitro con 2,5 meses para utilizar en los ensayos de formación de callos y selección in vitro.

**Proyecto 4. Proyecto AIEA\_Fortalecimiento de capacidades para la prevención y el manejo de la marchitez por Fusarium de las Musáceas en América Latina y el Caribe**

**Responsable:** Antonio Bustamante

**Responsable de actividad EELS:** Elisa Quiala

**Colaboradores:** Inés Tapay, Raphael Peñafiel, Paul Vélez, Bertín Osorio, Gerardo Martínez, Cristian Zambrano (técnicos FIASA), Eloy Orellana (Responsable del NTD). Finca BANAPORTI y Finca ORHID.

**Trabajadores de apoyo:** Mónica Puga

**Fuente de financiamiento:** Fondos FIASA y gasto corriente INIAP

### **1.0 Antecedentes**

En el laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP se desarrollan dos proyectos en el rubro banano, financiados con fondos nacionales (INIAP y FIASA) e internacionales de la Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA). Estos involucran técnicas de mejoramiento como la inducción de mutaciones y la edición génica. Sin embargo, para el uso del cultivo in vitro en un programa de mejoramiento genético, un requisito indispensable es contar con un sistema eficiente de regeneración de plantas que permita que las células modificadas genéticamente puedan desarrollarse y regenerar plantas que manifiesten las características deseadas. El uso de técnicas biotecnológicas tales como la mutagénesis in vitro (Novak, 1992) se ve afectada debido a que el tratamiento mutagénico a tejido multicelular resulta en un alto grado de quimerismo (Ahloowalia, 1998). De aquí la importancia de utilizar explantes que se formen de una o pocas células como los embriones somáticos (Lee et al., 1997) y las yemas adventicias (Vuylsteke et al., 1997). Además, con el uso de yemas adventicias, la variabilidad puede ser incrementada, lo cual es favorable para el mejoramiento genético.

De lo anterior se concluye que en ambos proyectos que se llevan en el INIAP, primero se requiere, disponer de protocolos eficientes de regeneración de plantas vía organogénesis y embriogénesis somática en banano, que garanticen los cultivos in vitro apropiados para estos fines, como son las yemas adventicias, los embriones somáticos, las suspensiones celulares embriogénicas y en un futuro los protoplastos.

La finalidad de esta actividad fue implementar en el laboratorio de biotecnología de la EELS, protocolos de regeneración de plantas de banano Williams vía embriogénesis somática a partir de domos meristemáticos de yemas adventicias o multiyemas (Método de Scalps), para asistir el mejoramiento genético asistido por mutagénesis con radiaciones gamma Co60.

### **Actividad 1. Desarrollo de un protocolo de regeneración de plantas vía embriogénesis somática de banano Williams a partir de Scalps.**

El desarrollo de protocolos in vitro requiere de una fuente de suministro periódico de explantes, que sea de fácil acceso y en condiciones semi-controladas de cultivo, para monitorear y mejorar el estado fisiológico y fitosanitario de la planta donante, por lo que fue necesario establecer un jardín clonal con plantas de banano Williams en la EELS, como paso previo al desarrollo del protocolo de inducción de las yemas adventicias.

#### **2.0 Metodología**

##### **2.1 Establecimiento de un banco de plantas donantes de explantes en condiciones de campo, invernadero y laboratorio.**

###### **2.1.1 Establecimiento del Jardín clonal en campo**

El trabajo se desarrollará en campo de la Estación Experimental Litoral Sur ubicado en el km 26 de la vía Duran-Tambo y en el laboratorio de biotecnología ubicado en esta estación.

**Ubicación del jardín clonal:** El ensayo de campo se estableció en un área de 0.5 ha con un total de 290 plantas de dos cultivares de William, con una densidad de siembra de 2.5 m entre hilera x 2.7 m entre plantas.

**Características edafoclimáticas:** El clima es unos de los factores más importantes en una plantación, ya que esto influye sobre las características morfológicas, y el comportamiento del cultivo.

- Zona climáticas - Bosque seco tropical
- Temperatura promedio - 26°C
- Topografía – Plana
- Tipo de suelo – Franco Arcilloso
- Heliofanía anual – 593.6 horas

**Material vegetal:** Se utilizaron 250 plantas de origen meristemático del cultivar Williams Orange 2-05 con seis meses de adaptación en invernadero, procedente del laboratorio comercial OrangeLab y 40 plantas de Williams de Porte bajo, igualmente con seis meses de

adaptación en invernadero procedente del laboratorio comercial SEBIOCA vinculado al CIBE-ESPOL; ambos cultivares de Williams tienen una alta demanda para la exportación.

El establecimiento y manejo del banco de plantas donantes o jardín clonal se realizó de acuerdo al protocolo aprobado por comité técnico *Establecimiento de un banco de plantas donantes de Banano Williams en campo de la EELS*.

### **2.1.2 Establecimiento de plantas en invernadero.**

**Material vegetal:** El material vegetal para establecer el banco consistió en plantas de banano cv Williams Orange 2-05 de origen meristemático con seis meses de adaptación en invernadero y colinos de banano Williams Gigante, colectados en la finca BANAPORTI (cantón el Triunfo). Estos colinos se obtuvieron a partir de hijos espadas de 50-70 cm de altura, extraídos de plantas madres sanas, seleccionadas por sus características estables de rendimiento (14 manos por racimo). Antes de la siembra el material proveniente de la finca recibió un tratamiento diferente a las plantas meristemáticas, para lo cual se procedió de acuerdo al procedimiento descrito por Orellana, (1995) para el tratamiento de semillas de bananos y plátanos durante la cuarentena en invernadero, previo al establecimiento in vitro.

**Siembra:** Se prepararon las camas de invernadero de 3 m<sup>2</sup> con una mezcla de sustrato: suelo de la EELS, más cascarilla de arroz (3:1 v/v). A cada cama se aplicó fertilización edáfica por cada cama se incorporó al sustrato 150 g de fertilizante N-P-K (8-20-20) y 75 gr de fertilizante silicatado (83% de dióxido de silicio). Al siguiente día se aplicó un riego por inundación hasta alcanzar la capacidad de campo. Se sembraron 30 plantas por cada cama y se colocaron las respectivas etiquetas. A los 30 días después de la siembra se aplicó fertilización foliar (2.0 ml de fertilizante Nitrógeno foliar + 25 gr de dióxido de Si), la mezcla se aplicó a razón de 40 ml por planta.

A los 45 días después de la siembra, las plantas se extrajeron de las camas, se decapitaron dejando una altura de 10 cm del pseudotallo y después de retirar los restos de sustrato con agua corriente bajo la llave y la ayuda de un cepillo de cerdas duras, se procedió al mondado y reducción de los cormos hasta obtener un colino de 5 cm de base x 5 cm de altura. Estos colinos se trasladaron al laboratorio para iniciar el proceso de establecimiento in vitro.

### **2.1.3 Establecimiento de plantas in vitro.**

En el laboratorio, para la desinfección de los colinos de 5 cm de base x 5 cm de altura procedentes del invernadero se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 3% en la cual se sumergieron los explantes por 40 minutos. Posteriormente, se redujo el tamaño del colino hasta alcanzar un ápice meristemático de 3 x 4 cm. Transcurrido los 40 min el material vegetal se trasladó a la cabina de flujo laminar y se procedió con una segunda desinfección con hipoclorito de sodio durante 20 min; seguidamente con ayuda de pinzas y bisturí estériles se extrajeron ápices meristemáticos de aproximadamente 0,7 cm de base x 1 cm de alto. Los ápices se sembraron en tubos de ensayo que contenían medio de cultivo Murashige y Skoog, (1986) complementado con sacarosa y reguladores del crecimiento. A los 35 días los explantes libre de contaminantes visibles, fueron repicados y subcultivados a medio de cultivo fresco para iniciar el proceso de multiplicación.

## **2.2 Desarrollo de un protocolo de inducción de yemas adventicias in vitro para la obtención de Scalps.**

El protocolo de embriogénesis somática a partir de yemas adventicias comprende entre 26 a 30 meses hasta lograr plantas regeneradas, es por ellos que en esta actividad la meta a alcanzar durante el 2022 fue estandarizar un protocolo para la formación de las yemas adventicias (entre 6 a 9 meses), como paso previo a la inducción de los callos embriogénicos de banano mediante el método de Scalps.

En este método de propagación, para formar las yemas adventicias se requiere añadir al medio de cultivo elevadas concentraciones de citoquininas (CK). Es por ello que, en el ensayo 1 se evaluaron diferentes tratamientos con este tipo de regulador del crecimiento incorporado al medio de cultivo semisólido durante dos subcultivos sucesivos, con una frecuencia de 30 días. Los explantes resultantes de este ensayo 1 se inocularon en los biorreactores de inmersión temporal (BIT) para estimular la multiplicación y el crecimiento de las yemas adventicias hasta lograr la formación de plantas verdes y viables.

### **2.2.1 Ensayo 1: Efecto de la concentración de tratamientos con citoquininas en la inducción de yemas adventicias.**

**Material vegetal:** Como material vegetal se utilizaron ápices de plantas en tercer subcultivo de multiplicación (P3), establecidas in vitro a partir de ápices meristemáticos de plantas de invernadero del cultivar William de Porte bajo. El establecimiento in vitro, así como la multiplicación se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Orellana (1995).



**Inducción de yemas adventicias:** Para la obtención de las yemas adventicias o multiyemas se utilizó el protocolo descrito por García et al. (2006). Se colocaron brotes seccionados de 0,5 cm<sup>2</sup>, los cuales incluían la región meristemática. Se distribuyó cinco explantes por frasco de 220 ml de capacidad, con 30 ml de medio de cultivo para la formación de multiyemas (MFY). Este medio contenía las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), 1.0 mg. l<sup>-1</sup> de tiamina y 30 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y diferentes dosis de citoquinina (CK), resultando en un total de seis tratamientos. Los medios de cultivo fueron solidificados con 7.0 g.l<sup>-1</sup> de agar. El pH se ajustó a 5.8 antes del proceso de esterilización en autoclave a 121°C durante 20 min.

**Evaluación de las yemas adventicias:** se identificaron como yemas adventicias las estructuras globosas, de color blanquecino y de tamaño entre 1.0 - 3.0 mm, que se desarrollaron en la superficie del explante.

**Tabla 1. Descripción de los tratamientos con diferentes tratamientos con citoquininas**

Tratamientos Dosis de CK (mg.l <sup>-1</sup> )	Número de explantes/frasco	Número de frascos/tratamiento	Total de explantes /tratamiento
<b>T1</b>	5	5	25
<b>T2</b>	5	5	25
<b>T3</b>	5	5	25
<b>T4</b>	5	5	25
<b>T5</b>	5	5	25
<b>T6</b>	5	5	25

Los explantes se transfirieron a medio de cultivo fresco de igual composición con una frecuencia de 30 días.

A los 90 días de cultivo se evaluó el número de explantes por frasco con formación de yemas adventicias, de explantes con formación de brotes verdes y ambas variables se expresaron en porcentajes (frecuencia de formación de yemas adventicias y de brotes verdes). También se determinó el número de yemas adventicias y de brotes con hojas verdes formados por explante.

### **2.2.2 Ensayo 2. Multiplicación de yemas adventicias y regeneración de plantas de banana Williams en biorreactores de inmersión temporal (BIT).**

El objetivo de este ensayo fue determinar el efecto que tiene el tratamiento con CK utilizado para la formación de las yemas adventicias en medio de cultivo semisólido sobre la posterior multiplicación de las yemas adventicias en los BIT y su capacidad de regenerar en plantas verdes y viables.

Los explantes con yemas adventicias procedentes del segundo subcultivo en MFY (Ensayo 1) se utilizaron como inóculo para los biorreactores de inmersión temporal (BIT). Estos se distribuyeron a razón de cinco por cada frasco de biorreactor manteniendo la procedencia del tratamiento con CK. Por cada biorreactor se distribuyó 500 ml de medio de cultivo MFY, el cual consistió en la mejor variante de medio de cultivo con CK seleccionada en el Ensayo 1, pero en estado líquido. Cada BIT fue etiquetado con la variante de MFY del cual procedían, para dar seguimiento al efecto del tratamiento con CK utilizado previamente en la formación de multiyemas, por lo que el Ensayo en los BIT contó con seis tratamientos y cada BIT se replicó tres veces para un total de 18 biorreactores.

A los 45 días se renovó el medio de cultivo MFY por medio de cultivo de crecimiento de multiyemas (medio MCY) para estimular la elongación de las yemas adventicias y la formación de brotes verdes. Después de 21 días se agregó 500 ml más de medio de cultivo MCY a cada biorreactor y a los 90 días de inoculados los biorreactores se procedió a la cosecha y evaluación del ensayo. Se evaluó el número de brotes verdes viables formado por cada biorreactor.

### **3. Resultados**

#### **3.1 Establecimiento de un banco de plantas donantes de explantes (jardín clonal) en condiciones de campo e invernadero para iniciar los cultivos in vitro.**

##### **3.1.1 Establecimiento del Jardín clonal en campo**

Se logró establecer en campo de la EELS el jardín clonal, a partir de plantas banano Williams de origen meristemático 40 de ellas procedentes de la biofábrica SEBIOCA de la ESPOL (Williams cv Porte Bajo) y 250 plantas de Williams cv Orange 2-05 procedentes del laboratorio. El material se estableció satisfactoriamente en campo y con la ayuda de la administración se instaló en la parcela un sistema de riego por goteo (Fig. 1 A y 1C).

Aunque las 250 plantas del cv Orange 02-5 se establecieron en su totalidad, se eliminaron 10 plantas que presentaron características no idóneas, de ellas nueve por lento crecimiento y porte bajo y una por variegación (Fig. 1B).

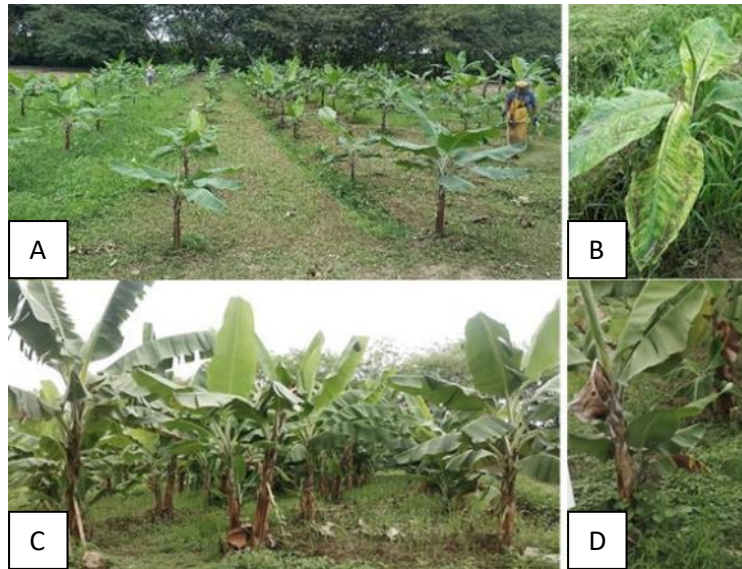


Figura 1. A) Plantas de banano Williams cv Orange 2-05 procedentes de laboratorio OrangeLab, sembradas en campo e invernadero (15 días). B) Planta variegada detectada en el cv Orange. C) Plantas de banano Williams Porte Bajo procedentes de biofábrica SEBIOCA establecidas en campo (45 días). D) Planta de Williams Porte Bajo con incidencia de sigatoka negra.

En las plantas del cv de Porte bajo, no se observaron cambios fenotípicos, pero se registró incidencia de sigatoka negra en tres plantas (Fig. 1D). En cuanto al William Orange 02-5 no se ha detectado incidencia de enfermedades.

### **3.1.2 Establecimiento de plantas donantes en invernadero.**

En condiciones de invernadero se sembraron un total de 27 colinos del cultivar de Williams Gigante, procedentes de plantas madres sanas seleccionadas por su rendimiento (racimo con 14 manos) en la finca BANAPORTI.



Figura 2. Establecimiento en invernadero de banco de plantas para la cuarentena, previo al establecimiento in vitro. A) Planta madre seleccionada en finca BANAPORTI. B) Traslado de colinos a la EELS. C) Preparación de material de siembra. D) Siembra de colinos en camas de 3 m<sup>2</sup>. E) Plantas de William Gigante procedentes de la Finca BANAPORT, 45 días

después de establecidas. F) Plantas meristemáticas procedentes de viveros de OrangeLab, establecidas en camas de invernadero.

Este mismo procedimiento permitió establecer 210 plantas de Williams Orange 2-05, procedentes de los viveros de la Empresa OrangeLab. Se distribuyeron 30 plantas por camas de 3 m<sup>2</sup> con sustrato compuesto por suelo de la EELS y cascarilla de arroz en una proporción 3:1 (v/v)

### 3.1.3 Establecimiento de plantas in vitro.

La aplicación del protocolo de propagación masiva descrito por Orellana (1995) para bananos y plátanos permitió establecer in vitro un total de 18 ápices meristemáticos de banano Williams Gigante, 100 ápices meristemáticos de Williams Porte Bajo y 158 ápices de Williams Orange 02 5.



Figura 3. Plantas desarrolladas in vitro a partir de ápices meristemáticos de banano a los 35 días del establecimiento. A) Williams Porte bajo. B) Williams Orange. C) plantas en fase de multiplicación (21 días).

A los 35 días después del establecimiento in vitro, las plantas desarrolladas a partir de los ápices meristemáticos (Fig. 3A y 3B), se subcultivaron (repique y transferencia a medio fresco) a medio de cultivo de multiplicación (Fig. 1C). Al momento de este informe se dispone de 654 plantas (en P3 y P4) del cv William Orange 02 5 y 50 plantas en P1 de este mismo cultivar, 400 plantas en P5 de William Porte Bajo y 16 plantas en P1 de Williams Gigante.

### 3.2 Desarrollo de un protocolo de inducción de yemas adventicias in vitro para la obtención de Scalps.

#### 3.2.1 Ensayo 1: Efecto de la concentración de tratamientos con citoquininas en la inducción de yemas adventicias.

El efecto de los tratamientos con CK estudiados en la frecuencia de explantes con formación de las yemas adventicias y de brotes verdes a los 90 días de cultivo (segundo subcultivo) se muestra en la Figura 4. En todos los tratamientos con CK la frecuencia de explantes con formación de multiyemas fue elevada, sin diferencias entre los tratamientos; mientras que la frecuencia de formación de brotes verdes

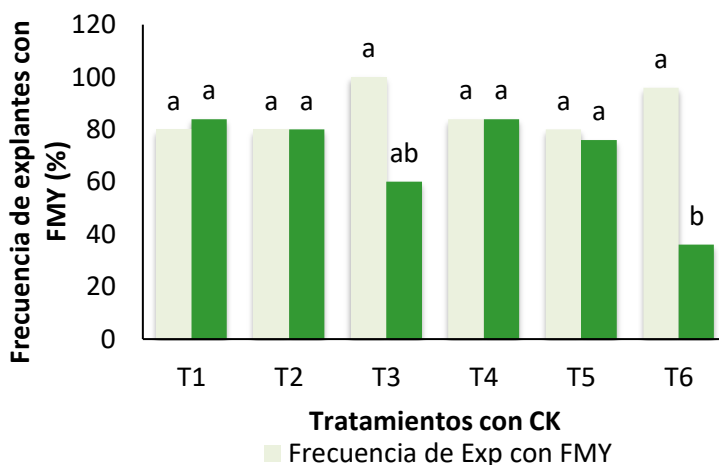


Figura 4. Efecto de diferentes tratamientos con CK en la frecuencia de explantes con formación de yemas adventicias o multiyemas (FMY) y con formación de brotes verdes (FBV), después de dos subcultivos sucesivos cada 30 días en medio de cultivo semisólido (90 días de cultivo). El mayor número de multiyemas por frasco se obtuvo con el tratamiento T2 y T3, con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos. En cuanto al número de brotes verdes, la frecuencia fue similar en estos dos tratamientos (Tabla 1, Anexos).

Los explantes mostraron diferencias morfológicas en cuanto al desarrollo de los brotes formados en el primer y segundo subcultivo. En el primer subcultivo se pudo observar la formación de brotes verdes, aunque pequeños en la totalidad de los explantes con escasa formación de multiyemas (Fig. 5). En el segundo subcultivo la totalidad de los explantes en todas las variantes formaron estructuras globosas de color blanco-cremoso multiyemas, con escasa formación de brotes verdes (Fig. 6). Solo dos subcultivos fueron necesarios para lograr el desarrollo de yemas



Figura 5. Explantes en primer subcultivo en medios de cultivo con elevadas concentraciones de citoquinina (CK). (Nótese la formación aún de brotes verdes) adventicias en la superficie de los explantes



Figura 6. Explantes en segundo subcultivo en medios de cultivo con elevadas dosis de citoquinina (CK). Nótese la formación sobre el explante de estructuras globosas de color blanco-cremoso (multiyemas) y la escasa presencia de brotes verdes.

### 3.2.2 Ensayo 2. Multiplicación de yemas adventicias y regeneración de plantas de banano Williams en biorreactores de inmersión temporal (BIT).

En la segunda semana de cultivo, después de inoculados los explantes con multiyemas en los BIT, se pudo observar que estas estructuras globosas se multiplicaron y comenzaron a formar brotes verdes (Fig. 7A). Los brotes comenzaron a elongar, después de la primera renovación del medio de cultivo de FMY por el de multiplicación, realizado a los 30 días (Fig. 7B). Después de la segunda renovación el frasco del biorreactor se llenó de brotes (Fig. 7C). A los 90 días se cosecharon los BIT para evaluar el número de brotes regenerados a partir de los explantes con multiyemas (Fig. 7D). El ensayo se evaluó el día 3 de febrero 2023, con lo cual los datos experimentales aún no están disponibles.



Figura 7. Multiplicación y regeneración de yemas adventicias de banano Williams en BIT. A) Explante con formación de multiyemas y brotes verdes a los 15 días después de inoculados en los BIT. B) Brotes después de la primera renovación del medio de cultivo de FMY por el medio de multiplicación de brotes. C) Biorreactores de inmersión temporal con



brotos después de la segunda renovación de medio de cultivo. D) Cosecha y evaluación de brotes cultivados en los BIT a partir de las yemas adventicias.

#### 4. Conclusiones

- Se logró establecer por primera vez un protocolo novedoso de inducción y regeneración de plantas de banano a partir de yemas adventicias, mediante el uso combinado de medios de cultivo semisólido y biorreactores de inmersión temporal.

#### 5. Recomendaciones

- Utilizar el protocolo descrito para inducir mutaciones en multiyemas de banano con radiaciones ionizantes y regenerar plantas posibles mutantes.
- Inducir masivamente multiyemas para establecer las subsiguientes fases de la embriogénesis somática a partir de domos meristemáticos de yemas adventicias.

#### 6. Bibliografía

- Makara AM, Rubaihayo PR, Magambo MJS (2010) Carry-over effect of Thidiazuron on banana *in vitro* proliferation at different culture cycles and light incubation conditions. African Journal of Biotechnology 9(21):3079-3085
- Murashige T, Skoog R (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-497
- Najmeh J, Yasmin OR, Norzulaani K (2011) Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on *in vitro* shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. 'Berangan'. African Journal of Biotechnology 10 (13): 2446-2450; doi:10.5897/AJB1001149
- Ngomuo M, Mneney E, Ndakidemi PA (2014) The *in vitro* propagation techniques for producing banana using shoot tip cultures. American Journal of Plant Sciences 5: 1614-1622; doi:10.4236/ajps2014.511175
- Orellana P (1995) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis para aspirar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, UCLV, Santa Clara, Cuba
- Schoofs H, Panis B, Swennen R (1998) Competence of scalps for somatic embryogenesis in *Musa*. Acta Horti 490 (1): 475-483
- Buah J, Danso E, Taah K, Abole E, Bediako E, Asiedu J, Baidoo R (2010) The effects of different concentration cytokinins on the *in vitro* multiplication of plantain (*Musa* spp.). Biotechnology 9(3): 343-347; doi: 10.3923/biotech.2010.343.347
- García LR, Pérez JP, Bermúdez-Caraballoso I, Orellana P, Veitía N, García L, Padrón Y, Romero C (2006) Nuevo protocolo para la rápida inducción de yemas adventicias y la

regeneración de plantas en banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*). Biotecnología Vegetal 6(1): 15-21

## Anexo 1. Análisis de la varianza del efecto de diferentes tratamientos con CK en la inducción de yemas adventicias de banano.

### Frecuencia de explantes con Formación de Multiyemas

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Frecuencia de FMY	30	0.21	0.04	20.85	

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2026.67	5	405.33	1.24	0.3212
Tratamientos	2026.67	5	405.33	1.24	0.3212
Error	7840.00	24	326.67		
Total	9866.67	29			

### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=35.34372

Error: 326.6667 gl: 24

Tratamientos	Medias	n	E.E.
T3	100.00	5	8.08 A
T6	96.00	5	8.08 A
T4	84.00	5	8.08 A
T2	80.00	5	8.08 A
T5	80.00	5	8.08 A
T1	80.00	5	8.08 A

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

### Frecuencia de explantes con Formación Brotes verdes

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Frecuencia de FBV	30	0.51	0.41	26.85	

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8920.00	5	1784.00	5.05	0.0027
Tratamientos	8920.00	5	1784.00	5.05	0.0027
Error	8480.00	24	353.33		
Total	17400.00	29			

### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=36.75802

Error: 353.3333 gl: 24

Tratamientos	Medias	n	E.E.
T1	84.00	5	8.41 A
T4	84.00	5	8.41 A
T2	80.00	5	8.41 A
T5	76.00	5	8.41 A
T3	60.00	5	8.41 A B
T6	36.00	5	8.41 B

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

#### Número de Multiyemas por frasco de cultivo

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Nro. MY/frasco	30	0.78	0.74	29.47	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4947.50	5	989.50	17.25	<0.0001
Tratamientos	4947.50	5	989.50	17.25	<0.0001
Error	1376.80	24	57.37		
Total	6324.30	29			

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=14.81118

Error: 57.3667 gl: 24

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T3	45.40	5	3.39	A
T2	37.20	5	3.39	A B
T6	30.20	5	3.39	B C
T4	16.00	5	3.39	C D
T1	15.60	5	3.39	C D
T5	9.80	5	3.39	D

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

#### Número de brotes verdes por frasco de cultivo

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Nro. BV/frasco	30	0.33	0.19	62.62	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	418.17	5	83.63	2.33	0.0736
Tratamientos	418.17	5	83.63	2.33	0.0736
Error	861.20	24	35.88		
Total	1279.37	29			

#### Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=11.71403

Error: 35.8833 gl: 24

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T4	16.00	5	2.68	A
T5	12.00	5	2.68	A B
T1	9.60	5	2.68	A B
T2	8.60	5	2.68	A B
T3	7.00	5	2.68	A B
T6	4.20	5	2.68	B

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

### Actividad 3. Producción científica y difusión de resultados (publicaciones científicas, técnicas, capacitaciones)

- ✓ Se publicó un artículo científico en la revista *Trees - Structure and Function* de la *Web of Science: Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf of the interspecific hybrid of mahogany (Swietenia macrophylla king x S. Mahagoni (L.) Jacq.)*. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02192-x>
- ✓ Se publicó el tríptico titulado “Tecnología para la producción de semilla de camote de sanidad controlada”, el cual se anexa a este documento para su revisión.
- ✓ Una tesis de pregrado desarrollada en el laboratorio.
- ✓ Se desarrolló el curso de capacitación práctico a dos técnicos de la EETP del proyecto de edición génica y dos investigadoras del INIA de Venezuela, en el cual se impartió capacitación en la embriogénesis somática de banano, cultivo de anteras, manejo de biorreactores de inmersión temporal y preparación de muestras para el análisis de ploidía mediante citometría de flujo.
- ✓ Evaluadora de proyectos FIASA de la convocatoria 2023.
- ✓ Arbitraje de artículo científico de la Revista indexada

### Principales logros alcanzados por el laboratorio en el 2022

- Cuatro proyectos aprobados uno como ejecutores y tres como co-ejecutores; de estos últimos uno es un proyecto internacional financiado por la AIEA.
- Creación de un banco de plantas de banano Williams en campo, conformado por dos cultivares (William Orange 02 5) y William de Porte Bajo, donantes de ápices meristemáticos e inflorescencias masculinas inmaduras para el cultivo in vitro.
- Creación de un banco de plantas in vitro de banano William, con ejemplares de tres cultivares: 654 plantas (P3 y P4) y 50 plantas en P1 del cv William Orange 02 5, 400 plantas en P5 de William Porte Bajo y 16 plantas en P1 de Williams Gigante.
- Se cuenta con más de 2000 explantes procedentes de inflorescencias masculinas inmaduras en fase de formación de callos, de los cultivares William Porte Bajo y William Gigante.
- Se dispone de materiales en formación de callos de cuatro híbridos de café seleccionados por la ESPAMMFL por su rendimiento y la resistencia a roya.
- Un protocolo establecido para la clonación de plantas progenitoras de palma aceitera vía embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras.

- Se implementó un protocolo novedoso de regeneración de plantas vía yemas adventicias en banano Williams útil para la inducción de mutaciones. Este protocolo será validado con los otros cultivares de banano.
- Se logró ejecutar el Proyecto FIASA-EELS-2022-008 con 95,25% de ejecución financiera y más del 85% de ejecución técnica, por lo que se cumplió con lo establecido en el manual de operaciones del FIASA.
- Se realizaron tres entregas al PA de materiales regenerados a partir del cultivo de anteras, con un total de 98 líneas entregadas.
- Se publicó un artículo científico en revista indexada
- Se publicó un tríptico en el rubro camote