



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

Tesis de Grado

Presentado al H. Consejo Directivo de la Facultad, como requisito previo a la obtención del título de:

Ingeniero Agropecuario

Tema:

“Detección temprana de mutantes de banano tolerantes o resistentes a Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) en condiciones de vivero”

Autor:

Alex Vladimir Valarezo Pacheco

Director:

Ing. Agr. Ph. D. Walter Oswaldo Reyes Borja.

Babahoyo– Los Ríos - Ecuador

-2015-



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

TESIS DE GRADO

PRESENTADA AL H. CONSEJO DIRECTIVO COMO REQUISITO PREVIO
A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO AGROPECUARIO

Tema:

“Detección temprana de mutantes de banano tolerantes o resistentes a Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) en condiciones de vivero”

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Ing. Agr. Joffre León Paredes MBA.

PRESIDENTE

Ing. Agr. Rosa Elena Guillen Mora

VOCAL PRINCIPAL

Ing. Agr. Álvaro Pazmiño Pérez MSc.

VOCAL PRINCIPAL



Las investigaciones, resultados, conclusiones y recomendaciones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad del autor:

Alex Vladimir Valarezo Pacheco

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación se lo dedico a mi amada familia por apoyarme incondicionalmente:

Mis padres: Magdalena Pacheco y Walter Valarezo.

Mis hermanos: Ximena y Stalin.

Mi sobrinita: Danna Camila Campi.

Mis abuelitas: Luisa Jácome y Delia Reyes.

Y en especial a mi tía Lupita.

Alex Vladimir Valarezo Pacheco

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme brindado salud y darme la fuerza que necesite para culminar este trabajo de investigación.

A la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación y al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – Estación Experimental Litoral Sur – Departamento de Biotecnología.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Babahoyo, por haberme instruido profesionalmente.

A mi tutor de tesis Walter Oswaldo Reyes Borja, Ing. Agr. Ph. D. por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación.

A la Ing. Leticia Vivas por su colaboración en este trabajo.

A los miembros del Centro de Investigación y Transferencia de Tecnología (CITTE) FACIAG. A su secretaria Lcda. Emilia Meneses de Rodríguez.

A mis compañeros, amigos de INIAP y familiares: Marcos, Lenin, Oscar, José, Wladimir, Jesús, Alex, Jhonson, Moniquita, Adrianita, Mónica, Gabriel, Fredy, Eugenia, Elena, Nelson, Mariuxi, Dianita, María, Guillermo, Cristofer, Juan, Claudia, Gabriela, Cristina, Byron, Philip, Juan Carlos, Lidia, Betty, Maribel, Naty, Alicia, Maritza, Patricia, Gina, Raquel, Luisa, Ana, Vicente, Pepe, Rómulo, Astrid, Gino, Dussan, Erick y Luis.

Alex Vladimir Valarezo Pacheco

INDICE

DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
INDICE.....	VI
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
INDICE DE ANEXOS.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS	3
1.1.1. Objetivo General.....	3
1.1.2. Objetivos Específicos	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO DE MUSÁCEAS	4
2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL BANANO	4
2.3. ORIGEN DEL BANANO.....	5
2.4. DESCRIPCIÓN DEL BANANO.....	5
2.5. ENFERMEDADES QUE ATACAN AL BANANO	6
2.5.1. Moko (<i>Pseudomonas solanacearum</i>).....	6
2.5.2. Mal de panamá (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>)	7
2.5.3. Sigatoka Negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i> , Morelet).....	8
2.5.3.1. Agente Causal	9
2.5.3.2. Epidemiología y síntomas.....	10
2.6. RESISTENCIA GENÉTICA	11
2.7. BIOTECNOLOGÍA	11
2.7.1. Cultivo de tejidos.....	12
2.7.2. Organogénesis directa.....	12
2.7.3. Micropropagación de banano	13
2.8. Mutagénesis	13
2.8.1. Mutaciones naturales	14
2.8.2. Mutaciones inducidas	14
2.8.3. Condiciones que debe reunir un agente mutagénico	15
2.8.4. Tipos de mutagénicos	15
2.8.4.1. Mutagénicos químicos.....	16
2.8.4.2. Mutagénicos físicos.....	16

2.8.5. Dosis	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. LOCALIZACIÓN	18
3.2. MATERIAL VEGETAL	18
3.3. MATERIALES, EQUIPOS DE LABORATORIO Y REACTIVOS	18
3.4. FACTORES ESTUDIADOS	19
3.5. TRATAMIENTOS ESTUDIADOS.....	19
3.6. MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i> POR MERISTEMOS APICALES	23
3.6.1. Colecta de hijuelos	23
3.6.2. Introducción de los meristemos apicales al laboratorio.....	23
3.6.3. Multiplicación del material genético (explantos)	24
3.7. OBTENCIÓN DE MICROCORMOS A PARTIR DE PLANTAS DE VIVERO	26
3.7.1. Adquisición de vitroplantas de vivero	26
3.7.2. Preparación de las vitroplantas para la obtención de microcormos e implementación de la pruebas de germinación	26
3.8. APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS MUTAGÉNICOS.....	28
3.8.1. Mutagénico físico (rayos gamma)	28
3.8.1.1. Meristemos apicales.....	32
3.8.1.2. Microcormos.....	33
3.8.2. Mutagénico químico (Ethylmethanesulfonate)	35
3.8.2.1. Meristemos apicales.....	35
3.8.2.2. Microcormos	38
3.9. PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA	40
3.10. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL_{50})	40
3.11. MULTIPLICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO TRATADO CON LOS MUTAGÉNICOS FÍSICO Y QUÍMICO.....	43
3.12. REGENERACIÓN Y ENRAIZAMIENTO	44
3.13. ACLIMATACIÓN DE VITROPLANTAS EN CONDICIONES DE VIVERO.....	46
3.14. REACCIÓN A <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> , MORELET EN VITROPLANTAS DE VIVERO ...	48
3.14.1. Preparación del inóculo de <i>M. fijensis</i>	49
3.14.2. Inoculación y evaluación de la reacción a <i>M. fijensis</i> en las vitroplantas	49
3.14.3. Determinación del porcentaje ponderado de infección (PPI).....	50
3.14.4. Selección de plantas de menor reacción a <i>M. fijensis</i>	53
3.15. VARIABLES EVALUADAS	53
3.15.1. Promedio ponderado de infección	53
3.15.2. Detección de variantes fenotípicas	54
3.15.3. Contenido de clorofila en vitroplantas.....	54
3.16. DISEÑO EXPERIMENTAL	55

3.17.	ANÁLISIS DE VARIANZA EN CADA ENSAYO.....	56
3.18.	ANÁLISIS FUNCIONAL	58
4.	RESULTADOS.....	59
4.1.	MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i> POR MERISTEMOS APICALES	59
4.1.1.	Colecta de hijuelos	59
4.1.2.	Introducción de los meristemos apicales al laboratorio.....	59
4.1.3.	Multiplicación del material genético (explantos)	63
4.2.	OBTENCIÓN DE MICROCORMOS A PARTIR DE PLANTAS DE VIVERO	64
4.2.1.	Adquisición de vitroplantas de vivero.....	64
4.2.2.	Preparación de las vitroplantas para la obtención de microcormos e implementación de las pruebas de germinación.....	64
4.3.	APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS MUTAGÉNICOS.....	68
4.3.1.	Mutagénico físico (rayos gamma).....	68
4.3.1.1.	Meristemos apicales.....	75
4.3.1.2.	Microcormos.....	75
4.3.2.	Mutagénico químico.....	75
4.3.2.1.	Meristemos apicales.....	78
4.3.2.2.	Microcormos.....	78
4.4.	PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA.....	78
4.5.	DETERMINACIÓN DE LA DL ₅₀	82
4.6.	MULTIPLICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO TRATADO CON LOS MUTAGÉNICOS FÍSICO Y QUÍMICO.....	85
4.7.	REGENERACIÓN Y ENRAIZAMIENTO	85
4.8.	ACLIMATACIÓN DE VITROPLANTAS EN CONDICIONES DE VIVERO.....	85
4.9.	REACCIÓN A <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> , MORELET EN VITROPLANTAS DE VIVERO ...	86
4.9.1.	Preparación del inóculo de <i>M. fijensis</i>	86
4.9.2.	Inoculación y evaluación de la reacción a <i>M. fijensis</i> en las vitroplantas	87
4.9.3.	Determinación del porcentaje ponderado de infección (PPI).....	87
4.9.4.	Selección de plantas de menor reacción a <i>M. fijensis</i>	88
4.10.	VARIABLES A EVALUADAS.....	90
4.10.1.	Promedio ponderado de infección	90
4.10.2.	Detección de variantes fenotípicas	93
4.10.3.	Contenido de clorofila en vitroplantas.....	99
5.	DISCUSIÓN.....	101
6.	CONCLUSIÓN	107
7.	RECOMENDACIONES	109
8.	RESUMEN.....	110

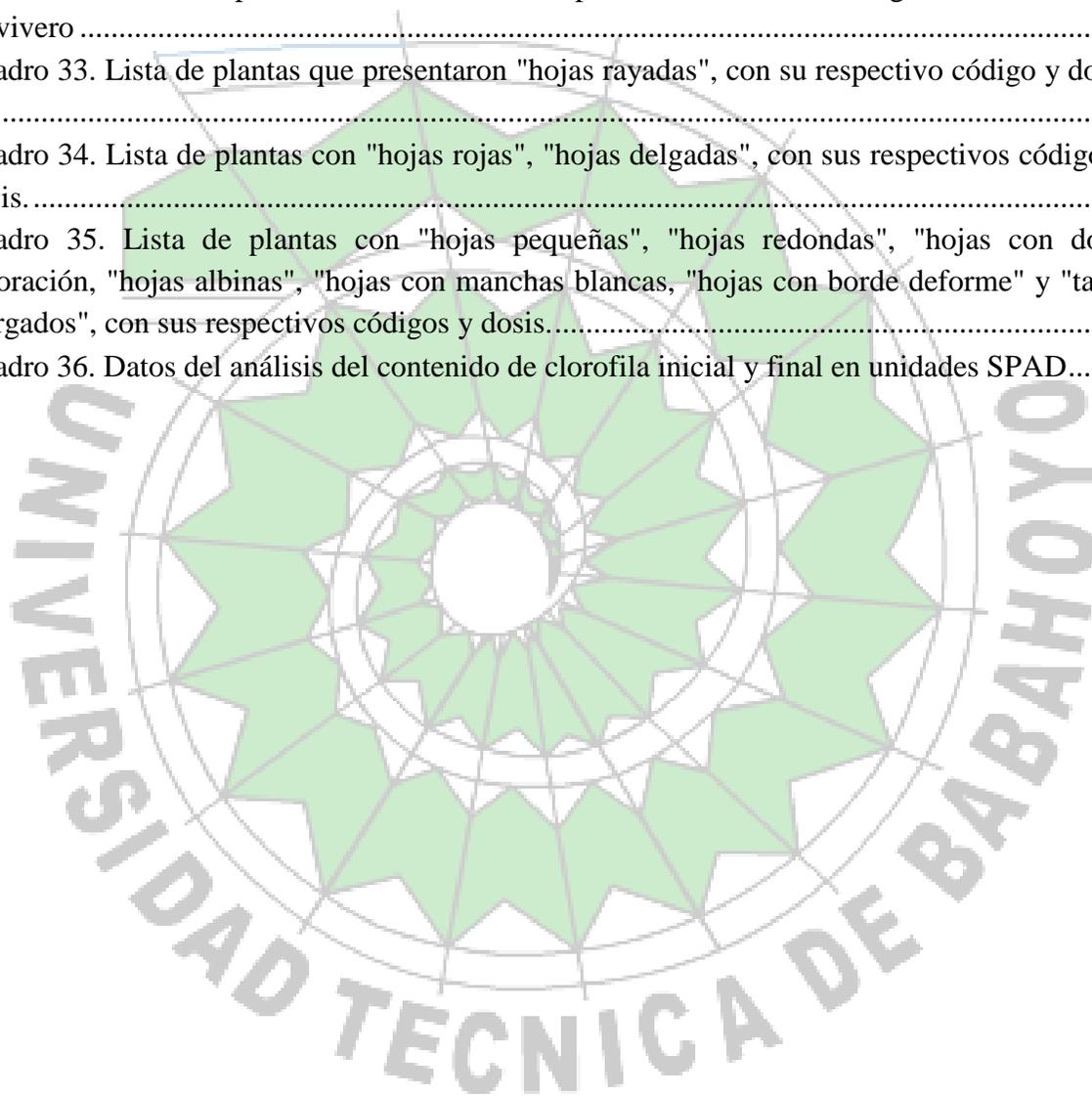
9. SUMMARY	112
10. LITERATURA CITADA	114
11. ANEXOS	122
PROTOCOLO DE AISLAMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DE ASCOSPORAS DE (<i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> , MORELET.), PARA FORMACIÓN DE COLONIAS Y DESARROLLO DEL INÓCULO	128
COLECTA DE MUESTRAS FOLIARES PARA EL AISLAMIENTO DEL HONGO <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> , MORELET.	128
PREPARACIÓN DEL MEDIO AGAR AGUA	128
PROCESO DE DESCARGA DE ASCOSPORAS DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> , MORELET.	129
OBSERVACIÓN DE ASCOSPORAS EN EL MEDIO AGAR AGUA Y AISLAMIENTO DE LAS MISMAS	129
PREPARACIÓN DEL AGAR PDA (POTATO DEXTROSE AGAR)	129



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de las especies de banano y plátano.....	4
Cuadro 2. Tratamientos aplicados en el ensayo 1	20
Cuadro 3. Tratamientos aplicados en el ensayo 2	21
Cuadro 4. Tratamientos aplicados en el ensayo 3	21
Cuadro 5. Tratamientos aplicados en el ensayo 4	22
Cuadro 6. Tratamientos aplicados en el ensayo 5	22
Cuadro 7. Detalle de las tres las pruebas de germinación en sus diferentes condiciones.	27
Cuadro 8. Andeva de prueba de germinación.....	28
Cuadro 9. Formato para evaluación mediante la escala de Stover modificada por Ghaur y obtener el cálculo del Número de hojas por planta (H/P), Hoja más joven enferma (HMJE), y el Promedio ponderado de infección (PPI).....	52
Cuadro 10. Andeva del Promedio Ponderado de Infección (PPI)	54
Cuadro 11. Andeva del contenido de clorofila en las hojas de las plantas a las que se les aplicaron los mutagénicos.	55
Cuadro 12. Andeva del ensayo 1 o primera irradiación.	56
Cuadro 13. Andeva del ensayo 2 o segunda irradiación.	56
Cuadro 14. Andeva del ensayo 3 o tercera irradiación.....	57
Cuadro 15. Andeva del ensayo 4 o cuarta irradiación.....	57
Cuadro 16. Andeva del ensayo 5 o del mutagénico químico EMS.....	58
Cuadro 17. Lista de meristemos apicales introducidos en la primera colecta.....	60
Cuadro 18. Lista de meristemos apicales introducidos en la segunda colecta	62
Cuadro 19. Pruebas de germinación en microcormos de banano para la selección del tamaño adecuado en los experimentos con los mutagénicos	65
Cuadro 20. Primera irradiación de meristemos apicales y microcormos	69
Cuadro 21. Segunda irradiación de meristemos apicales y microcormos	71
Cuadro 22. Tercera irradiación de meristemos apicales y microcormos.....	72
Cuadro 23. Cuarta irradiación de meristemos apicales y microcormos	74
Cuadro 24. Tratamiento químico en meristemos apicales y microcormos.....	77
Cuadro 25. Resumen del porcentaje (%) de sobrevivencia en meristemos apicales con el mutagénico físico desde la primera a la cuarta irradiación, con cada una de sus correspondientes dosis.....	79
Cuadro 26. Resumen del porcentaje (%) de sobrevivencia en microcormos con el mutagénico físico desde la primera a la cuarta irradiación, con cada una de sus correspondientes dosis.	80
Cuadro 27. Resumen del porcentaje (%) de sobrevivencia en meristemos apicales con el mutagénico químico	81

Cuadro 28. Resumen del porcentaje (%) de sobrevivencia en microcormos con el mutagénico químico.....	81
Cuadro 29. Número de plantas por cada dosis y número total de plantas en general	86
Cuadro 30. Promedios ponderados de infección más bajos de acuerdo a sus dosis.....	88
Cuadro 31. Lista de plantas con el "PPI" menor a 2%, identificados con su respectivo código y dosis.....	89
Cuadro 32. Promedio ponderado de infección en plantas sometidas a mutagénicos aclimatadas en vivero	92
Cuadro 33. Lista de plantas que presentaron "hojas rayadas", con su respectivo código y dosis.	96
Cuadro 34. Lista de plantas con "hojas rojas", "hojas delgadas", con sus respectivos códigos y dosis.....	97
Cuadro 35. Lista de plantas con "hojas pequeñas", "hojas redondas", "hojas con doble coloración, "hojas albinas", "hojas con manchas blancas, "hojas con borde deforme" y "tallos alargados", con sus respectivos códigos y dosis.....	98
Cuadro 36. Datos del análisis del contenido de clorofila inicial y final en unidades SPAD...100	



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cámara de irradiación y explantes irradiándose Escuela Politécnica Nacional de Quito: Cámara o irradiador (A), Explanes ordenados para su irradiación (B), Cierre de la puerta del irradiador (C), Explantes en proceso de irradiación (D).....	29
Figura 2. Unidad de Irradiación, Dirección Nacional de Investigación y Aplicaciones Nucleares del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable: E1 y E2 para ser irradiados (A y B), E1 ubicado en el tambor de irradiación (C), Ubicación del tambor con el E1 dentro del irradiador (D), Sellado del irradiador para el inicio de la irradiación (E).	31
Figura 3. Preparación de meristemos apicales en cajas Petri de vidrio para su irradiación: Disección de meristemos (A y B), Meristemos sembrados en cajas Petri con medio de cultivo (C y D).....	32
Figura 4. Proceso de preparación de microcormos para su irradiación: Corte de los microcormos (A, B y C), Lavado (D), ubicación de microcormos en cajas Petri plásticas (E, F y G), Tapado y sellado de las cajas (H).....	34
Figura 5. Explantes inmersos en las soluciones de EMS al 0.5 % (A), Explantes inmersos en las soluciones de EMS al 1 % (B), Explantes inmersos en las soluciones de EMS al 2 % (C).	36
Figura 6. Explantes sobrevivientes a los 30 días de tratamiento mutagénico con EMS a las tres concentraciones durante sus dosis tiempos.	37
Figura 7. Proceso de sometimiento de las plantas completas (microcormos) a la solución mutagénica de EMS y su posterior siembra en turba autoclavada: Inmersión de los E2 a la solución mutagénica de EMS (A y B), Exposición a la solución durante los tiempos planteados (C), Escurrimiento de las raíces (D), Siembre de la vitroplantas en turba autoclavada (E y F).	38
Figura 8. Proceso de sometimiento de las plantas con su pseudotallo cortado (microcormos) a la solución mutagénica de EMS y su posterior siembra en turba autoclavada: Solución mutagénica de EMS (A y B), Inmersión de los E2 en la solución mutagénica (C), Exposición a la solución durante los tiempos planteados (D, E y F), Escurrimiento de las raíces (G), Siembre de la vitroplantas en turba autoclavada (H).....	39
Figura 9. Explantes regenerados y disección de los mismos para su propagación y siembra en medio semi-sólido: Explantes regenerados (A), Explantes regenerados puestos sobre papel estéril dentro de la cámara de flujo laminar (B), Repique del E1 (C), Explantes multiplicados sembrados en medio semi-sólido (D).	44
Figura 10. Vitroplántulas enraizadas sembradas en medio semi-sólido adicionado con carbón activado: Vitroplántulas sembrada en medio de cultivo de enraizamiento con raíces poco desarrolladas (A), vitroplantas con raíces más desarrolladas (B-C).....	45
Figura 11. Proceso de aclimatación de vitroplantas: Lavado de los restos de medio en la vitroplántulas (A, B y C), Inmersión de vitroplántulas en solución de Benomil y ubicación en	

bandejas (D y E), Siembra en turba autoclavada (F), Vitroplántulas sembradas en turba ubicadas en cámara húmeda (G), Control de humedad relativa y temperatura con higrotermómetro (H).....	47
Figura 12. Vitroplantas en fase de aclimatación: Vitroplantas sembradas en fundas con tierra, turba y tamo, rusificándose (A - B).	48
Figura 13. Porcentaje de brotación en microcormos de banano "Williams" Se detallan las 3 pruebas realizadas con los 3 tamaños utilizados, donde se puede observar que en todas las pruebas con los microcormos grades hay mayor homogeneidad.	66
Figura 14. Prueba 1 con microcormos recién sembrados (A), Prueba 1 con microcormos sembrados a los 7 días (B).	66
Figura 15. Prueba 2 con microcormos recién sembrados (A), Prueba 2 con microcormos sembrados a los 7 días (B).	67
Figura 16. Prueba 3 con microcormos recién sembrados (A), Prueba 3 con microcormos sembrados a los 7 días (B).	67
Figura 17. Regresión para la determinación de la DL ₅₀ en el irradiador de Quito (meristemos apicales)	82
Figura 18. Regresión para la determinación de la DL ₅₀ en el irradiador de Aloag (meristemos apicales)	83
Figura 19. Regresión lineal para la determinación de la DL ₅₀ en meristemos apicales tratados con EMS	84
Figura 20. Regresión lineal para la determinación de la DL ₅₀ en microcormos tratados con EMS	84
Figura 21. Promedios ponderados de infección mínimos y máximos de acuerdo a sus dosis. .	91
Figura 22. Variaciones fenotípicas presentes en las plantas en estudio: A) hojas pequeñas, B) hojas rayadas, C) machas rojas más desarrolladas, D) hojas delgadas y alargadas, E) hojas albinas, F) hojas deformes con hendiduras en el borde, G) hojas con manchas blancas, H) hojas con doble coloración, I) hojas deformes torcidas, J) hojas redondeadas.	94
Figura 23. Porcentaje de variaciones fenotípicas por dosis mutagénica	95
Figura 24. Porcentaje de plantas por tipo de variación fenotípica	95
Figura 25. Promedios del contenido de clorofila por cada dosis.....	100

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Lista de reactivos, materiales y equipos	122
Anexo 2. Lista de reactivos para la preparación de las soluciones Stock o madres para la preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).....	123
Anexo 3. Lista de soluciones Stock y cantidades para la preparación de 1L de medio de cultivo MS, para utilizar en diferentes etapas de crecimiento del explante.....	124
Anexo 4. Dosis y tiempos de aplicación de radiación gamma en explantes (Irradiador Politécnica Nacional, Quito)	125
Anexo 5. Dosis y tiempos de aplicación de radiación gamma en explantes (Irradiador Aloag)	126
Anexo 6. Cuadro de transformación de porcentajes de mortalidad a Próbit	127
Anexo 7. Protocolo para la obtención de colonias de Sigatoka negra.....	128
Anexo 8. Evaluación de los meristemas apicales a los 15 de días posteriores a la irradiación, donde se puede observar la diferencia en el desarrollo a medida que la dosis aumenta.- A. 20 Gy; B. 40 Gy; C. 60 Gy; D. 80 Gy; E. 100 Gy; F. 120 Gy; G. 140 Gy; H. 160 Gy; I. 180 Gy	130
Anexo 9. Evaluación de los meristemas apicales a los 30 de días posteriores a la irradiación, donde se puede observar la diferencia en el desarrollo a medida que la dosis aumenta.- A. 20 Gy; B. 40 Gy; C. 60 Gy; D. 80 Gy; E. 100 Gy; F. 120 Gy; G. 140 Gy; H. 160 Gy; I. 180 Gy	130

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de banano es considerado uno de los cultivos comerciales de mayor trascendencia socio-económica, debido a que sus frutos constituyen un alimento muy importante para la dieta de millones de personas, tanto de las regiones productoras como de las importadoras, siendo el cuarto en importancia para la alimentación después del arroz, el trigo y el maíz, con un consumo per cápita mundial registrado entre 1997 y 2007, de 8.4 a 10.8 Kg por año (PRO ECUADOR, 2013).

La actividad bananera en Ecuador, antes y después del boom petrolero mantiene una posición gravitante como un generador de divisas y fuente de empleos para más de 1 millón de familias ecuatorianas “esto es más de 2,5 millones de personas”, siendo superior a la de otros rubros productivos. En el 2012, el banano fue ubicado como el primer producto de exportación del sector privado del país y es uno de los principales contribuyentes al fisco, representando el 45,34 % del valor del FOB exportado y el 87,14 % de toneladas exportadas (PRO ECUADOR, 2013).

A pesar de ser un cultivo que se adapta muy bien a condiciones climáticas adversas, es susceptible a varias enfermedades, entre las cuales la principal es la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet), considerada la más seria amenaza para la producción mundial de banano, causada por el hongo de la clase Ascomycetes (Robinson & Galán, 2011), se caracteriza por los daños directos que provoca en el follaje de la planta y por los efectos indirectos sobre el tamaño y calidad de la fruta; dando como resultado pérdidas en los rendimientos, incrementando considerablemente los costos de producción por el mayor número de ciclos de fungicida que es necesario aplicar cada año.

El uso excesivo de químicos para el control de la Sigatoka negra en las haciendas bananeras, ha provocado la aparición de poblaciones de este patógeno, resistentes a los fungicidas, por lo tanto se buscan alternativas para evitar el uso indiscriminado de estas sustancias que afectan a las personas y también al ambiente, entre estas alternativas, la principal es el uso de genotipos con características de resistencia a esta enfermedad.

Rowe y Rosales (1993), citado por (Bermúdez, *et al.*, 2007) mencionan que en diferentes países se han evaluado varios híbridos de plátano que presentan características resistentes ante la Sigatoka negra, ejemplo de estos se tienen los del Programa de Mejoramiento de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), en especial el “FHIA 21”; sin embargo, por su sabor, no tiene aceptación como fruta comercial, por esta razón que se busca mejorar variedades comerciales con características organolépticas aceptables en el mercado exterior. Igualmente, el híbrido “FHIA 01”, es un banano tipo postre el cual posee alta resistencia a la Sigatoka negra; sin embargo, no posee las características comerciales de calidad de fruta y palatabilidad.

Novak (1991); Donini y Sonnino (1998) y Nichterlein (2000) citados por (García *et al.*, 2000) comentan que debido a que la mayoría de los clones de plátanos y bananos son propagados vegetativamente, en general son triploides, estériles y con frutos partenocárpicos. El mejoramiento genético a través de cruzamientos es extremadamente difícil en banano, por lo que el uso de mutaciones inducidas (mutagénesis) cobra un rol importante y en combinación con las técnicas de cultivo *in vitro* pueden acelerar los programas de mejoramiento genético desde la generación de la variabilidad genética hasta la selección y la multiplicación de los genotipos deseados.

Naturalmente las mutaciones pueden ocurrir con frecuencia de una en un millón; sin embargo, a través de la utilización de agentes mutagénicos como lo son la irradiación gamma (^{60}Co) y el ethylmethanesulfonate (EMS), las mutaciones se pueden dar con mucha más

frecuencia. Estas pueden ser heredables y genéticamente estables, y dependiendo del tipo de mutación que se obtenga, por citar un ejemplo la resistencia a Sigatoka Negra, los beneficios serían innumerables al utilizarse este tipo de clones mejorados, no solo en Ecuador sino que se podría expandir hacia otros países productores de banano.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

- Detectar y seleccionar tempranamente mutantes de banano con resistencia o tolerancia a Sigatoka negra.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Determinar la dosis letal media (LD_{50}) en meristemas apicales *in vitro* y microcormos aclimatados de banano, sometidos a mutagénicos físico (rayos gamma- ^{60}Co) y químico (ethylmethanesulfonate-EMS).
- Detectar mutantes con tolerancia o resistencia a Sigatoka negra en condiciones de vivero.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales del cultivo de musáceas

Simmonds (1962), citado por Rekha, Ravishankar, Anand, & Hiremath (2001) menciona que de las frutas cultivadas por el hombre, el banano es la más antigua y que los cultivares explotados, actualmente, han sido el resultado de la hibridación de dos especies principales del género *Musa*, correspondientes a *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, las cuales han aportado los genomas A y B, respectivamente. El principal centro de diversidad de *M. acuminata* en estado diploide es el área Malaya, que comprende Assam, Birmania, Siam, Indochina y Filipinas. Los ejemplares silvestres de *M. balbisiana* se encuentran junto a los de *M. acuminata* en la India Peninsular y en Ghats Occidental.

2.2. Clasificación taxonómica del banano

Cuadro 1. Clasificación de las especies de banano y plátano

Familia:	Musácea	Género:	Musa	Sección:	Eumusa	
Especies	Grupo	Subgrupo	Clones	Otros nombres		
<i>Musa acuminata</i>	Diploide AA	Sucrier	Baby banana	Lady's Finger		
		Gross Michel	Gross Michel	Orito		
	Triploide AAA	Cavendish	Gran Naine	Gran enano		
			Dwarf Cavendish	Cavendish		
			Valery	Robusta		
			Lacatán	Filipino		
			Williams			
			Rojo y Rojo-verde	Morado		
			French Plantain	Dominico		
			Horn Plantain	Barraganete		
<i>Musa Balbisiana</i>	Triploide AAB	Plantain	Dominico Hartón			
			Maqueño			
	Triploide ABB	Plantain	Manzano			
			Limeño			
			Cuatro-filos			
Tetraploide AAAB		Pelipita				
		FHIA - 04				
			FHIA - 21			

Fuente:
Elaboración;
Dirección de
inteligencia
comercial e
inversiones
(PRO
ECUADOR,
2013).

2.3. Origen del banano

El sitio de origen del banano no puede definirse con exactitud, algunos surgieron en Malaca o en las islas inmediatas al sur de esta península, al parecer los tipos comestibles triploides de *M. acuminata* (Grupo AAA), se originaron principalmente en la misma región que sus progenitores diploides, o sea en Malasia. Los grupos híbridos en cambio, se piensa que se originaron en el contorno de los límites del área principal de evolución de *M. acuminata*. Así, los plátanos AB, AAB y ABB son característicos de la India, y parece existir un segundo centro de diversificación de los tipos AAB y ABB en la región de Filipinas, en el borde oriental de Malasia. El único clon AB BB conocido, se ha originado en Indochina (Sierra, 1993).

2.4. Descripción del banano

Los bananos y plátanos son plantas herbáceas con pseudotallos aéreos que se originan de cormos carnosos en los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales o “hijos”. Las hojas tienen una distribución helicoidal (filotaxia espiral) y las bases foliares circundan el tallo (o cormo) dando origen al pseudotallo. La inflorescencia es terminal y crece a través del centro del pseudotallo hasta alcanzar la superficie (Soto, 1985).

Sierra (1993), citado por Bornacelly (2009), menciona que entre las variedades que se siembran con fines de exportación a nivel mundial, el banano Giant Cavendish o Gran Enano conocido también como Williams, originario de Australia, ha reemplazado a los clones Robusta y Dwarf por sus mejores características de cultivo, alta producción y por el tipo y calidad de los frutos que produce; aunque sus frutos son más cortos y curvos que los del clon robusta y maduran lenta e irregularmente, por lo que necesitan de un cuidadoso manejo.

2.5. Enfermedades que atacan al banano

El banano es un cultivo susceptible a varias enfermedades entre las que se mencionan a continuación:

2.5.1. Moko (*Pseudomonas solanacearum*)

El Moko es una enfermedad bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum* que ataca los bananos comerciales. Existen tres razas de Moko, de las cuales la raza 2 es la que ataca el banano y presenta cuatro cepas: D, B, SFR y H. De estas, la raza B es la más virulenta en banano. Los primeros síntomas del ataque de Moko comienzan con un amarillamiento de la hoja nueva o candela, que termina doblándose y pudriéndose totalmente. Estos síntomas avanzan hacia las hojas más viejas hasta que toda la planta muere y el pseudotallo se pudre. Los hijos jóvenes, especialmente los de agua, se tornan amarillentos y deformes. En plantas viejas se observa un oscurecimiento de los haces vasculares hacia el centro del pseudotallo. En algunos casos, estos síntomas avanzan hacia las vainas externas y la enfermedad también llega a afectar la fruta, ésta si es muy joven se deforma y se pudre y los dedos se ennegrecen y si es de mayor edad, los dedos se maduran en forma prematura.

Esta bacteria vive en el suelo y es diseminada por agua superficial, por insectos que se alimentan de plantas infectadas o por herramientas contaminadas que se utilizan en labores de deshoje y deshije. Además, mediante semilla contaminada, la bacteria ha sido llevada de una zona geográfica a otra. Para combatir el Moko deben tomarse las siguientes medidas: Usar semillas de áreas libres de ésta enfermedad, desinfectar las herramientas de trabajo cada vez que se toca una planta, eliminar plantas que muestren síntomas, así como las que crecen alrededor de éstas. Dejar en cuarentena el área, utilizar poda química en áreas de alto riesgo (Ortiz, López, Ponchner, & Segura, 2007).

2.5.2. Mal de panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*)

El mal de panamá causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, ha sido históricamente considerada como una de las enfermedades más catastróficas de las musáceas y reconocida entre las 10 más importantes en la agricultura. La raza 1 del patógeno fue la causante de la epidemia que devastó miles de hectáreas de banano Gros Michel en América a mediados del siglo pasado, fruta de la que básicamente dependía la producción comercial. Esto trajo como consecuencia la transformación de la industria bananera que tuvo que reemplazar estas plantaciones susceptibles por cultivares del subgrupo Cavendish, resistentes en esa época a la enfermedad, implementándose la utilización de nuevas tecnologías de producción. *Fusarium*, es un patógeno que se caracteriza por su amplia variabilidad, habiéndose reportado en los últimos años la presencia de la raza tropical 4, considerada como una forma altamente virulenta del hongo, ha provocado pérdidas millonarias en la industria bananera en el sudeste de Asia. Esta raza tiene la capacidad de atacar a los cultivares de banano Cavendish (casi el 100 % de las exportaciones se basa en este subgrupo) tales como Cavendish Gigante, Valery, Williams y Grand Nain, así como a la mayoría de musáceas comestibles entre las que se incluyen el plátano, llegando a convertirse nuevamente en una seria amenaza potencial para la actividad bananera y platanera de la América Latina y El Caribe (INIAP, 2012).

Cuando inicia esta enfermedad se observa decoloración vascular, color marrón rojizo del xilema de las raíces y luego del rizoma. Cuando el rizoma ha sido afectado significativamente, entonces aparecen los primeros síntomas externos, las orillas de las hojas más viejas toman un color amarillo brillante y se comienzan a marchitar y la enfermedad se extiende a las hojas más jóvenes. Las hojas se colapsan en la zona del pecíolo y cuelgan alrededor del pseudotallo, según la enfermedad progresa todo el follaje se afecta y se observa la decoloración en el xilema del pseudotallo. Las plantas afectadas eventualmente mueren pero pueden permanecer erectas hasta por 2 meses durante los cuales las hojas que salen se observan decoloradas y de menor tamaño. Otros síntomas que pueden observarse son arrugas y deformaciones en las hojas y grietas a lo largo del pseudotallo. Una planta afectada muestra poco desarrollo y

produce hijuelos infectados antes de morir. Los síntomas pueden confundirse con los de la enfermedad del Moko, pero en la marchitez por *Fusarium* no se observa decoloración interna del fruto. Existen varios factores que influyen en el desarrollo de esta enfermedad. El genotipo es lo más importante, aunque otros aspectos como el drenaje, las condiciones ambientales y el tipo de suelo también influyen en su desarrollo. La resistencia genética es la mejor medida de control de esta enfermedad. Se deben sembrar rizomas e hijuelos libres del hongo. El control químico, la rotación de cultivos y otras técnicas no han sido efectivos para controlar la marchitez por *Fusarium*. Es recomendable usar plántulas provenientes de cultivo de tejido. Debido a problemas de infertilidad del grano de polen, todavía no se ha podido producir un sustituto para los cultivos del subgrupo Cavendish. El FHIA-01 "Goldfinger" es un banano de postre que presenta resistencia contra las razas 1 y 4 de este hongo; sin embargo, tienen una palatabilidad no aceptada comercialmente (Almodóvar & Díaz, 2007).

2.5.3. Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet)

La Sigatoka negra, llamada así debido al color oscuro o negro de las rayas y manchas que se forman en la hojas del hospedero cuando lo habitan, es una enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet, catalogada como la más destructiva y devastadora de las hojas de banano y plátanos a nivel mundial (Marín, Romero, Guzmán, & Sutton, 2003).

En un sistema agrícola de cultivo como el de las Musáceas, la severidad de éste patógeno se intensifica, ya que la propagación vegetativa (reproducción asexual) y el cultivo en grandes extensiones de tierra de un clon genéticamente uniforme, lo hace altamente vulnerable a ataques epidémicos de esta enfermedad, Clay y Kober (1996), citado por Manzo, Guzmán, Rodríguez, James, & Orozco (2005).

Este patógeno se caracteriza por el desarrollo de manchas foliares y provoca infecciones masales que reducen el área fotosintética de las plantas, causando la madurez prematura de los

frutos y por efecto la disminución de la producción de fruta en un 38 %. *M. fijiensis* se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de los países productores del mundo (Marín *et al.* , 2003).

En Ecuador fue detectada por primera vez en el año 1987 en la hacienda “El Timbre” de la provincia de Esmeraldas. Vera (1993) citado por Pico & Guadamud (2004) menciona que para el año 1989 ya se la encontraba en las provincias de Los Ríos y Guayas. Posteriormente, se extendió al sur del país, hasta la provincia del Oro en 1992, por lo que esta enfermedad le tomó 5 años en infectar a todas las bananeras del país (Martillo & Solano, 2003). Esta enfermedad desde su aparecimiento, se ha convertido en el problema devastador del cultivo por el potencial de inóculo y por los graves daños que ocasiona. Al respecto, en algunos casos se han reportado pérdidas mayores al 50 %.

2.5.3.1. Agente Causal

El agente causal de la Sigatoka negra es el hongo Ascomycete que se reproduce en forma sexual o ascógena y asexual o conídica durante su ciclo de vida, *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet (fase sexual) o *Paracercospora fijiensis*, Morelet (fase asexual). Durante la fase asexual correspondiente al género *Paracercospora*, se presenta en el desarrollo de las primeras lesiones de esta enfermedad las cuales son descritas como pizcas o estrías. En esta fase se observa la presencia de conidióforos emergiendo desde los estomas hasta la superficie de las hojas. Terminada la fase de reproducción de los conidióforos, se inicia la fase sexual de la enfermedad, sobre el primer estado de la mancha con la producción de ascosporas en estructuras llamadas peritecios, los cuales se forman sobre la superficie del estado más avanzado (Maura, 2007).

2.5.3.2. Epidemiología y síntomas

Las esporas (ascosporas y conidios) de *Sigatoka* negra se desplazan a través del viento, por la lluvia y el rocío de agua, las cuales son la principal fuente de infección. Las ascosporas y conidios germinan en la hoja, seguido por un crecimiento epifítico de los tubos germinativos, los cuales entran a la hoja a través de los estomas, para después proliferar en tejido intercelular de la hoja. El patógeno establece una relación biotrófica durante 3 a 4 semanas después de la penetración y la aparición de síntomas necróticos. El desarrollo de la enfermedad es favorecido cuando existe alta humedad y altas precipitaciones, mientras que las temperaturas menores de 20° centígrados y períodos secos inhiben el crecimiento del hongo.

Se han identificado seis estados de evolución de los síntomas de la enfermedad: uno de punto, dos de rayas o estrías y tres de manchas: 1) Estado de punto inicial: Aparición de puntos pequeños de color amarillo pálido de 0.25 mm de diámetro visibles en el envés de la hoja; 2) primer estado de estría: Formación de estrías de color castaño de 1 mm de ancho por 2 mm de largo, visibles en el haz y paralelas a las venas laterales de la hoja; 3) segundo estado de estría: Alargamiento de las estrías hasta alcanzar 20 – 25 mm de longitud y 2 mm de ancho, las cuales toman una coloración marrón oscuro y son visibles en el envés como rayas amarillas; 4) primer estado de mancha: Ensanchamiento de las estrías que se tornan color marrón oscuro y están rodeadas por una zona amarilla pálida; puede considerarse el primer estado de mancha; 5) segundo estado de mancha: Inicio del colapso del centro de color negro de la mancha y formación de un halo amarillo ligero en el tejido de la hoja que rodea el borde acuoso de la mancha; 6) tercer estado de la mancha: El centro de la mancha se seca, adquiere un color gris claro y además se torna hundido o comprimido. La mancha está rodeada por un borde estrecho bien definido, color pardo oscuro o negro. Entre este borde y el color verde normal de la hoja, hay frecuentemente una zona amarilla brillante (Manzo *et al.*, 2005).

2.6. Resistencia genética

El Programa de Mejoramiento Genético de Musáceas de la FHIA inició en 1959 con la United Fruit Company, su meta era desarrollar un banano tipo Gros Michel resistente al Mal de Panamá. A partir de esos cruzamientos se obtuvieron híbridos tetraploides, con resistencia a la Raza 1 del Mal de Panamá pero no fueron tan productivos como los clones Cavendish. Después de 20 años de investigación, se desarrolló el diploide mejorado SH-3142, que produjo progenies con resistencia a las razas 1 y 4 de Fusarium y es el progenitor masculino de los híbridos FHIA-01, FHIA-18, FHIA-21 y FHIA-25. Los híbridos que la FHIA ha liberado hasta la fecha, poseen excelentes características de racimo y planta y son resistentes o tolerantes a la Sigatoka negra y al Mal de Panamá. En términos agronómicos es importante resaltar que la rusticidad de los híbridos FHIA, hace posible su cultivo en un espectro muy amplio de condiciones agro-ecológicas, por lo que han tenido buen desempeño en África, América Latina y Australia. Los resultados obtenidos para el mejoramiento genético del banano, han sido buenos, los productores de banano Cavendish necesitan apoyar el desarrollo de nuevos híbridos o clones de Cavendish resistentes a Sigatoka negra, hasta 2011 solamente se podía pensar en desarrollar un banano transgénico; pues, se consideraba estéril a la variedad Cavendish, pero actualmente la FHIA tiene la técnica y estrategia para desarrollar híbridos tipo Cavendish. El inicio para la obtención de nuevas alternativas, reside en el mejoramiento genético, pues la maduración, la textura y el sabor tienen control genético (FHIA, s.f).

2.7. Biotecnología

García (2004), citado por Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski (2010), define a la biotecnología como la ciencia que engloba a muchas tecnologías, y que mediante el uso de un ser vivo o partes de él (sean estas células o enzimas aisladas), se obtenga un producto útil. Una de las tecnologías más utilizada al momento es el cultivo de tejidos vegetales, que encierra también un conjunto de técnicas muy útiles para el mejoramiento de plantas.

2.7.1. Cultivo de tejidos

Es un conjunto de técnicas que tienen en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos, células, tejidos u órganos) es cultivado asépticamente en un medio artificial de composición química definida, en condiciones ambientales controladas (Levitus *et al.*, 2010).

El cultivo de células vegetales no sería posible sin el principio de la totipotencialidad, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece, sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa, según Ferl y Paul (2000), citado por Calva & Pérez (2005), entonces se puede decir que de acuerdo a los principios anteriormente mencionados, las condiciones favorables, en especial un balance hormonal apropiado, da origen a un nuevo individuo (Villalobos & Thorpe, 1993).

2.7.2. Organogénesis directa

Uno de los procesos morfogénéticos más comúnmente utilizado, para la obtención de nuevas formas y estructuras como órganos (brotes) directamente, sin la formación de callos se denomina organogénesis directa según Krikorian (1982) citado por Krikorian (1993).

Toda célula u órgano está en capacidad de recapitular la información genética que posee y a través de la diferenciación celular formar y desarrollar una planta completa con características idénticas (INIA, 2005).

2.7.3. Micropropagación de banano

Consiste prácticamente en la multiplicación masiva *in vitro* de un explante proveniente de un cultivar asépticamente establecido una vez se haya regenerado (Villalobos & Thorpe, 1993).

El banano al igual que el plátano son cultivos estériles, por su condición triploide. La propagación de clones comestibles por vía vegetativa de manera convencional, ha sido usada por mucho tiempo, pero con la aparición de la técnica de cultivo de tejidos mediante la micropropagación *in vitro* los resultados han sido muy favorables, ya que se puede obtener mayor cantidad de material genético en menor tiempo y libre de patógenos, menciona Krikorian y Cronauer (1984) citado por Angarita & Perea (1993).

2.8. Mutagénesis

Es el proceso mediante el cual, de manera natural o inducida, se genera una mutación a nivel de ADN, la cual se define como un cambio hereditario en el material genético. Existe gran evidencia de que una amplia variedad de agentes ambientales, incluyendo los carcinógenos, interactúan directamente con el ADN, produciendo cambios hereditarios, por lo que los estudios de mutagénesis son importantes para la evaluación de los riesgos de mutagenicidad y carcinogenicidad de los agentes químicos y físicos (De la Rosa & Ruiz, sf).

El ADN se replica con una precisión extraordinaria por ser una molécula fuertemente estable, aun así se producen errores en su replicación, a eso se llama mutación, que se define como una transformación heredada en la información genética, donde los descendientes pueden ser células o individuos (Pierce, 2010).

2.8.1. Mutaciones naturales

Las mutaciones naturales consisten en alteraciones en el ADN, que se han venido acumulando desde inicios de la vida, en los organismos, lo que ha constituido la fuente de la evolución de millones de especies. Este tipo de variaciones puede producir mutaciones malas que ponen en desventaja a la especie preciada en relación con sus congéneres, pero podría también producir mutaciones buenas, que en un medio ambiente cambiante en el momento pertinente, puede salvar a una especie de la extinción, por su puesto la tasa de este tipo de mutaciones es muy baja (Frankel, 2003).

Las mutaciones somáticas en musáceas, que se producen de forma espontánea han contribuido como una buena fuente de variación para la obtención de nuevas variedades; sin embargo, la tasa de ocurrencia como se menciona es escasa para satisfacer las necesidades prácticas del mejoramiento genético (Roux, *et al.*, 2003).

2.8.2. Mutaciones inducidas

Existe un gran número de agentes que inducen mutaciones, las cuales se atribuyen a causas ambientales conocidas, estas pueden contrastarse con las mutaciones espontaneas, que nacen de manera natural durante el proceso de replicación del ADN. Los agentes que provocan mutaciones inducidas se denominan mutágenos (Carey, 2011).

La tasa de mutación difiere entre la artificial y la natural, la frecuencia de mutación natural oscila entre 10^{-6} y 10^{-4} en plantas y animales (las frecuencias se dan por gen y generación); con mutagénesis artificial se puede conseguir una tasa tan alta como se quiera, pero existe el riesgo de provocar tantas mutaciones en el organismo que éste no esté en capacidad de sobrevivir; si, por ejemplo, un organismo tiene 10.000 pares de alelos y se

consigue una tasa de 10^{-2} , se producirá un promedio de 2×10.000 (genes) $\times 0,01 = 200$ mutaciones, esto es, modificaciones muchas veces sustanciales (por tanto, normalmente no deseables en un organismo que ha funcionado perfectamente hasta ese momento) en 200 genes. Una tasa mayor podría eliminar toda viabilidad en el organismo. Además, si se tiene en cuenta que, normalmente, se debe ir persiguiendo la aparición de solo un gen concreto, los otros 199 pueden ser indeseables (Cubero, 2002).

2.8.3. Condiciones que debe reunir un agente mutagénico

Este debe ser lo adecuadamente efectivo sobre el material hereditario para originar cambios en su estructura, y simultáneamente, inócuo para el hombre. Esto es posible pero siempre se debe aplicar un agente poco tóxico para el operario. La capacidad mutagénica se mide por la dosis letal media (DL_{50}) que es la dosis con la cual sobreviven el 50 % de los individuos en cuestión. Más del 50 % indica una alta toxicidad. Hay un gran número de agentes, físicos y químicos que causan mutaciones; todos los carcinógenos lo son, aunque no todo mutágeno parece ser cancerígeno (Cubero, 2002).

2.8.4. Tipos de mutagénicos

Se conoce que muchas sustancias del medio son mutagénicas, incluyendo las radiaciones ionizantes y no ionizantes y centenares de sustancias químicas diferentes. Estos mutágenos son capaces de causar sustituciones de bases, deleciones y cambios del marco de lectura. La radiación ionizante puede inducir interrupciones del ADN bicatenario. Algunos mutágenos están presentes en la naturaleza y otros son artificialmente producidos por el hombre (Carey, 2011). Para identificarlos se los divide en dos grupos, químicos y físicos, que se describen a continuación.

2.8.4.1. Mutagénicos químicos

Existe una gran cantidad de mutagénicos químicos; sin embargo, para propósitos de mejoramiento en plantas cultivadas solo unos pocos son realmente útiles. La mayoría de aquellos corresponden al grupo de los agentes alquilantes y dentro de ellos se pueden numerar los siguientes: Ethylmethanesulfonate (EMS), sulfato de dietilo (dES) y a los compuestos nitrosos como la N-metil-N-nitrosourea (MNH). Otra sustancia química de interesantes características, cuya utilización como inductor de mutaciones es también la azida sódica (Suárez, 2006).

2.8.4.2. Mutagénicos físicos

En los últimos años se ha incrementado el uso de las radiaciones sobre los mutágenos químicos, los principales tipos de radiación son los siguientes:

Rayos X; Radiación Gamma: $^{137}\text{Cesio}$ y $^{60}\text{Cobalto}$ son las principales fuentes de rayos Gamma utilizados en trabajos de radiobiología. El $^{137}\text{Cesio}$ es usado en muchas instalaciones teniendo en cuenta que tiene una vida media más larga que el $^{60}\text{Cobalto}$; Radiación Ultravioleta: Tiene limitada habilidad de penetración en los tejidos, por lo que su uso en experimentos biológicos está restringido al tratamiento de esporas o granos de polen; Radiación Beta: Las partículas Beta (electrones) como de ^{32}P y ^{35}S producen un efecto similar a aquellos rayos X o Gamma, pero con más baja habilidad de penetración; Neutrones: Tienen un amplio rango de energía y son obtenidos de la fisión nuclear en un reactor nuclear con ^{235}U . Los neutrones han mostrado ser muy efectivos en la inducción de mutaciones en plantas; Partículas de aceleradores: Protones, deuterones, partículas alfa. Se ha utilizado básicamente para estudios fundamentales en la determinación de los efectos radiobiológicos (Suárez, 2006).

2.8.5. Dosis

Donini y Sonnio (1998) citado por Valdez, Orellana, Veitia, & Torres (2004), mencionan que, cuando se realizan estudios con radiaciones es básico determinar la dosis letal media (DL_{50}), evaluar una serie de dosis de radiaciones y comparar la supervivencia de los explantes cultivados con el control no irradiado. En estudios con mutágenos se debe buscar la DL_{50} , y partir desde ese punto, la misma concibe un amplio espectro de mutaciones inducidas y permite un tamaño equilibrado de la población para rescatar mutantes útiles.

Las radiaciones se pueden aplicar en dosis crónicas (de intensidad baja, pero durante largo tiempo) o agudas (lo contrario). Para dosis medias vale la relación clásica entre intensidad y tiempo ($I \times t = \text{constante}$), pero no para dosis extremas; la radiación crónica causa su efecto a través de los iones producidos en el medio celular o de pequeñas roturas que permiten la soldadura del ADN y del cromosoma, pero la aguda ocasiona grandes efectos traumáticos en el material hereditario que no admiten recomposición. Como indicación general, una dosis crónica puede ser de 100 rad al día y una aguda de 100 rad por segundo. Para la determinación de la dosis y su aplicación se debe tener en cuenta el material que se irradie (Cubero, 2002).

También se ha mencionado que la capacidad de los explantes para sobrevivir disminuye con el aumento de la dosis, expresándose en diferentes tasas de supervivencia dependientes de las variedades: explantes regenerados de 'Williams' muestran una buena altura, peso y tasa de supervivencia, incluso cuando la dosis alcanzan a 200 Gy (Reyes, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

La presente investigación se realizó en el Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental del Litoral Sur “Dr. Enrique Ampuero Pareja” del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Está ubicada entre las coordenadas geográficas 2°15'15" latitud Sur y 79°30'40" de longitud Occidental en el Km. 26 en la vía Durán – Tambo, Parroquia Virgen de Fátima, Cantón Yaguachi, Provincia del Guayas, a 17 msnm, precipitación media anual de 1342 mm y 81 % de humedad relativa media y una temperatura promedio de 25,1 °C. La presente investigación se realizó desde julio del 2011 hasta enero del 2015.

3.2. Material vegetal

Para el presente estudio se utilizaron, meristemos apicales y microcormos de banano del cv. “Williams” del subgrupo Cavendish.

3.3. Materiales, equipos de laboratorio y reactivos

Los materiales, reactivos y equipos que se utilizaron en este experimento se detallan en el Anexo 1.

3.4. Factores estudiados

Dos tipos de mutagénicos: físico (rayos gamma: en varias dosis de irradiación, incluido el control) y químico (Ethylmethanesulfonate - EMS: Cuatro dosis mutagénicas químicas, incluido el control y dos tiempos de exposición a este mutagénico) y dos tipos de explantes: meristemas apicales y microcormos.

3.5. Tratamientos estudiados

Los tratamientos aplicados para los dos tipos de mutagénicos fueron diseñados de la siguiente manera: En este estudio se utilizaron dos tipos de explantes: meristemas apicales y microcormos y dos mutagénicos: físico “Rayos Gamma (^{60}Co)” y químico Ethylmethanesulfonate “EMS” mezclado con Dimetilsulfóxido (DMSO, CH_3SOCH_3) para disolver el EMS. Las dosis que se aplicaron de radiación gamma fueron: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 500 Gray (Gy) (Cuadro 2).

Según lo planificado las dosis fueron atenuadas debido a la alta mortalidad que presentaron los explantes cuando fueron irradiados con dosis de 50 a 500 Gy (Cuadro 2), por lo tanto, se hicieron otras irradiaciones con dosis más bajas que fueron las siguientes: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 Gy (Cuadro 3), y luego otra de 0, 40, 50, 60 y 70 Gy (Cuadro 4), hasta que se logró determinar la DL_{50} , con la que se irradiarían nuevamente los explantes, pero el irradiador del Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional en Quito, sufrió un daño y debió repararse, por lo tanto se tuvo que utilizar el de la Dirección Nacional de Investigación y Aplicaciones Nucleares del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable de Atoac, donde se volvieron a irradiar con dosis de : 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 y 180 Gy (Cuadro 5), para evaluar si el efecto de las dosis era el mismo y posteriormente se determinó otra DL_{50} .

Se utilizó un diseño completamente al azar en arreglo factorial A x B para cada uno de los tratamientos mutagénicos usados, para analizar el porcentaje de sobrevivencia de los explantes obtenidos después de la aplicación de los mutagénicos.

Las dosis aplicadas de EMS fueron: 0, 0.5, 1 y 2 % por dos tiempos: 3 y 6 horas. Se utilizaron 5 repeticiones para el mutagénico físico y 3 repeticiones para el químico (Cuadro 6).

Cuadro 2. Tratamientos aplicados en el ensayo 1

Tratamiento	Dosis (Gy)	Explante
1	0	Meristemos
2	50	Meristemos
3	100	Meristemos
4	150	Meristemos
5	200	Meristemos
6	250	Meristemos
7	300	Meristemos
8	350	Meristemos
9	500	Meristemos
10	0	Microcormos
11	50	Microcormos
12	100	Microcormos
13	150	Microcormos
14	200	Microcormos
15	250	Microcormos
16	300	Microcormos
17	350	Microcormos
18	500	Microcormos

Cuadro 3. Tratamientos aplicados en el ensayo 2

Tratamiento	Dosis (Gy)	Explante
1	0	Meristemos
2	20	Meristemos
3	40	Meristemos
4	60	Meristemos
5	80	Meristemos
6	100	Meristemos
7	120	Meristemos
8	140	Meristemos
9	0	Microcormos
10	20	Microcormos
11	40	Microcormos
12	60	Microcormos
13	80	Microcormos
14	100	Microcormos
15	120	Microcormos
16	140	Microcormos

Cuadro 4. Tratamientos aplicados en el ensayo 3

Tratamiento	Dosis (Gy)	Explante
1	0	Meristemos
2	40	Meristemos
3	50	Meristemos
4	60	Meristemos
5	70	Meristemos
6	0	Microcormos
7	40	Microcormos
8	50	Microcormos
9	60	Microcormos
10	70	Microcormos

Cuadro 5. Tratamientos aplicados en el ensayo 4

Tratamiento	Dosis (Gy)	Explante
1	0	Meristemos
2	20	Meristemos
3	40	Meristemos
4	60	Meristemos
5	80	Meristemos
6	100	Meristemos
7	120	Meristemos
8	140	Meristemos
9	160	Meristemos
10	180	Meristemos
9	0	Microcormos
10	20	Microcormos
11	40	Microcormos
12	60	Microcormos
13	80	Microcormos
14	100	Microcormos
15	120	Microcormos
16	140	Microcormos
17	160	Microcormos
18	180	Microcormos

Cuadro 6. Tratamientos aplicados en el ensayo 5

Tratamiento	Tiempo	Dosis (Gy)	Explante
1	1	0	Meristemos
2	1	0.5	Meristemos
3	1	1	Meristemos
4	1	2	Meristemos
5	2	0.5	Meristemos
6	2	1	Meristemos
7	2	2	Meristemos
8	1	0	Microcormos
9	1	0.5	Microcormos
10	1	1	Microcormos
11	1	2	Microcormos
12	2	0.5	Microcormos
13	2	1	Microcormos
14	2	2	Microcormos

3.6. Multiplicación *in vitro* por meristemos apicales

3.6.1. Colecta de hijuelos

El material vegetal que se utilizó para este estudio fue colectado, en la hacienda “Las Garzas” del cantón La Troncal, el cual se usó para la micropropagación *in vitro* de los explantes y posteriormente para la aplicación de los mutagénicos físico (rayos gamma) y químico (EMS).

Se realizaron dos colectas en diferentes fechas, la primera se la realizó el 13 de diciembre del 2011, con un número de 82 colinos colectados, la segunda colecta fue el 26 de marzo del 2012 y el número de colinos fue de 62.

Se colectaron hijuelos espada (colinos), sanos y vigorosos de 0,80 a 1 m de altura, estos se transportaron al Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP para la extracción de sus meristemos. A este material se eliminaron sus raíces y pseudotallos y se redujeron cortando sus cormos conjuntamente con las vainas, longitudinal y transversalmente hasta dejarlos aproximadamente de 10 cm de altura por 5 cm de ancho. Estos se colocaron en una solución antioxidante conteniendo 50 mg de ácido ascórbico y 30 mg de cisteína en 1 litro de agua.

3.6.2. Introducción de los meristemos apicales al laboratorio

En el laboratorio, con un cuchillo se redujeron a 5 cm de alto por 3 cm de ancho. Para su desinfección se los sumergió en un recipiente estéril con una solución de cloro al 3 % durante 5 minutos (Ortega , 2010), luego se llevaron a la cámara de flujo laminar donde se procedió a enjuagarlos con agua destilada estéril (autoclavada), se hicieron 3 enjuagues y se procedió a la extracción del meristemo apical con el uso de pinzas y bisturí autoclavados anticipadamente.

Los cortes para la escisión del meristemo se realizaron sobre papel autoclavado dejando el explante de 1 cm² aproximadamente. Cada explante fue sembrado en un tubo de ensayo que contenía medio de cultivo de establecimiento o iniciación Murashige y Skoog (MS). La preparación de las soluciones Stocks y la composición de los medios de cultivo para las diferentes etapas de crecimiento de los explantes se presentan en los Anexos 2 y 3.

Finalmente, los tubos de ensayo se cubrieron con papel aluminio estéril y se los selló con stretchfilm para evitar la entrada de cualquier patógeno, la siembra del meristemo se hizo también en tarrinas pequeñas de 50 mL, manteniéndolos en oscuridad durante la primera semana para evitar la oxidación del explante. El tiempo que se mantuvo dentro del medio de cultivo (MS) hasta que se observó que el explante se regeneró, fue de 30 días aproximadamente.

3.6.3. Multiplicación del material genético (explantes)

Una vez regenerados los explantes se procedió a propagarlos en medio de cultivo de multiplicación (MS) de banano en estado líquido, para la obtención del material genético que se utilizó en los tratamientos mutagénicos. Los medios de cultivo usados para la multiplicación de los explantes fueron líquidos y sólidos, y la concentración hormonal varió de acuerdo a la etapa en la que se trabajó: introducción, multiplicación o enraizamiento (Anexos 2 y 3).

Se procedió a preparar el medio de cultivo que en este caso fue un MS modificado, las cantidades de stock y reactivos utilizados para la preparación de 1 litro de medio, se describen en el Anexo 3. Se preparó en un matraz Erlenmeyer (fiola de 1 L), en donde se dispensaron 500 mL de agua destilada que sirvió para la mezcla de las soluciones stock y reactivos sólidos y líquidos. El recipiente se colocó sobre un plato agitador calentador y con la ayuda de una barra magnética agitadora se agitó lo que se dispensó dentro del recipiente. Una vez

mezclados, se aforó o enrazó (balón de 1000 mL) hasta completar el litro de solución. Posteriormente se tomó el pH, el cual se reguló adicionando ácido clorhídrico 1 N para bajarlo e hidróxido de sodio o potasio 1 N para subirlo hasta dejarlo entre 5,6 a 5,8 de pH. Por último se vertió el gellam gum como agente gelificante, una vez hecho esto se cubrió el recipiente con papel aluminio y se lo envolvió con stretch film. Finalmente se autoclavó durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C.

El medio de cultivo autoclavado; fue trasladado hasta el cuarto de cultivo y dentro de una cámara de flujo laminar, se dispensó el medio en recipientes (plásticos y vidrio), los cuales también se autoclavaron con anterioridad, luego se cubrieron, sellaron y rotularon. Finalizado este trabajo, antes de usar el medio de cultivo para la siembra de los explantes, se dejaron reposar durante 3 días como prueba para detectar contaminación y de esa manera evitar los medios contaminados antes de la siembra. A continuación se detallan los materiales utilizados en el proceso de multiplicación:

- Pinzas autoclavadas
- Mangos de bisturí (# 11 o 22) autoclavados y hojas de bisturí (# 11 o 22)
- Papel autoclavado
- Frasco para ubicar las pinzas y bisturís autoclavados
- Frasco para contener el alcohol (98 %)
- Mechero de alcohol
- Alcohol 70 %
- Medio de cultivo
- Stretchfilm (Plástico)
- Marcador
- Equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, mandil)

3.7. Obtención de microcormos a partir de plantas de vivero

3.7.1. Adquisición de vitroplantas de vivero

Para las pruebas de vivero se compraron vitroplantas aclimatadas de 30 cm de altura aproximadamente, de donde se extrajeron los microcormos con 1 cm de diámetro, esta medida se obtuvo de acuerdo a las pruebas previas de germinación realizadas, que se explican en el Cuadro 7 del ítem 3.7.2.

Microcormo es a la “cepa o cormo” de una vitroplanta de banano ya aclimatada a la que se le cortó el pseudotallo y las raíces.

3.7.2. Preparación de las vitroplantas para la obtención de microcormos e implementación de la pruebas de germinación

Con la finalidad de determinar el tamaño de microcormo que rebrote y se desarrolle sin problemas, antes del sometimiento a los tratamientos mutagénicos, se realizaron pruebas de germinación en tres diferentes condiciones.

Para cada prueba se utilizaron tres grupos de plantas, en diferentes estados de crecimiento, a los que se les midió el pseudotallo, de donde se obtuvieron los cormos de los siguientes tamaños: pequeños (20 plantas de entre 4 a 7 mm de Ø), medianos (20 plantas de entre 8 a 9 mm de Ø) y grandes (20 plantas de entre 10 a 15 mm de Ø), a los cuales se les midió el diámetro del cormo, luego se ordenaron distribuyéndose como se explica en el Cuadro 7:

Cuadro 7. Detalle de las tres las pruebas de germinación en sus diferentes condiciones.

Prueba 1	A los tres grupos de plantas se les cortó su pseudotallo a la altura de 0,5 cm del microcormo, y se les eliminó las raíces, dejando un microcormo limpio. Posteriormente se sembraron en turba y se mantuvieron en condiciones de vivero
Prueba 2	A los tres grupos de plantas se les cortó su pseudotallo a la altura de 0,5 cm del microcormo, a estas no se les cortaron sus raíces. Posteriormente se sembraron en turba y se mantuvieron en condiciones de vivero
Prueba 3	<p>A los tres grupos de plantas se les cortó su pseudotallo a la altura de 0,5 cm del microcormo, se les eliminó sus raíces, dejando un microcormo limpio. Posteriormente fueron sembradas en tarrinas transparentes que contenían una base de papel toalla humedecida con agua destilada y fueron cubiertas con una lámina plástica transparente a la que se perforó para que haya un intercambio gaseoso y se las mantuvo en condiciones de vivero.</p> <p>“Los tres ensayos fueron evaluados a los 7 días para observar el porcentaje de brotación”.</p>

Los datos obtenidos en las pruebas de germinación se sometieron al análisis de varianza para conocer la significancia estadística en base al esquema que se observa en el Cuadro 8:

Cuadro 8. Andeva de prueba de germinación

Fuente de variación	Grados de Libertad
Tratamientos	8
Pruebas (A)	2
Tamaño de microcormo (B)	2
Interacción AxB	4
Repeticiones	4
Error experimental	34
Total	44

En el análisis funcional los promedios de los resultados se compararon entre sí con la prueba de Tukey al 5 % de significancia, con la finalidad de conocer la diferencia estadística entre tratamientos.

3.8. Aplicación de los tratamientos mutagénicos

3.8.1. Mutagénico físico (rayos gamma)

Las irradiaciones se realizaron en tres ocasiones: el día 1 de Diciembre del 2011, el 18 de Julio del 2012 y el 27 de Agosto del 2012, en el Laboratorio de Tecnología de Radiaciones, del Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional en Quito, utilizando su unidad de radiación de Cobalto 60 (^{60}Co) (Figura 1), donde se realizó la aplicación del tratamiento físico nuclear, en los meristemos apicales y microcormos.



Figura 1. Cámara de irradiación y explantes irradiándose Escuela Politécnica Nacional de Quito: Cámara o irradiador (A), Explantes ordenados para su irradiación (B), Cierre de la puerta del irradiador (C), Explantes en proceso de irradiación (D).

Se efectuaron las irradiaciones usando el mismo procedimiento de preparación en el laboratorio, pero aplicando dosis diferentes en cada una de ellas, se empezó ordenando las cajas Petri alrededor de las circunferencias que se encontraban a una distancia de 40 y 50 cm de la fuente de (^{60}Co) dentro de la cámara de irradiación, la cantidad de absorción de radiación es dependiente del tiempo y la distancia a la que se encuentran los explantes de la fuente de ^{60}Co , la tasa de irradiación que se aplicó fue de 116,01 Gy/h a 50 cm y 169,32 Gy/h a 40 cm. En el Anexo 4 se explica lo mencionado.

Las dosis aplicadas en la primera irradiación fueron de: 0, 50, 100 200, 250, 300, 350 y 500 Gy en 5 repeticiones, las dosis más altas fueron para probar el efecto de las mismas sobre los explantes, en la segunda irradiación se aplicaron dosis de: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 Gy en 5 repeticiones y por último en la tercera irradiación se aplicaron dosis de: 0, 40, 50, 60, 70 Gy, con 10 repeticiones, finalizando los trabajos en ese irradiador.

La cuarta irradiación se la realizó el 2 de julio del 2013 en la Dirección Nacional de Investigación y Aplicaciones Nucleares del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable, localizada en Alog, utilizando un irradiador de las siguientes características: Marca: JL Shepherd y Asociados, de isotopo ^{60}Co de 11500 Curies, modelo 109-68, SN 3003 (Figura 2).

Al igual que en las irradiaciones anteriores se usaron meristemos apicales (E1) y microcormos (E2) como material vegetal, en el caso de los E1 que se manejaron en condiciones in vitro se aplicaron 10 dosis de radiación gamma, incluido el testigo, realizando tres repeticiones, en el caso de los E2 que se manejaron en condiciones de vivero, las dosis y repeticiones fueron las mismas y se detallan como sigue: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 y 180 Gy, la tasa de irradiación se explica en el Anexo 5.



Figura 2. Unidad de Irradiación, Dirección Nacional de Investigación y Aplicaciones Nucleares del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable: E1 y E2 para ser irradiados (A y B), E1 ubicado en el tambor de irradiación (C), Ubicación del tambor con el E1 dentro del irradiador (D), Sellado del irradiador para el inicio de la irradiación (E).

3.8.1.1. Meristemos apicales

Se prepararon los explantes veinticuatro horas antes de ser irradiados (30/11/2011), estos fueron cortados sobre papel estéril con un bisturí #11, ayudando con una pinza para su manipulación dentro de la cámara, se usó un mechero de alcohol para el flameo de las herramientas, los meristemos apicales se sembraron en cajas Petri de vidrio conteniendo 15 mL de medio de cultivo sólido para multiplicación de banano, colocando 20 meristemos apicales por caja (Figura 3), los componentes del medio se detallan en los Anexos 5 y 6.

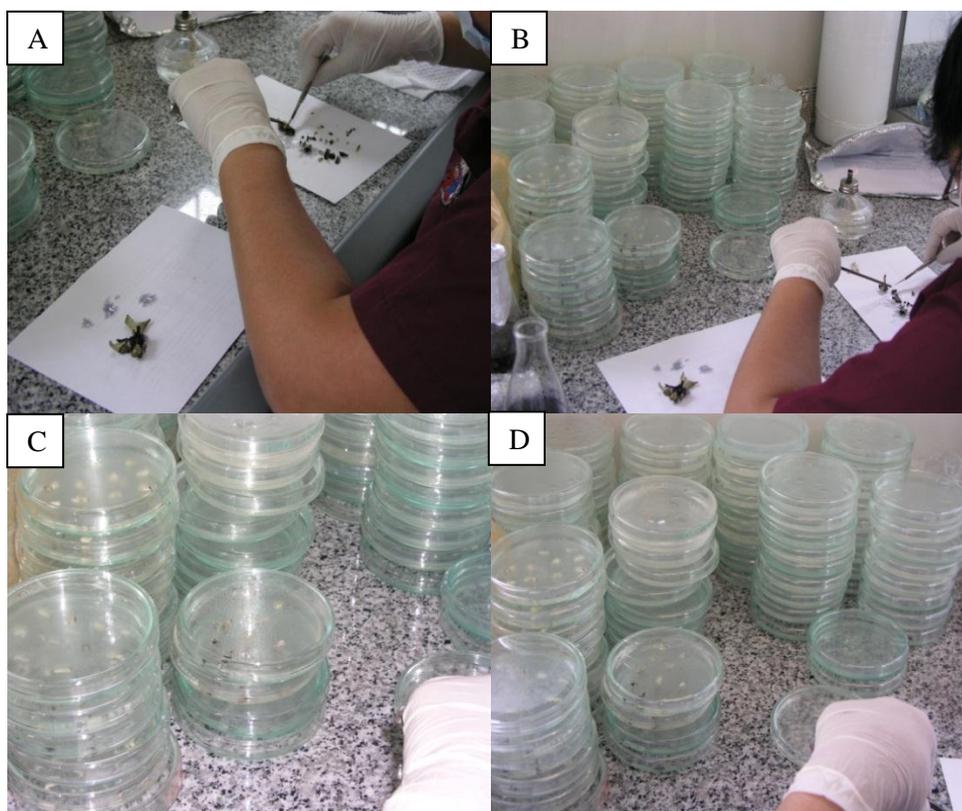


Figura 3. Preparación de meristemos apicales en cajas Petri de vidrio para su irradiación: Disección de meristemos (A y B), Meristemos sembrados en cajas Petri con medio de cultivo (C y D).

Los explantes fueron expuestos al mutagénico y posteriormente se sembraron en medio de cultivo líquido (MS-modificado), que se dispuso en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, 20 mL de medio/fiola. En la cuarta irradiación los explantes fueron transportados en frascos de vidrio sembrados en medio de cultivo semi-sólido, se taparon con papel aluminio autoclavado y se envolvieron totalmente con plástico. Luego de haber sometido los explantes al mutagénico, se sembraron en medio de cultivo líquido (MS-modificado), que se encontraba dispensado en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, 20 ml de medio/fiola.

3.8.1.2. Microcormos

De acuerdo al mejor resultado obtenido de las pruebas de germinación de los microcormos se procedió a eliminar las raíces, luego se cortaron sus pseudotallos a la altura de 0,5 cm del corno, dejándolos independientes, estos se lavaron y se ubicaron en cajas Petri plásticas donde antes se colocó como sustrato papel toalla con agua destilada, sobre esto fueron ubicados de manera ordenada. Una vez irradiados los microcormos fueron sembrados directamente en turba autoclavada (esterilizada) dentro de bandejas germinadoras de poliuretano las cuales fueron lavadas y desinfectadas antes de la siembra de los microcormos, a estos se les dió riego con agua destilada y se mantuvieron bajo condiciones de vivero, luego se observó consecutivamente su desarrollo. La toma de datos de la evaluación se realizó a los 30 días posteriores a la siembra. Para el caso de la cuarta irradiación, estos fueron preparados en grupos, no se les cortaron todas sus raíces dejándolas de 8 cm de largo aproximadamente, se envolvió cada grupo en una toalla absorbente húmeda, luego se los enrolló con plástico y se los ubicó en cajas de cartón para su transportación hasta el lugar de irradiación. Los microcormos irradiados fueron sembrados directamente en turba autoclavada (esterilizada) dándoles el mismo manejo que se mencionó anteriormente.



Figura 4. Proceso de preparación de microcormos para su irradiación: Corte de los microcormos (A, B y C), Lavado (D), ubicación de microcormos en cajas Petri plásticas (E, F y G), Tapado y sellado de las cajas (H).

3.8.2. Mutagénico químico (Ethylmethanesulfonate)

El ensayo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de la EELS del INIAP, al igual que en el tratamiento físico, para el tratamiento químico se usaron meristemos apicales “E1” y microcormos “E2”, para la mutagénesis química se utilizó ethylmethanesulfonate (EMS - $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5$) en mezcla con Dimetilsulfóxido (DMSO, CH_3SOCH_3), las dosis aplicadas fueron: 0- 0,5- 1 y 2 % con dos tiempos de 3 y 6 horas por 3 repeticiones.

3.8.2.1. Meristemos apicales.

La metodología para la realización de este ensayo empezó con la preparación de los meristemos apicales (E1) que sirvieron como material para el ensayo, dejándolos en agitación con agua destilada estéril durante 3 días para bajar la concentración hormonal, estos fueron micropropagados con anterioridad para la prueba.

Dentro de una Sorbona (cámara de extracción de gases) se prepararon las soluciones de EMS-DMSO, en proporciones de 1 – 1 para cada una de las dosis establecidas para el estudio.

Luego se ubicaron dentro de una cámara de flujo laminar las tarrinas que contenían los explantes que estuvieron en agitación en agua destilada estéril, una vez dentro estos se extrajeron y se los introdujo en las tres soluciones mutagénicas con sus diferentes concentraciones (Figura 5), contenidas en las diferentes tarrinas, luego se ubicaron en un shaker orbital para mantenerlos en agitación durante el primer tiempo (3 horas), una vez completado este tiempo se extrajeron los primeros 30 explantes de cada dosis y se volvieron a ubicar los últimos 30 explantes en el shaker hasta completar el segundo tiempo (6 horas), en cada una de las concentraciones, se dejaron sus respectivos controles para comparar el efecto del mutagénico.

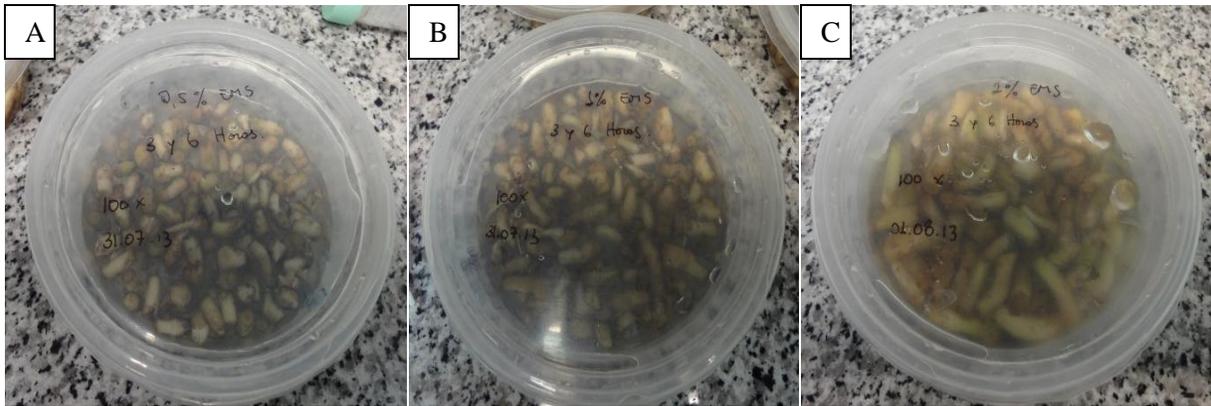
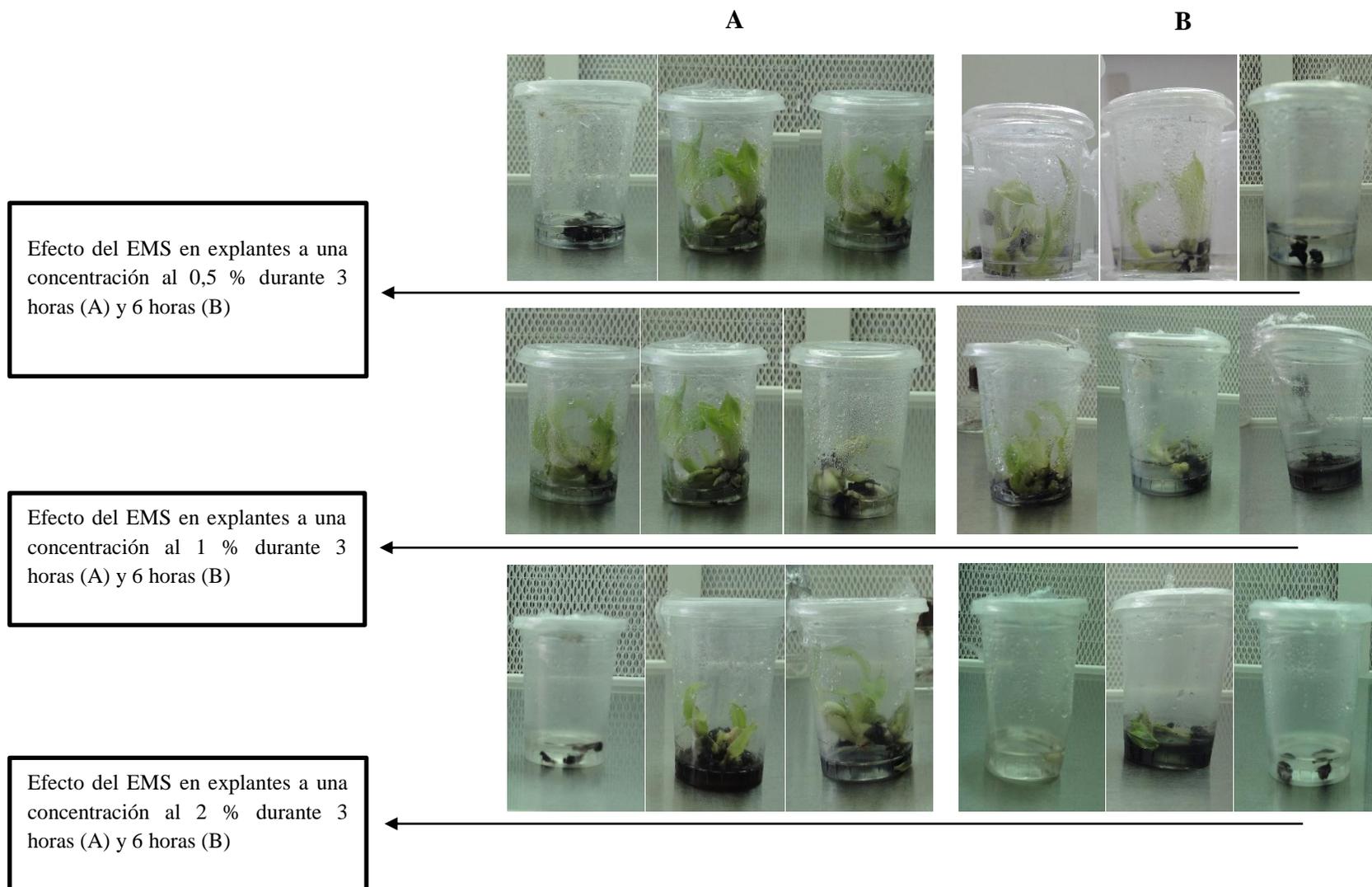


Figura 5. Explantes inmersos en las soluciones de EMS al 0.5 % (A), Explantes inmersos en las soluciones de EMS al 1 % (B), Explantes inmersos en las soluciones de EMS al 2 % (C).

Los explantes extraídos de cada uno de los tiempos se traspasaron en medio de cultivo líquido para banano (MS modificado) y nuevamente se ubicaron en un shaker orbital durante 24 horas para eliminar residuos del mutágeno (EMS), para después de ese tiempo cambiarlos al medio de cultivo definitivo dividiéndolos en sus respectivas repeticiones.

Los explantes se sembraron en vasos plásticos, los mismos que luego se desecharían por estar en contacto con este químico. Las evaluaciones se realizaron a los 30 días posteriores a la siembra en el medio de cultivo (Figura 6).

Figura 6. Explantes sobrevivientes a los 30 días de tratamiento mutagénico con EMS a las tres concentraciones durante sus dosis tiempos.



3.8.2.2. Microcormos

El procedimiento para la preparación de las soluciones mutagénicas usadas para los “E2” fue el mismo que con los “E1”, se utilizaron las mismas concentraciones y tiempos, la diferencia fue que para este ensayo se utilizaron plantas completas con raíces y pseudotallo (Figura 7) y también otras con el pseudotallo cortado pero dejándoles sus raíces (Figura 8), obviamente el volumen de solución utilizada para someter a los microcormos fue mayor que en los meristemos por el tamaño de los mismos.

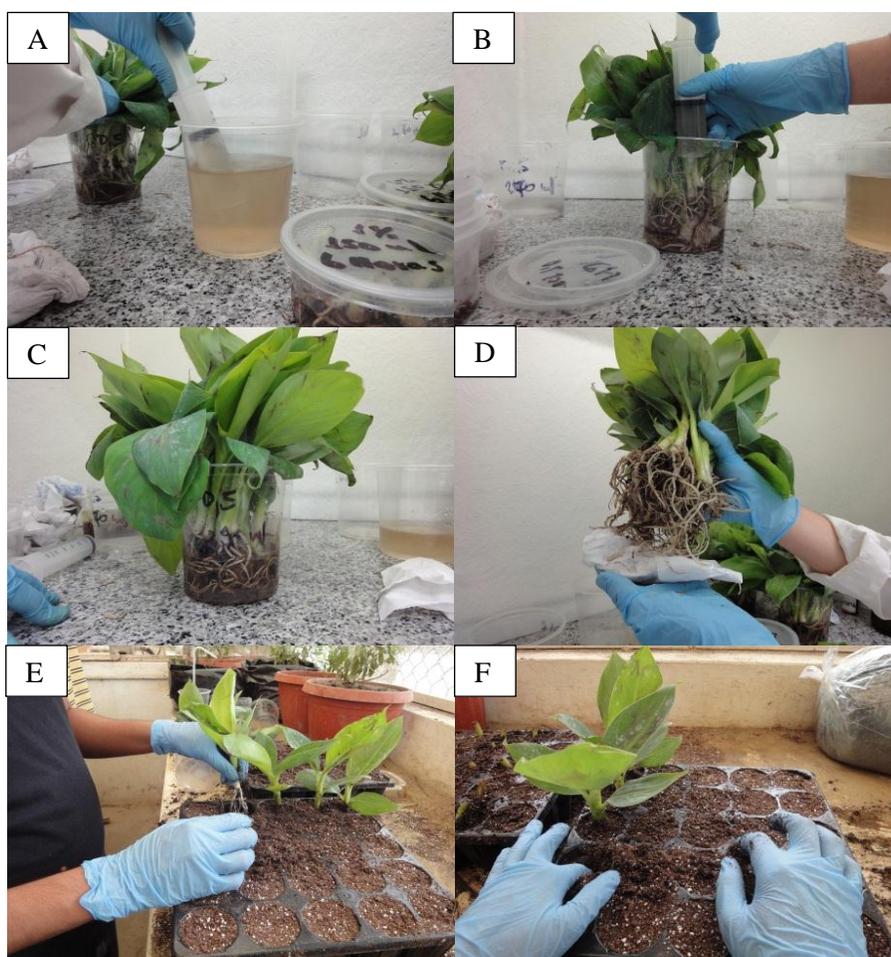


Figura 7. Proceso de sometimiento de las plantas completas (microcormos) a la solución mutagénica de EMS y su posterior siembra en turba autoclavada: Inmersión de los E2 a la solución mutagénica de EMS (A y B), Exposición a la solución durante los tiempos planteados (C), Escurrimiento de las raíces (D), Siembra de la vitroplantas en turba autoclavada (E y F).

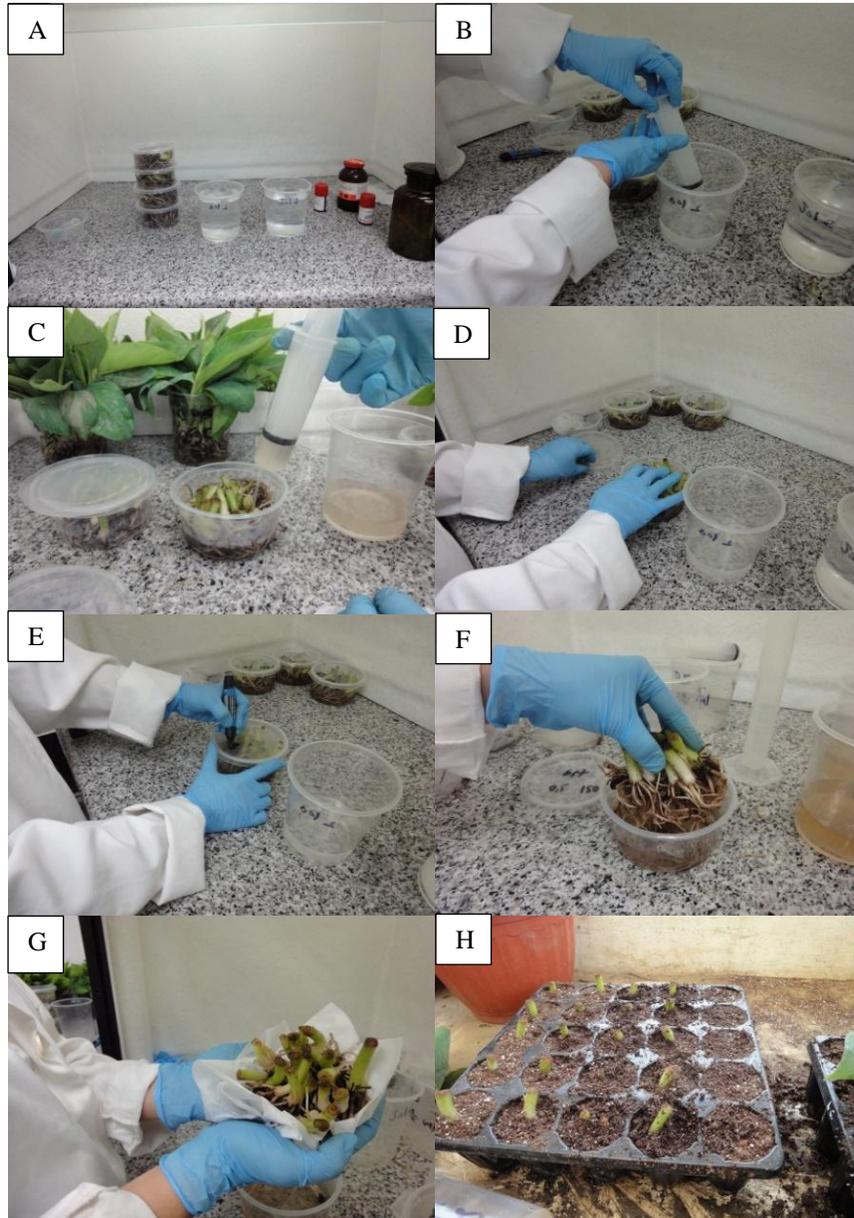


Figura 8. Proceso de sometimiento de las plantas con su pseudotallo cortado (microcormos) a la solución mutagénica de EMS y su posterior siembra en turba autoclavada: Solución mutagénica de EMS (A y B), Inmersión de los E2 en la solución mutagénica (C), Exposición a la solución durante los tiempos planteados (D, E y F), Escurrimento de las raíces (G), Siembra de la vitroplantas en turba autoclavada (H).

Los microcormos sometidos fueron sembrados directamente en turba autoclavada (esterilizada) dentro de bandejas germinadoras de poliuretano las cuales fueron lavadas y desinfectadas antes de la siembra de los microcormos, a estos se les regó con agua destilada y se mantuvieron bajo condiciones de vivero, luego se observó consecutivamente su desarrollo. La toma de datos de la evaluación se realizó a los 30 días posteriores a la siembra (Figura 7 y 8).

3.9. Porcentaje de sobrevivencia

El número de explantes sobrevivientes se evaluó por conteo a los 30 días posteriores a la irradiación en cada una de las repeticiones de los tratamientos aplicados, resultado que luego fue transformado a porcentajes de sobrevivencia lo que sirvió para obtener el porcentaje de mortalidad, datos que se utilizaron para la determinación de la DL_{50} .

3.10. Determinación de la dosis letal media (DL_{50})

Para la determinación de la DL_{50} se realizó la agrupación de los datos de la primera a la tercera irradiación que fueron realizadas en Quito y se determinó otra DL_{50} para los datos de la irradiación realizada en Aloag, ya que fueron diferentes irradiadores.

Una vez obtenido el porcentaje de mortalidad luego de las evaluaciones a los 30 días, en los materiales vegetales utilizados (meristemos apicales y microcormos) que fueron sometidos a los dos mutagénicos, se determinó la “Dosis Letal Media” por medio de la transformación de los porcentajes de mortalidad a “Próbit” que son unidades de desviación estándar incrementadas en cinco con la finalidad de evitar el uso de números negativos, el cálculo de la DL_{50} determinó el comportamiento de la variable porcentaje de respuesta de acuerdo con las variaciones del estímulo (dosis) (Silva, 2003). Antes de la transformación a Próbit se realizó la

corrección del porcentaje de mortalidad con valores de 0 y 100 % mediante las siguientes formulas (Randhawa, 2009):

- Para 0% de mortalidad: $100 (0.25 / n)$
- Para 100% de mortalidad: $100 (n-0.25 / n)$

Para un mejor entendimiento del cálculo de la DL50 nos guiaremos paso a paso con el siguiente ejemplo, donde se observan los valores de las dosis y porcentajes de mortalidad en primer lugar.

Dosis (Gy)	Mortalidad (%)
0	62
20	78
40	48
60	82
80	62
100	93
120	100
140	100
160	100
180	100

Paso 1.- Se transformó las dosis a los logaritmos y el porcentaje de mortalidad a valores Próbit según tablas de transformación que se muestra en el Anexo 6 (Randhawa, 2009), si los valores del logaritmo son negativos, se recomienda sumar una unidad (1) a todos los valores, de modo de trabajar solamente con valores positivos.

Dosis (Gy)	Logaritmo de Dosis	Mortalidad (%)	Próbit
0	0,00	62	3,04
20	1,32	78	5,37
40	1,61	48	5,91
60	1,79	82	4,71
80	1,91	62	6,11
100	2,00	93	5,57
120	2,08	100	6,59
140	2,15	100	6,97
160	2,21	100	6,97
180	2,26	100	6,97

Paso 2.- Se hizo una regresión lineal ($Y=a+bx$) entre el logaritmo de las dosis (x) y los valores probit (y).

$$y = 2,9311 + 1,6661x$$

Paso 3.- Se estimó con el modelo calculado el valor para un 50 % de mortalidad. En unidades probit 50 % corresponde a 5.

$$5 = 2,9311 + 1,6661x$$

$$X = \frac{5 - 2,9311}{1,6661}$$

$$X = 1,24$$

Paso 4.- Se restó la unidad sumada

$$X = (1,24 - 1)$$

$$X = 0,24$$

Paso 5.- se aplicó antilogaritmo

$$X = 0,24 / \text{antilog}$$

$$X = 58,32$$

Paso 6.- en consecuencia se obtuvo

$$DL_{50} = 58,32 \text{ Gy}$$

La DL₅₀ con el ensayo químico se obtuvo usando la misma metodología que en los meristemas a los que se aplicaron rayos gamma. Para la determinación del tiempo letal medio en el ensayo con “EMS”, se lo obtuvo mediante la transformación de los porcentajes de mortalidad a Próbit al igual que en la DL₅₀, pero usando como eje de x el logaritmo de los tiempos de cada tratamiento (Morales, 2012).

3.11. Multiplicación del material genético tratado con los mutagénicos físico y químico

Luego de la aplicación de la radiación gamma y el EMS a los Meristemas apicales, estos se manejaron separadamente de acuerdo a las dosis en condiciones de laboratorio para su respectiva multiplicación *in vitro*. Luego de la evaluación a los 30 días de los explantes sometidos a los mutagénicos, se cortaron de forma longitudinal con el bisturí en dos partes, empezando así el primer repique del meristemo, el corte longitudinal se hace para romper la dominancia apical y activar las yemas axilares del explante y así obtener la mayor cantidad de brotes posibles por meristemo, una vez realizado el primer corte se los sembró en un medio de multiplicación, se utilizó en primera instancia medio líquido, luego se lo cambio por medio semi-sólido donde se obtuvieron los mejores resultados, por la disminución en la oxidación y producción de fenoles, factor que estaba afectando el desarrollo de los explantes, al cual se le adicionó una mayor concentración de citoquininas, ya que el estímulo para la brotación masiva de los ápices utilizados en la propagación de banano, ha sido generalmente proporcionado por estas, principalmente 6-BAP (Rodríguez, 2000).

Se planifico realizar 4 pases de multiplicación; sin embargo, por falta de material para llegar al objetivo planteado se realizaron más pases de multiplicación. El proceso de multiplicación de estos explantes fue el mismo que se utilizó en la multiplicación sin tratamiento mutagénico, el cual se detalla en el ítem 3.6.3.

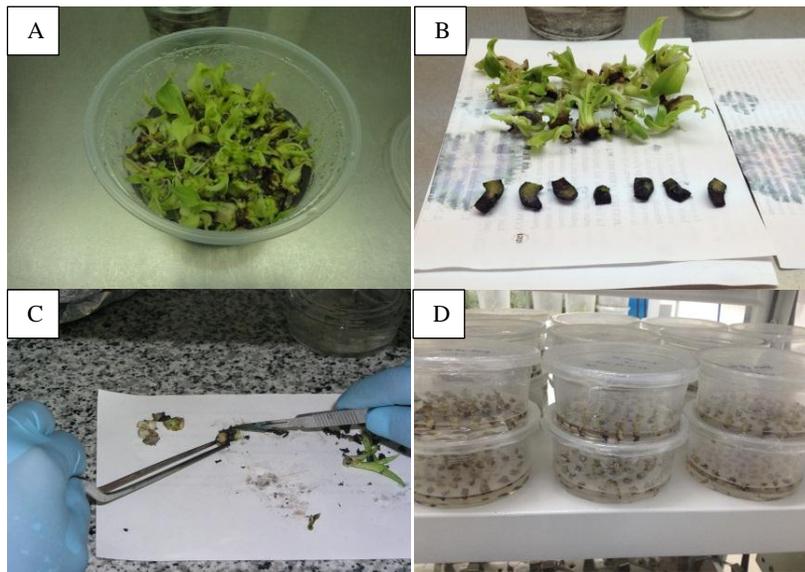


Figura 9. Explantes regenerados y disección de los mismos para su propagación y siembra en medio semi-sólido: Explantes regenerados (A), Explantes regenerados puestos sobre papel estéril dentro de la cámara de flujo laminar (B), Repique del E1 (C), Explantes multiplicados sembrados en medio semi-sólido (D).

3.12. Regeneración y enraizamiento

El proceso de regeneración de los explantes duró aproximadamente 3 a 4 semanas, cuando se observó que los explantes alcanzaron una altura de 2 a 3 cm, se procedió al enraizamiento de estas vitroplantas. Una vez obtenido el número de plantas deseado en la etapa de multiplicación, se procedió a enraizarlos. Para esto se separaron los explantes que alcanzaron el tamaño indicado (3-5 cm) y se sembraron independientemente en un nuevo medio de cultivo con mayor concentración de auxinas las cuales inducen el enraizamiento (5 mg de AIA/L), los explantes más pequeños continuaron su multiplicación. Al medio de cultivo (MS) de enraizamiento se adicionó carbón activado (Florio, De Real & Mogollón, 2010), 200 mg/L para ayudar a la rizogénesis y controlar la oxidación (Figura 10).



Figura 10. Vitroplántulas enraizadas sembradas en medio (MS) semi-sólido adicionado con carbón activado: Vitroplántulas sembrada en medio de cultivo de enraizamiento con raíces poco desarrolladas (A), vitroplantas con raíces más desarrolladas (B-C).

3.13. Aclimatación de vitroplantas en condiciones de vivero

La aclimatación se realizó una vez que se observó un buen desarrollo de raíces y las vitro plantas alcanzaron como mínimo una altura de 7 cm, con 2 hojas bien desarrolladas (alrededor de las 2 a 3 semanas), entonces estuvieron listas para su aclimatación. Estas plántulas fueron extraídas de los frascos evitando dañar sus raíces, y se les lavaron con agua de la llave los residuos de medio de cultivo, para evitar el desarrollo de patógenos que colonicen a la planta una vez sembrada. Las plántulas se sembraron en un sustrato estéril (turba) ya que son muy delicadas, y se ubicaron en bandejas germinadoras de poliuretano, antes de sembrarlas se sumergieron en una solución de benomil 1,5 g/L de solución.

Una vez sembradas, durante las dos primeras semanas se ubicaron en una cámara húmeda donde la humedad relativa se mantenía entre (90-100 %), para evitar la recepción directa de los rayos solares ya que la cutícula de las hojas no se encontraba desarrollada, evitando la deshidratación y por ende su muerte, fue necesario aplicar una solución de macro y micronutrientes cada 2 días para nutrirlas ya que sus hojas no fueron totalmente funcionales, se fue controlando visualmente el desarrollo de las plantas y así se detectó si fue necesario bajar la humedad relativa para mantenerlas con riegos diarios (2/d) que eviten su deshidratación, el tiempo estimado que se mantuvieron estas plantas en las bandejas fue de 4 semanas. Cuando se observó que las plantas alcanzaron una altura de 10 a 15 cm y un desarrollo de hojas totalmente funcionales se cambiaron a fundas de polietileno con tamo, turba y tierra en proporciones de 30-30-40, se mantuvieron en condiciones de vivero hasta completar 30 días más, en total entre aclimatación se llevó un tiempo de 2 meses aproximadamente donde las plantas estuvieron listas para ser inoculadas con los tratamientos para identificación de mutantes tolerantes o resistentes a Sigatoka negra. Durante este proceso se debió manejar una buena fertilización, en la Figura 11 y 12 se puede observar todo el proceso.



Figura 11. Proceso de aclimatación de vitroplantas: Lavado de los restos de medio en la vitroplántulas (A, B y C), Inmersión de vitroplántulas en solución de Benomil y ubicación en bandejas (D y E), Siembra en turba autoclavada (F), Vitroplántulas sembradas en turba ubicadas en cámara húmeda (G), Control de humedad relativa y temperatura con higrotermómetro (H).



Figura 12. Vitroplantas en fase de aclimatación: Vitroplantas sembradas en fundas con tierra, turba y tamo, rusificándose (A - B).

3.14. Reacción a *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet en vitroplantas de vivero

Para evaluar la reacción de las plantas tratadas con los mutagénicos se debió inducir la enfermedad “Sigatoka negra” mediante la inoculación, utilizando suspensiones miceliales del hongo aislado en el laboratorio de Fitopatología de la E.E.L.S. de I.N.I.A.P., en condiciones de vivero. Una vez cumplido el ciclo de vida de la enfermedad y habiendo evaluado las plantas se identificaron las más tolerantes.

3.14.1. Preparación del inóculo de *M. fijiensis*

Para la inoculación de las vitroplantas, primero se realizó el proceso para obtener la solución micelial, el cual empezó con la colecta de material foliar enfermo con Sigatoka negra en estadio 6 según la escala de Fouré, que fue preparado para la descarga de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet sobre agar agua y luego fueron aisladas independientemente (cultivo monospórico) y se las inoculó en medio PDA para el desarrollo de colonias, todo el procedimiento se explica en el Anexo 7 de acuerdo al protocolo usado por Cedeño (2010).

Una vez obtenidas las colonias, estas se multiplicaron en medio V8 líquido. Se separaron del líquido a través de cuatro capas de gazas estériles, se maceraron en un mortero con agua destilada estéril + Tween 20 (50 µL de Tween 20 en 100 mL de agua destilada estéril), se agitaron en vórtex y se volvió a filtrar a través de dos capas de gaza. Así mismo la concentración se determinó con un hemocitómetro de Neubauer ajustándose para esta prueba a $2,06 \times 10^6$ fragmentos de micelio/ml. Finalmente se agregó gelatina (1 %) a la suspensión para que se adhiriera mejor a la superficie de las hojas en el momento de la inoculación.

3.14.2. Inoculación y evaluación de la reacción a *M. fijiensis* en las vitroplantas

Luego de la regeneración de las vitroplantas, enraizamiento, aclimatación y rusificación en el vivero, se construyó una cámara de inoculación para mantener la humedad relativa constante y la temperatura ideal para el desarrollo de la enfermedad en las hojas de las plantas. En el interior de la cámara se hizo la inoculación de todas plantas sometidas a los agentes mutagénicos, aplicando la suspensión micelial obtenida de *M. fijiensis*, con el uso de una bomba de CO₂ mediante dispersión por presión de dicha suspensión sobre las vitroplantas de banano cv. Williams, de esta manera las plantas se sometieron a una alta presión de inóculo para que se exprese la enfermedad con más severidad y poder identificar las plantas con mejor comportamiento hacia la Sigatoka negra.

En cada una de las plantas se evaluó el desarrollo y evolución de pizcas de Sigatoka de acuerdo a la escala de Fouré (1994), que describe cada uno de los grados biológicos de esta enfermedad que van del 1 hasta el 6, para la detección de mutantes con tolerancia o resistencia a Sigatoka negra. Luego de la inoculación de las plantas se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad mediante el método de Stover modificada por Ghaul, esta escala posee 6 grados, por medio de los cuales se estima visualmente el área total cubierta por todos los síntomas de la enfermedad en cada hoja de las plantas próximas a la floración, para este método se toman en cuenta todas las hojas presentes, excepto las hojas banderas y las hojas agobiadas.

3.14.3. Determinación del porcentaje ponderado de infección (PPI)

La metodología que se usó para la determinación del PPI fue la sugerida por Almodóvar & Díaz (2007) y se explica a continuación:

1) Se toma una muestra de 5 plantas próximas a la florecida (en este caso se tomaron todas las plantas para la evaluación).

2) En cada planta se procedió con el conteo y numeración del total de hojas presentes. Este conteo se realizó de arriba hacia abajo alternando pares e impares a partir de las hojas 1 y 2. La hoja más cercana a la hoja bandera se consideró la hoja N° 1. En el caso de plantas aun sin florecer, se considera hoja número uno, la última hoja emitida que esté al menos 2/3 desplegada.

3) Se determinó la hoja más joven enferma (HMJE). Esta es la primera hoja contando de arriba hacia abajo que tiene por lo menos 10 manchas (Grado 1).

4) A partir de la HMJE se estimó visualmente el área cubierta por manchas de Sigatoka negra en cada hoja y se determinó el grado de infección de acuerdo a la escala del 1-6.

5) El número de hojas por planta (H/P) promedio se obtuvo contando el total de hojas y dividiendo entre el total de plantas evaluadas (P).

6) El porcentaje de hojas infectadas por grado, se obtuvo dividiendo el número total de hojas en cada grado (NHGI) entre el número total de hojas y multiplicando por 100, como se describe a continuación.

$$\% \text{ Hojas Infectadas por Grado} = \frac{\text{número total de hojas en cada grado}}{\text{número total de hojas}} \times 100$$

7) El porcentaje total de hojas infectadas se obtuvo de sumar el valor de todos los grados del primero al sexto.

8) Para calcular el Promedio Ponderado de Infección se multiplicó el porcentaje de hojas de cada grado por el correspondiente valor del grado en la escala de Stover modificada (1-6), cada resultado se suma y el total se divide entre 100 como se puede observar a continuación.

$$\text{Promedio Ponderado de Infección (PPI)} = \frac{\text{SUMA de (\% Hojas en cada grado x grado respectivo)}}{100}$$

3.14.4. Selección de plantas de menor reacción a *M. fijiensis*

Con los datos obtenidos en la evaluación aplicando el método de Stover modificado por Ghaul (1989) se logró calcular el Promedio Ponderado de Infección (PPI) de cada planta ya que mediante este se puede determinar la severidad de la enfermedad en la plantación.

3.15. Variables evaluadas

3.15.1. Promedio ponderado de infección

Para llegar a la determinación de esta variable se calcularon varios parámetros los cuales se explicaron más detalladamente en el ítem 3.14.3., a continuación se los menciona:

Hoja más joven enferma (HMJE).

Número de hojas por planta (H/P).

Porcentaje de hojas infectadas por grado (% de hoja/grado).

Número total de hojas en cada grado (NHGI).

Porcentaje total de hojas infectadas (% hojas infectadas).

Promedio Ponderado de Infección (PPI).

Una vez obtenido el PPI de cada planta se agruparon para ser sometidos al análisis de varianza y poder conocer la significancia estadística en base al siguiente esquema:

Cuadro 10. Andeva del Promedio Ponderado de Infección (PPI)

Fuente de variación	Grados de Libertad
Tratamientos	16
Repeticiones	2
Error experimental	32
Total	50

Los promedios de los resultados se compararon entre sí con la prueba de Tukey al 5 % de significancia, con la finalidad de conocer la diferencia estadística entre tratamientos.

3.15.2. Detección de variantes fenotípicas

Se realizó la detección de plantas con cambios en su estructura física (variación fenotípica), donde se observa grupos de plantas con características diferentes, se las identificó por dosis y tipo de variación y se contabilizó el número de plantas por cada dosis.

3.15.3. Contenido de clorofila en vitroplantas

Para la determinación de esta variable, previo a la inoculación de las vitroplantas se realizó una medición del contenido de clorofila en la hojas y otra medición a los 78 días, utilizando un medidor de clorofila (SPAD-502Plus) que cuantifica la cantidad relativa presente de esta sustancia, midiendo la absorbancia de la hoja a dos longitudes de onda (Kónica, sf), y de esta forma conocer si hay una relación entre el efecto del ataque del hongo una vez desarrollados los síntomas y la disminución en el contenido de clorofila en las hojas.

Los datos obtenidos de la mediación inicial y final se sometieron al análisis de varianza de forma independiente para conocer la significancia estadística en base al siguiente esquema:

Cuadro 11. Andeva del contenido de clorofila en las hojas de las plantas a las que se les aplicaron los mutagénicos.

Fuente de variación	Grados de Libertad
Tratamientos	15
Repeticiones	4
Error experimental	60
Total	79

Los promedios de los resultados se compararon entre sí con la prueba de Tukey al 5 % de significancia, con la finalidad de conocer la diferencia estadística entre tratamientos y hacer una comparación entre el análisis inicial y el final del contenido de clorofila.

3.16. Diseño experimental

Se realizaron 5 ensayos aplicando los agentes mutagénicos, que sirvieron para la determinación del porcentaje de sobrevivencia, donde se utilizaron para el primer experimento 18 tratamientos con 5 repeticiones, en el segundo 16 y 5 repeticiones, en el tercero 10 y 10 repeticiones, en el cuarto 20 y 3 repeticiones. Finalmente para el quinto ensayo se realizaron 14 tratamientos con 3 repeticiones y dos tiempos de inmersión de los explantes en el mutagénico. Todos los ensayos con sus respectivos tratamientos fueron distribuidos en un Diseño Completamente al Azar DCA en arreglo factorial AxB.

3.17. Análisis de varianza en cada ensayo

Cuadro 12. Andeva del ensayo 1 o primera irradiación.

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	17
Mutagénico (A)	1
Explante (B)	1
Interacciones AxB	1
Repeticiones	4
Error experimental	70
Total	89

Cuadro 13. Andeva del ensayo 2 o segunda irradiación.

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	15
Mutagénico (A)	1
Explante (B)	1
Interacciones AxB	1
Repeticiones	4
Error experimental	62
Total	79

Cuadro 14. Andeva del ensayo 3 o tercera irradiación.

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	9
Mutagénico (A)	1
Explante (B)	1
Interacciones AxB	1
Repeticiones	9
Error experimental	83
Total	99

Cuadro 15. Andeva del ensayo 4 o cuarta irradiación.

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	19
Mutagénico (A)	1
Explante (B)	1
Interacciones AxB	1
Repeticiones	2
Error experimental	38
Total	59

Cuadro 16. Andeva del ensayo 5 o del mutagénico químico EMS.

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	13
Mutagénico (A)	1
Explante (B)	1
Tiempo (C)	1
Interacciones AxBxC	1
Repeticiones	2
Error experimental	26
Total	41

3.18. Análisis funcional

Las medias de los resultados fueron transformados en raíz de $\sqrt{x+1}$ y se compararon entre sí con la prueba de Tukey al 5% de significancia, con la finalidad de conocer la diferencia estadística entre tratamientos.

4. RESULTADOS

4.1. Multiplicación *in vitro* por meristemas apicales

4.1.1. Colecta de hijuelos

La colecta realizada fue exitosa ya que se colectaron un número de 144 colinos que fueron transportados a la EELS del INIAP para el establecimiento de sus meristemas apicales a condiciones *in vitro*.

4.1.2. Introducción de los meristemas apicales al laboratorio

El número de meristemas establecidos en la primera colecta fue de 82, de los cuales sobrevivieron 31 explantes que representan el 37,80 % de los explantes introducidos, con un 62,20 % de contaminación, en el Cuadro 17 se puede observar los datos obtenidos, de sobrevivencia y contaminación.

Los meristemas introducidos en la segunda colecta fueron un número de 62, de los cuales sobrevivieron 42 explantes que representan el 67,64 % de los explantes introducidos, con un 32,25 % de contaminación. Se extrajeron y se sembraron los meristemas (domo meristemático) identificados en el Cuadro 18, los que se regeneraron sin problemas.

La contaminación fue alta, por lo tanto se aumentó la concentración del cloro y el tiempo a 4 % durante 20 minutos (Ortega , 2010).

Cuadro 17. Lista de meristemos apicales introducidos en la primera colecta

Meristemos apicales en etapa de establecimiento.			
Código	Fecha de siembra	Fecha de contaminación	Patógeno
1	14/12/2011	20/12/2011	Hongo
2	14/12/2011	20/12/2011	Bacteria
3	14/12/2011	26/12/2011	Bacteria
4	14/12/2011	Vivo
5	14/12/2011	26/12/2011	Bacteria
6	14/12/2011	03/01/2012	Bacteria
7	14/12/2011	26/12/2011	Bacteria
8	14/12/2011	Vivo
9	14/12/2011	Vivo
10	14/12/2011	20/12/2011	Bacteria
11	14/12/2011	Vivo
12	14/12/2011	20/12/2011	Bacteria
13	14/12/2011	26/12/2011	Bacteria
14	14/12/2011	Vivo
15	14/12/2011	Vivo
16	14/12/2011	20/12/2011	Bacteria
17	14/12/2011	03/01/2012	Bacteria
18	14/12/2011	20/12/2011	Bacteria
19	14/12/2011	Bacteria
20	14/12/2011	Vivo
21	14/12/2011	20/12/2011	Bacteria
22	14/12/2011	26/12/2011	Bacteria
23	14/12/2011	Bacteria
24	14/12/2011	26/12/2011	Bacteria
25	14/12/2011	20/12/2011	Hongo
26	14/12/2011	Vivo
27	14/12/2011	20/12/2011	Bacteria
28	14/12/2011	Vivo
29	14/12/2011	Vivo
30	14/12/2011	Vivo
31	14/12/2011	Vivo
32	14/12/2011	26/12/2011	Bacteria
33	15/12/2011		Vivo
34	15/12/2011	26/12/2011	Bacteria
35	15/12/2011	20/12/2011	Bacteria
36	15/12/2011	26/12/2011	Bacteria
37	15/12/2011	20/12/2011	Bacteria
38	15/12/2011	20/12/2011	Hongo
39	15/12/2011	Vivo
40	15/12/2011	03/07/2012	Bacteria

41	15/12/2011	Vivo
42	15/12/2011	20/12/2011	Hongo
43	15/12/2011	Vivo
44	15/12/2011	20/12/2011	Hongo
45	15/12/2011	20/12/2011	Bacteria
46	15/12/2011	Vivo
47	15/12/2011	26/12/2011	Hongo
48	15/12/2011	Vivo
49	15/12/2011	26/12/2011	Bacteria
50	15/12/2011	26/12/2011	Hongo
51	15/12/2011	26/12/2011	Bacteria
52	15/12/2011	20/12/2011	Bacteria
53	15/12/2011	Bacteria
54	15/12/2011	20/12/2011	Bacteria-Hongo
55	19/12/2011	Vivo
56	19/12/2011	Vivo
57	19/12/2011	Vivo
58	19/12/2011	03/01/2012	Bacteria
59	19/12/2011	26/12/2011	Hongo
60	19/12/2011	Vivo
61	19/12/2011	03/01/2012	Bacteria
62	19/12/2011	Vivo
63	19/12/2011	Vivo
64	19/12/2011	03/01/2012	Bacteria
65	19/12/2011	Vivo
66	19/12/2011	Vivo
67	20/12/2011	03/01/2012	Bacteria
68	20/12/2011	26/12/2011	Bacteria
69	20/12/2011	26/12/2011	Hongo
70	20/12/2011	03/01/2012	Bacteria
71	20/12/2011	Vivo
72	20/12/2011	03/01/2012	Bacteria
73	20/12/2011	26/12/2011	Bacteria
74	20/12/2011	Vivo
75	20/12/2011	03/01/2012	Bacteria
76	20/12/2011	Vivo
77	20/12/2011	03/01/2012	Hongo
78	20/12/2011	Vivo
79	20/12/2011	Vivo
80	20/12/2011	26/12/2011	Hongo
81	20/12/2011	03/01/2012	Bacteria
82	20/12/2011	03/01/2012	Bacteria

Cuadro 18. Lista de meristemos apicales introducidos en la segunda colecta

Código	Fecha de siembra	Fecha de contaminación	Patógeno
1	18/03/2012		BACTERIA
2	18/03/2012		Vivo
3	18/03/2012		Vivo
4	18/03/2012		Vivo
5	18/03/2012	05/05/2012	HONGO
6	18/03/2012	25/04/2012	HONGO
7	18/03/2012		Vivo
8	18/03/2012		Vivo
9	18/03/2012		Vivo
10	18/03/2012		Vivo
11	18/03/2012		Vivo
12	18/03/2012		SC
13	19/03/2012		Vivo
14	19/03/2012		SC
15	19/03/2012		Vivo
16	19/03/2012		Vivo
17	19/03/2012		Vivo
18	19/03/2012		Vivo
19	19/03/2012		Vivo
20	19/03/2012	03/05/2012	HONGO
21	19/03/2012		Vivo
22	19/03/2012		Vivo
23	19/03/2012		Vivo
24	19/03/2012		Vivo
25	19/03/2012		Vivo
26	19/03/2012		Vivo
27	19/03/2012		Vivo
28	19/03/2012		Vivo
29	19/03/2012		Vivo
30	19/03/2012	03/05/2012	HONGO
31	19/03/2012		Vivo
32	19/03/2012		
33	19/03/2012		Vivo
34	19/03/2012		Vivo
35	19/03/2012		Vivo
36	19/03/2012		SC
37	20/03/2012		HONGO
38	20/03/2012		SC
39	20/03/2012		Vivo
40	20/03/2012		Vivo

41	20/03/2012		Vivo
42	20/03/2012		Vivo
43	20/03/2012		Vivo
44	20/03/2012		Vivo
45	20/03/2012		SC
46	21/03/2012		Vivo
47	21/03/2012		Vivo
48	22/03/2012		HONGO
49	22/03/2012	24/04/2012	HONGO
50	22/03/2012		SC
51	22/03/2012		Vivo
52	22/03/2012		SC
53	22/03/2012		Vivo
54	22/03/2012		HONGO
55	22/03/2012		SC
56	22/03/2012		SC
57	22/03/2012		HONGO
58	22/03/2012		Vivo
59	22/03/2012		Vivo
60	22/03/2012		Vivo
61	22/03/2012		Vivo
62	22/03/2012		Vivo

SC: Sin crecimiento

4.1.3. Multiplicación del material genético (explantes)

Una vez que los meristemas apicales establecidos ya se regeneraron sin contaminarse, estos se propagaron y se mantuvieron en reserva para las pruebas con los mutagénicos, el número de explantes fue de 73 en total entre la primera y la segunda colecta, aplicando al medio de cultivo una concentración de 5 mg/L de BAP ya que, según Rodríguez (1994) citado por Rodríguez (2000), inducen el desarrollo de brotes de las yemas axilares. Según Angarita & Perea (1984) de cada meristemo introducido se pueden obtener hasta 15.000.000 de plantas por año a partir de 1 meristemo, por lo tanto se procedió a multiplicar los meristemas sobrevivientes en el medio con las características ya mencionadas.

4.2. Obtención de microcormos a partir de plantas de vivero

4.2.1. Adquisición de vitroplantas de vivero

El número de plantas adquiridas en SEBIOCA y AGRIPAC fue de 450 en la primera irradiación, 400 para la segunda irradiación, 500 para la tercera irradiación, 1500 para la cuarta.

4.2.2. Preparación de las vitroplantas para la obtención de microcormos e implementación de las pruebas de germinación

Los valores de germinación se registran en el Cuadro 19, el análisis de varianza presentó mayor diferencia significativa en la prueba 1 con un valor de 4,17 %, seguido por la prueba 2 con 2,9 % y luego la prueba 3 con 2,6 % plantas germinadas.

Los microcormos grandes presentaron alta significancia con un valor de 4,8 % en comparación con los medianos con 2,8 % y pequeños con 2,1 %.

En la interacción entre pruebas y tamaño presentaron igual significancia 1, 2 y 3 con microcormos grandes con valores de germinación de 4,5; 5,00 y 5,00 %; y la prueba 1 con microcormos medianos y prueba 1 con microcormos pequeños con 4,00 y 4,00 % plantas germinadas respectivamente. En las pruebas 2 y 3 con microcormos medianos se encontró valores de 2,75 y 1,75 % respectivamente alejándose de los primeros resultados. Los valores que presentaron la menor germinación fueron las pruebas 3 y 2 con microcormos pequeños con valores de 1,25 y 1 % respectivamente. De acuerdo a los resultados las pruebas, la 1 presento mejor germinación, el tamaño de los microcormos con mejor germinación fueron los grandes, pero en la interacción entre prueba y tamaño de los microcormos los que presentaron la mayor significancia estadística fueron en la prueba 2 y 3 con los microcormos de tamaño grande.

Cuadro 19. Pruebas de germinación en microcormos de banano para la selección del tamaño adecuado en los experimentos con los mutagénicos

Pruebas	Tamaño/Microcormos	% Plantas germinadas
1		4,17 a
2		2,92 b
3		2,67 c
	Grande	4,83 a
	Mediano	2,83 b
	Pequeño	2,08 c
2	Grande	5,00 a
3	Grande	5,00 a
1	Grande	4,5 a
1	Mediano	4 a b
1	Pequeño	4 a b
2	Mediano	2,75 b c
3	Mediano	1,75 c d
3	Pequeño	1,25 c d
2	Pequeño	1 d
Promedio general		3,25
Significancia estadística		
Factor A (Pruebas)		*
Factor B (Tamaño Microcormo)		*
Interacción AxB		*
Coeficiente de variación		22,21 %

Promedios con la misma letra no difieren significativamente, según la prueba de Tukey al 5 % de significancia. * = significativo. Ns: no significativo

En la Figura 13 se explica gráficamente el porcentaje de brotación en cada una de las pruebas con los diferentes tamaños de los microcormos donde se puede observar que los microcormos grandes son los que presentan mayor brotación, en la Figura 14, 15 y 16 se observan las pruebas en campo.

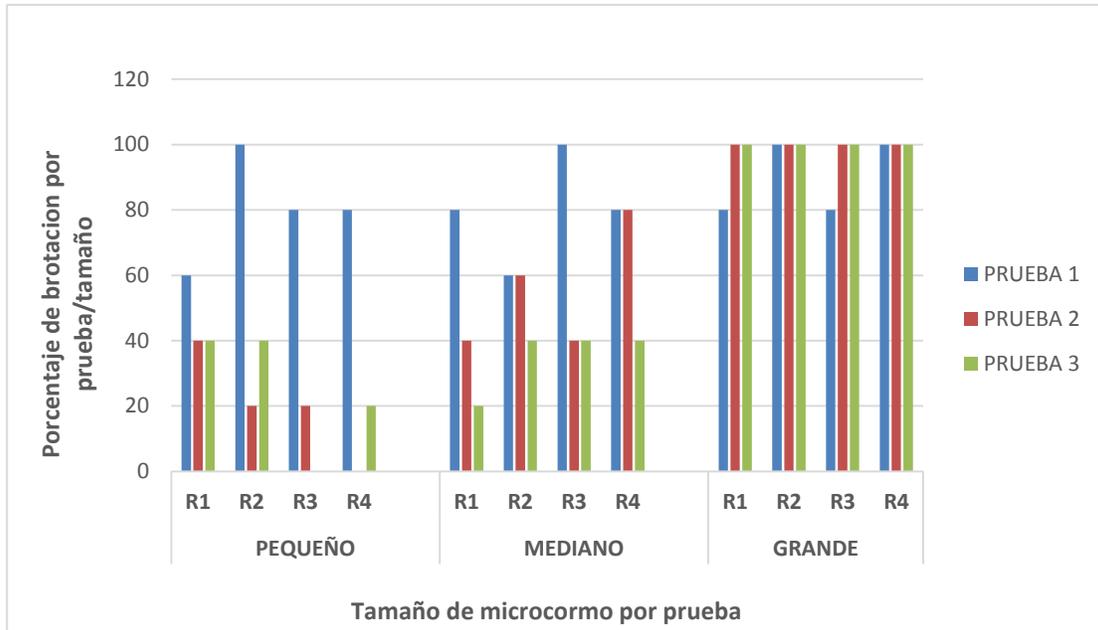


Figura 13. Porcentaje de brotación en microcormos de banano "Williams" Se detallan las 3 pruebas realizadas con los 3 tamaños utilizados, donde se puede observar que en todas las pruebas con los microcormos grades hay mayor homogeneidad.



Figura 14. Prueba 1 con microcormos recién sembrados (A), Prueba 1 con microcormos sembrados a los 7 días (B).



Figura 15. Prueba 2 con microcormos recién sembrados (A), Prueba 2 con microcormos sembrados a los 7 días (B).

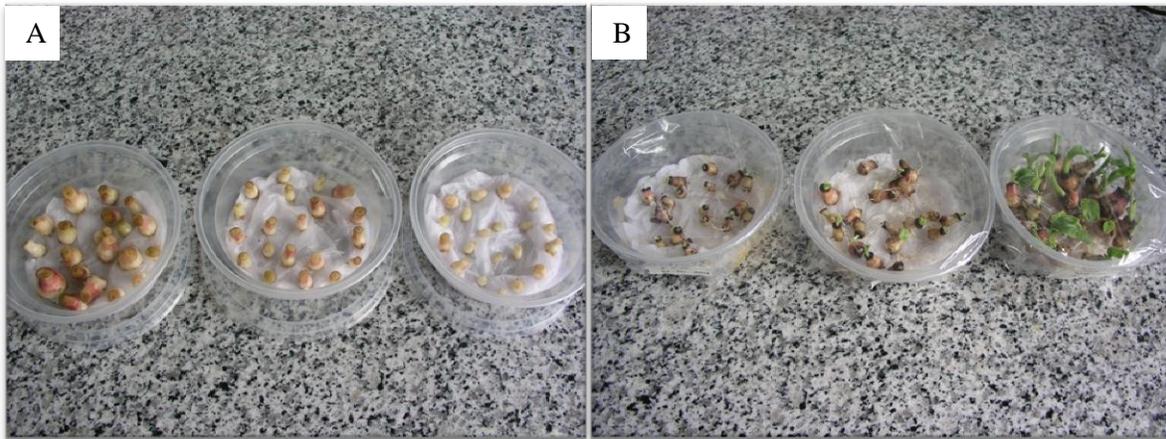


Figura 16. Prueba 3 con microcormos recién sembrados (A), Prueba 3 con microcormos sembrados a los 7 días (B).

4.3. Aplicación de los tratamientos mutagénicos

4.3.1. Mutagénico físico (rayos gamma)

Como ya se mencionó se realizaron 3 irradiaciones en el irradiador de la escuela Politécnica Nacional de Quito y 1 irradiación en la Dirección Nacional de Investigación y Aplicaciones Nucleares del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable de manera exitosa en los dos tipos de explantes utilizados en la investigación con las dosis ya mencionadas.

Como se observa en el Cuadro 20 en la primera irradiación el control (0 Gy) fue el que presentó la mayor significancia con un valor de sobrevivencia de 2,97 %, el resto de dosis presentaron el mismo nivel de sobrevivencia.

Los explantes que presentaron la más alta significancia estadística, fueron los meristemos apicales con 1,7 % con la mayor sobrevivencia, a diferencia de los microcormos con 1,4 %.

En la interacción entre dosis y explantes los controles (0 Gy) de los meristemos apicales fueron los que presentaron mayor significancia con 4,5 %, el resto de dosis con los meristemos y microcormos presentaron la misma significancia con un valor de 1,4 %, sin presentar sobrevivencia.

Cuadro 20. Primera irradiación de meristemos apicales y microcormos

Dosis Gy	Explantos	Sobrevivencia de explantes (%)
0		2,97 a
50		1,41 b
100		1,41 b
150		1,41 b
200		1,41 b
250		1,41 b
300		1,41 b
350		1,41 b
500		1,41 b
	Meristemos	1,76 a
	Microcormos	1,41 b
0	Meristemos	4,53 a
0	Microcormos	1,41 b
50	Meristemos	1,41 b
100	Meristemos	1,41 b
150	Meristemos	1,41 b
200	Meristemos	1,41 b
250	Meristemos	1,41 b
300	Meristemos	1,41 b
350	Meristemos	1,41 b
500	Meristemos	1,41 b
50	Microcormos	1,41 b
100	Microcormos	1,41 b
150	Microcormos	1,41 b
200	Microcormos	1,41 b
250	Microcormos	1,41 b
300	Microcormos	1,41 b
350	Microcormos	1,41 b
500	Microcormos	1,41 b
Promedio general		1,58
Significancia estadística	Factor A (Mutagénico)	Ns
	Factor B (Explante)	*
	Interacción Ax B	*
Coeficiente de variación		3,71 %

Promedios con la misma letra no difieren significativamente, según la prueba de Tukey al 5 % de significancia. * = significativo. Ns: no significativo.

En el Cuadro 21 se aprecia la segunda irradiación, el control (0 Gy), las dosis de 20 y 40 Gy presentaron la misma significancia con valores de sobrevivencia de 2,67; 2,44 y 2,32 %; respectivamente, siendo estas dosis donde se presentaron las mayores. Las dosis de 60 y 80 Gy presentaron valores de 1,75 y 1,57 % respectivamente, presentando niveles de sobrevivencia menor, las dosis de 100, 120 y 140 Gy presentaron igual significancia con valores de 1,41; 1,47 y 1,41 % respectivamente y fueron los que estuvieron más alejados de las primeras dosis más significativas presentando la menor sobrevivencia.

En los explantes, los meristemos apicales presentaron la mayor diferencia estadística con 3,35 % siendo estos los de mayor sobrevivencia en comparación con los microcormos que obtuvieron un valor de 1,41 %.

En la interacción entre dosis y explantes el control (0 Gy), las dosis de 20 y 40 Gy con los meristemos apicales presentaron la misma significancia con valores de 3,92; 3,47 y 3,24 % respectivamente, siendo estas dosis donde se presentó la mayor sobrevivencia. En las dosis de 60, 80, 100 y 120 Gy en meristemos apicales la significancia fue igual con valores de 2,09; 1,73; 1,41 y 1,53 % respectivamente; presentando niveles de sobrevivencia menor a las antes mencionadas. Dosis de 140 Gy con meristemos apicales y todas las dosis aplicadas en microcormos presentaron igual significancia con valores de 1,41 % en todas estas, dando la menor sobrevivencia.

Cuadro 21. Segunda irradiación de meristemos apicales y microcormos

Dosis Gy	Explantos	Sobrevivencia de explantes (%)
0		2,67 a
20		2,44 a b
40		2,32 a b c
60		1,75 b c d
80		1,57 b c d
100		1,41 d
120		1,47 c d
140		1,41 d
	Meristemos	2,35 a
	Microcormos	1,41 b
0	Meristemos	3,92 a
20	Meristemos	3,47 a b
40	Meristemos	3,24 a b
60	Meristemos	2,09 b c
80	Meristemos	1,73 c
120	Meristemos	1,53 c
100	Meristemos	1,41 c
140	Meristemos	1,41 c
0	Microcormos	1,41 c
20	Microcormos	1,41 c
40	Microcormos	1,41 c
60	Microcormos	1,41 c
80	Microcormos	1,41 c
100	Microcormos	1,41 c
120	Microcormos	1,41 c
140	Microcormos	1,41 c
Promedio general		1,58
Significancia estadística	Factor A (Mutagénico)	*
	Factor B (Explante)	*
	Interacción AxB	*
Coefficiente de variación		32,98 %

Promedios con la misma letra no difieren significativamente, según la prueba de Tukey al 5 % de significancia. * = significativo. Ns: no significativo.

En el Cuadro 22 se muestra la tercera irradiación, el control (0 Gy) y la dosis de 40 Gy obtuvieron igual significancia con valores de 3,05 y 2,55 % respectivamente, teniendo mayor sobrevivencia, las dosis de 50, 60 y 70 Gy mostraron igual significancia, con valores de 2,18; 2,1 y 1,97 % respectivamente, presentando índices de sobrevivencia parecidos.

Los explantes presentaron diferencia estadística, siendo los meristemos apicales con 3,33 % los que tuvieron mayor sobrevivencia a diferencia de los microcormos con 1,41 % donde no existió sobrevivencia.

La interacción entre dosis y explantes tuvo en el control (0 Gy) y la dosis de 40 Gy con los meristemos apicales igual significancia con 4,69 y 3,69 % que respectivamente, teniendo mayor sobrevivencia. Dosis de 50, 60 y 70 Gy en los meristemos apicales resultaron con la misma significancia con valores de 2,96; 2,78 y 2,53 % en estas la sobrevivencia fue más baja; el resto de dosis con microcormos presentaron igual significancia con 1,41 % en todas las dosis y el mismo índice de sobrevivencia.

Cuadro 22. Tercera irradiación de meristemos apicales y microcormos

Dosis Gy	Explantes	Sobrevivencia de explantes (%)
0		3,05 a
40		2,55 a b
50		2,18 b
60		2,1 b
70		1,97 b
	Meristemos	3,33 a
	Microcormos	1,41 b
0	Meristemos	4,69 a
40	Meristemos	3,69 a b
50	Meristemos	2,96 b c
60	Meristemos	2,78 b c
70	Meristemos	2,53 c

0	Microcormos	1,41 d
40	Microcormos	1,41 d
50	Microcormos	1,41 d
60	Microcormos	1,41 d
70	Microcormos	1,41 d
Promedio		2,37
Significancia	Factor A (Mutagénico)	*
	Factor B (Explante)	*
	Interacción AxB	*
Coeficiente de variación		29,83 %

Promedios con la misma letra no difieren significativamente, según la prueba de Tukey al 5 % de significancia. * = significativo. Ns: no significativo.

En el Cuadro 23 se observa la cuarta irradiación, el control (0 Gy) junto con las dosis de 20, 60 y 100 Gy tuvieron la misma significancia con valores de 2,44; 1,88; 2,02 y 1,85 % respectivamente, obteniéndose los mayores valores de sobrevivencia. Las dosis de 40, 80, 120, 140, 160 y 180 Gy, dieron igual significancia estadística con valores de 1,72; 1,65; 1,51; 1,41; 1,41 y 1,41 % respectivamente, donde la sobrevivencia fue mucho más baja.

Con respecto a los explantes la mayor diferencia estadística la presentaron los meristemas apicales con 2,05 % en relación a los microcormos con 1,41 % que no presentaron sobrevivencia.

En la interacción entre dosis y explantes, el control (0 Gy) y la dosis de 60 Gy con los meristemas apicales fueron los que presentaron mayor significancia con valores de 3,46 y 2,64 %. Dosis de 20, 40, 80 y 100 Gy en meristemas apicales también presentaron igual significancia con sobrevivencia más baja, y en las dosis de 120, 140, 160 y 180 Gy con los meristemas apicales valores de 1,61; 1,41; 1,41; 1,41 % respectivamente, encontrándose una mínima sobrevivencia en la dosis de 120.

Cuadro 23. Cuarta irradiación de meristemos apicales y microcormos

Dosis Gy	Explantos	Sobrevivencia de
0		2,44 a
20		1,88 a b
60		2,02 a b
100		1,85 a b
40		1,72 b
80		1,65 b
120		1,51 b
140		1,41 b
160		1,41 b
180		1,41 b
	Meristemos	2,05 a
	Microcormos	1,41 b
0	Meristemos	3,46 a
60	Meristemos	2,64 a b
20	Meristemos	2,36 b c
40	Meristemos	2,03 b c
80	Meristemos	1,88 b c
100	Meristemos	2,29 b c
120	Meristemos	1,61 c
140	Meristemos	1,41 c
160	Meristemos	1,41 c
180	Meristemos	1,41 c
0	Microcormos	1,41 c
20	Microcormos	1,41 c
40	Microcormos	1,41 c
60	Microcormos	1,41 c
80	Microcormos	1,41 c
100	Microcormos	1,41 c
120	Microcormos	1,41 c
140	Microcormos	1,41 c
160	Microcormos	1,41 c
180	Microcormos	1,41 c
Promedio general		1,72
Significancia	Factor A (Mutagénico)	*
	Factor B (Explante)	*
	Interacción AxB	*
Coeficiente de		18,52 %

Promedios con la misma letra no difieren significativamente, según la prueba de Tukey al 5 % de significancia. * = significativo. Ns: no significante.

4.3.1.1. Meristemos apicales

Al finalizar las irradiaciones, se trasladaron de regreso los materiales irradiados y fueron sembrados en medio de cultivo y mantenidos bajo condiciones *in vitro* observándose a los 30 días variaciones en su índice de sobrevivencia, a medida que se aumentó la dosis de irradiación la sobrevivencia bajó, pudiéndose determinar que la máxima dosis que resisten los explantes del cultivar Williams es de 120 Gy con una sobrevivencia mínima, al sobrepasar esta dosis la mortalidad es total.

4.3.1.2. Microcormos

En todos los ensayo la aplicación de radiación fue mortal para los explantes, se determinó que en estas condiciones no hay desarrollo, en efecto ninguno de los microcormos sobrevivieron.

4.3.2. Mutagénico químico

La mayor significancia se observó en el control (0 %) con un valor de 3,46 %, presentando la más alta sobrevivencia, las dosis de 0.5, 1 y 2 % mostraron la misma significancia con valores de 2,25; 2,39 y 2,06 % respectivamente presentando una sobrevivencia más baja en relación al control (Cuadro 24).

En los explantes, la mayor significancia la presentaron los meristemos apicales con 2,74 % presentando el mayor porcentaje de sobrevivencia y 2,08 % en microcormos.

En los tiempos los controles fueron los que presentaron la mayor significancia con 3,46 %, en relación a los tiempos de 3 y 6 horas que presentaron similar significancia con valores de 2,33 y 2,14 %.

En la interacción entre dosis x explante los controles de los meristemas apicales y de los microcormos junto con las dosis de 0,5; 1 y 2 % en los meristemas apicales presentaron la misma significancia con los siguientes valores 3,46; 3,46; 2,78; 2,84 y 2,23 % respectivamente. Las dosis de 0,5; 1 y 2 % en microcormos presentaron valores más bajos pero iguales en significancia entre sí con 1,72; 1,95 y 1,89 % respectivamente.

En la interacción dosis x tiempo x explante, los controles en meristemas apicales y microcormos fueron iguales que las dosis de 0,5; 1 y 2 % durante 3 horas en meristemas apicales con valores de 3,46; 3,46; 2,78; 2,78 y 3,31 % respectivamente. Dosis de 0,5; 1 y 2 % durante 6 horas en meristemas apicales con valores de 2,37; 2,78 y 1,69 % respectivamente y también al igual que las dosis de 2 % durante 6 horas en microcormos, 1 y 2 % durante 3 horas en microcormos y 0,5 % durante 6 horas en microcormos con sus respectivos valores de 2,38; 2,03; 2,28 y 1,62 %; todos estos valores presentaron la misma significancia.

Cuadro 24. Tratamiento químico en meristemos apicales y microcormos

Dosis %	Tiempo (Horas)	Explantos	Sobrevivencia de explantes (%)
0			3,46 a
0,5			2,25 b
1			2,39 b
2			2,06 b
	0		3,46 a
	3		2,33 b
	6		2,14 b
		Meristemos	2,74 a
		Microcormos	2,08 b
0		Meristemos	3,46 a
0		Microcormos	3,46 a
0,5		Meristemos	2,78 a b
1		Meristemos	2,84 a b
2		Meristemos	2,23 a b
0,5		Microcormos	1,72 b
1		Microcormos	1,95 b
2		Microcormos	1,89 b
0	0	Meristemos	3,46 a
0	0	Microcormos	3,46 a
0,5	3	Meristemos	2,78 a b
1	3	Meristemos	2,78 a b
2	3	Meristemos	3,31 a b
0,5	6	Meristemos	2,37 a b
1	6	Meristemos	2,78 a b
2	6	Meristemos	1,69 a b
2	6	Microcormos	2,38 a b
1	3	Microcormos	2,03 a b
2	3	Microcormos	2,28 a b
0,5	6	Microcormos	1,62 a b
1	6	Microcormos	1,41 b
0,5	3	Microcormos	1,41 b
Promedio general			2,48
Significancia estadística			
Factor A (Mutagénico)			Ns
Factor B (Tiempo)			Ns
Factor C (Explanete)			*
Interacción AxC			*
Interacción AxBxC			*
Coeficiente de variación			26,70 %

Promedios con la misma letra no difieren significativamente, según la prueba de Tukey al 5 % de significancia. * = significativo. Ns: no significante

4.3.2.1. Meristemos apicales

Los meristemos que fueron sometidos al mutagénico químico donde se observó sobrevivencia de los explantes en cada dosis, pero se vieron un poco más afectados en la dosis de 2 % con el tiempo de seis horas.

4.3.2.2. Microcormos

Los microcormos fueron sometidos al mutagénico químico, proceso que se llevó a cabo dentro del laboratorio, luego de la aplicación del EMS se trasladaron al invernadero del Programa de Forestales, donde se evaluó su desarrollo, los microcormos presentaron sobrevivencia en varias dosis, lastimosamente al momento de volver a introducirlos al laboratorio se contaminaron perdiéndose este material.

4.4. Porcentaje de sobrevivencia

El porcentaje de sobrevivencia de cada una de las irradiaciones con sus respectivas dosis, se pueden observar en el Cuadro 25, donde están los resultados de los meristemos apicales, en el Cuadro 26 de igual manera se puede observar la sobrevivencia en los microcormos.

En el Cuadro 27, se observa la sobrevivencia de los meristemos apicales que se sometieron al mutagénico químico EMS, en el Cuadro 28 de igual manera se puede observar la sobrevivencia de los microcormos.

Para ilustrar el efecto de la radiación con respecto a la sobrevivencia en el Anexo 8 y 9 podemos observar cómo va decreciendo la misma sobre los explantes, a medida que aumenta la dosis, estos explantes pertenecen a la cuarta irradiación y se los evaluó primero a los 15 días y luego a los 30 días.

Cuadro 25. Resumen del porcentaje (%) de sobrevivencia en meristemos apicales con el mutagénico físico desde la primera a la cuarta irradiación, con cada una de sus correspondientes dosis.

N° de irradiación	Repeticiones	Dosis																		
		0	20	40	50	60	70	80	100	120	140	150	160	180	200	250	300	350	500	
Primera	R1	75			0			0			0			0	0	0	0	0	0	
	R2	100			0			0			0			0	0	0	0	0	0	
	R3	90	----	----	0	----	----	----	0	----	----	0	----	----	0	0	0	0	0	
	R4	100			0			0			0			0	0	0	0	0	0	0
	R5	100			0			0			0			0	0	0	0	0	0	0
Segunda	R1	0	50	50		50		35	0	0	0									
	R2	100	90	75		5		0	0	10	0									
	R3	75	65	0	----	20	----	0	0	0	0	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	R4	100	75	50		0		0	0	0	0									
	R5	100	0	60		0		0	0	0	0									
Tercera	R1	100		75	80	80	0													
	R2	100		90	70	0	60													
	R3	100		75	0	0	0													
	R4	100		100	90	50	50													
	R5	100	----	40	50	60	0	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	R6	100		75	10	40	40													
	R7	100		0	70	0	40													
	R8	100		80	40	0	30													
	R9	100		30	0	50	0													
	R10	100		60	0	75	45													
Cuarta	R1	100	30	40		20		30	70	0	0		0	0						
	R2	100	60	30	----	100	----	0	0	20	0	----	0	0	----	----	----	----	----	
	R3	100	20	0		40		20	40	0	0		0	0						

---- Dosis no aplicada en esta irradiación

Cuadro 26. Resumen del porcentaje (%) de sobrevivencia en microcormos con el mutagénico físico desde la primera a la cuarta irradiación, con cada una de sus correspondientes dosis.

N° de irradiación	Repeticiones	Dosis																		
		0	20	40	50	60	70	80	100	120	140	150	160	180	200	250	300	350	500	
Primera	R1	95			0				0			0			0	0	0	0	0	
	R2	65			0				0			0			0	0	0	0	0	
	R3	100	----	----	0	----	----	----	0	----	----	0	----	----	0	0	0	0	0	
	R4	100			0					0			0			0	0	0	0	0
	R5	65			0					0			0			0	0	0	0	0
Segunda	R1	0	0	0		0		0	0	0	0									
	R2	0	0	0		0		0	0	0	0									
	R3	0	0	0	----	0	----	0	0	0	0	----	----	----	----	----	----	----	----	
	R4	0	0	0		0		0	0	0	0									
	R5	0	0	0		0		0	0	0	0									
Tercera	R1	0		0	0	0														
	R2	0		0	0	0														
	R3	0		0	0	0														
	R4	0		0	0	0														
	R5	0	----	0	0	0	0	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	
	R6	0		0	0	0														
	R7	0		0	0	0														
	R8	0		0		0	0													
	R9	0		0	0	0	0													
	R10	0		0	0	0	0													
Cuarta	R1	0	0	0		0		0	0	0	0		0	0						
	R2	0	0	0	----	0	----	0	0	0	0	----	0	0	----	----	----	----	----	
	R3	0	0	0		0		0	0	0	0		0	0						

---- Dosis no aplicada en esta irradiación

Cuadro 27. Resumen del porcentaje (%) de sobrevivencia en meristemas apicales con el mutagénico químico

Repeticiones	Dosis (%) x Tiempo (Hora)							
	0%-3H	0%-6H	0,5%-3H	0,5%-6H	1%-3H	1%-6H	2%-3H	2%-6H
R1	100	100	0	100	100	100	0	0
R2	100	100	100	100	100	30	100	30
R3	100	100	100	0	70	0	100	0

Cuadro 28. Resumen del porcentaje (%) de sobrevivencia en microcormos con el mutagénico químico

Repeticiones	Dosis (%) x Tiempo (Hora)							
	0%-3H	0%-6H	0,5%-3H	0,5%-6H	1%-3H	1%-6H	2%-3H	2%-6H
R1	100	100	0	20	50	10	0	30
R2	100	100	0	40	10	0	0	10
R3	100	100	0	40	40	10	0	100

4.5. Determinación de la DL₅₀

La dosis letal media obtenida de acuerdo al método Próbit fue de 56,64 Gy, estos datos pertenecen a los meristemos apicales que se irradiaron en la Escuela Politécnica Nacional de Quito. En la “Figura 17” se puede observar la regresión lineal de los datos de porcentajes de mortalidad transformados a Próbit que sirvieron para la obtención de estos resultados.

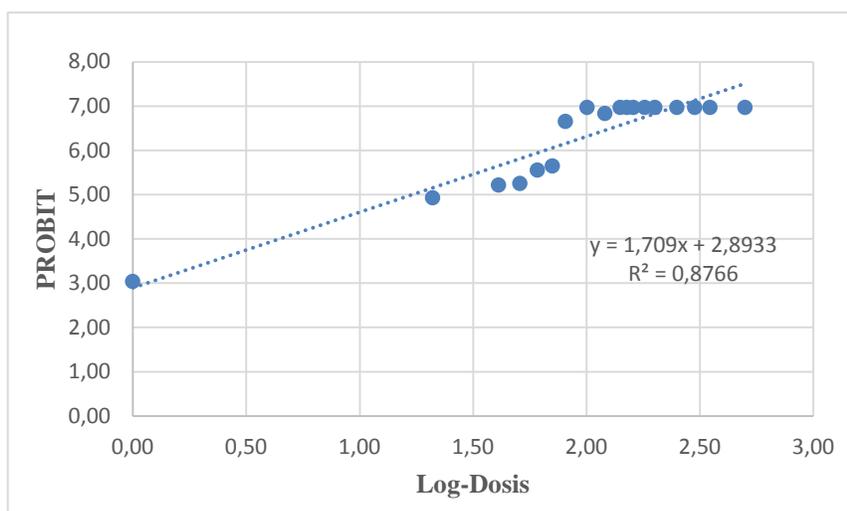


Figura 17. Regresión para la determinación de la DL₅₀ en el irradiador de Quito (meristemos apicales)

La dosis letal media obtenida de acuerdo al método Próbit utilizando el irradiador Dirección Nacional de Investigación y Aplicaciones Nucleares del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable fue de 58,32 Gy, resultado muy cercano a la que se obtuvo con el primer irradiador. En la Figura 18, se puede observar la regresión lineal de los datos de porcentajes de mortalidad transformados a Próbit que sirvieron para la obtención de estos resultados.

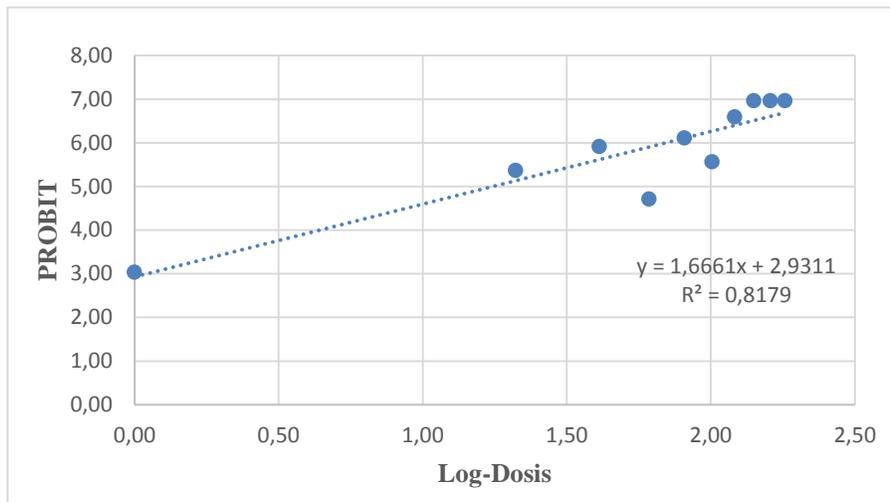


Figura 18. Regresión para la determinación de la DL_{50} en el irradiador de Aloag (meristemos apicales)

No se pudo determinar una dosis letal media para los microcormos ya que la mortalidad en estos explantes fue total, por lo tanto no se obtuvieron datos relevantes con estos explantes.

En los ensayos con el mutagénico químico con los “E1” se determinó una DL_{50} de 0,83 % que representan 120 mg de EMS en la solución mutagénica o 120 uL de EMS en la solución (4,83 mM/L), con un TL_{50} de 5 horas con 42 minutos. En la Figura 19 se puede observar la regresión lineal de los datos de porcentajes de mortalidad transformados a Próbit que sirvieron para la obtención de estos resultados.

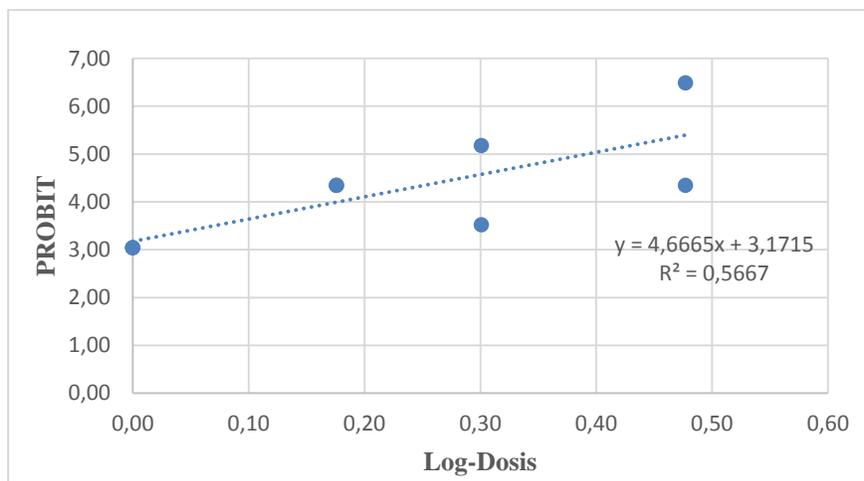


Figura 19. Regresión lineal para la determinación de la DL_{50} en meristemos apicales tratados con EMS

En los “E2” se determinó una DL_{50} de 0,38 % que representan 57 mg de EMS, con un TL_{50} de 8 horas con 10 minutos, en la solución mutagénica o 57 uL de EMS en la solución (0,56 mM/L). En la Figura 20 se puede observar la regresión lineal de los datos de porcentajes de mortalidad transformados a Próbit que sirvieron para la obtención de estos resultados.

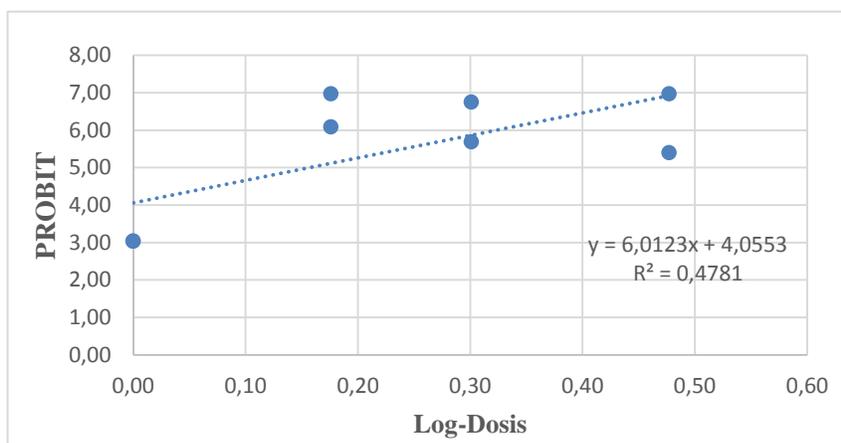


Figura 20. Regresión lineal para la determinación de la DL_{50} en microcormos tratados con EMS

4.6. Multiplicación del material genético tratado con los mutagénicos físico y químico

De los explantes sometidos a los mutagénicos, los sobrevivientes fueron propagados hasta un número aproximado de 625 explantes por dosis que sirvió para propagar las 10000 plantas que salieron del laboratorio para su aclimatación.

Debido a la pérdida de explantes por contaminación, se realizaron los repiques hasta el séptimo pase de multiplicación, para obtener el número de plantas que se fijó en los objetivos, logrando regenerar las 10000 plantas para su aclimatación y pruebas en condiciones de vivero.

4.7. Regeneración y enraizamiento

La regeneración y el enraizamiento no presentaron inconvenientes, cada explante desarrollo entre 5 y 7 brotes y se observó en las raíces un buen desarrollo, ya enraizadas se procedió a la aclimatación de las vitroplantas.

4.8. Aclimatación de vitroplantas en condiciones de vivero

En la aclimatación se perdió gran cantidad de material por la deshidratación de las hojas y por el efecto de los agentes mutagénicos, quedando sobrevivientes sólo el 19,36 % del total de las plantas con tratamiento mutagénico, que serían 1936 plantas en las diferentes dosis aplicadas. En el Cuadro 29 se refleja el número de plantas obtenidas con sus respectivas dosis.

Cuadro 29. Número de plantas por cada dosis y número total de plantas en general

Tratamiento	Dosis	# total de plantas
Tratamiento Físico	20 Gy-IV	308
	40 Gy-IV	301
	60 Gy-IV	435
	80 Gy-IV	181
	100 Gy-IV	165
	120 Gy-IV	74
	20 Gy-II	2
	40 Gy-III	39
	50 Gy-III	15
	60 Gy-III	18
Tratamiento Químico	0.5%-3H	87
	0.5%-6H	25
	1%-3H	27
	1%-6H	19
	2% - 3H	236
	2%-6H	4
	Total	1936

4.9. Reacción a *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet en vitroplantas de vivero

4.9.1. Preparación del inóculo de *M. fijiensis*

Se obtuvo el volumen necesario de las suspensiones miceliales para la inoculación de todas las plantas tratadas con los mutagénicos. La inoculación se realizó dentro de una cámara de

inoculación ubicada en el vivero del Programa Nacional de Banano, Plátano y Otras Musáceas, donde se mantenían controladas las condiciones de humedad relativa y temperatura.

4.9.2. Inoculación y evaluación de la reacción a *M. fijiensis* en las vitroplantas

Las plantas sobrevivientes a la aclimatación fueron inoculadas, actividad que se realizó el 6 de noviembre del 2014, de manera exitosa, ya que la enfermedad se logró expresar de manera eficaz en todas las plantas, pudiendo luego realizarse la evaluación de las mismas. A estas plantas se las ubicó dentro de una cámara de inoculación en donde las condiciones para el desarrollo del hongo y la expresión de síntomas en las hojas como la temperatura (26 – 28 °C), humedad relativa (90 - 100 %) y lámina de agua en la cara adaxial de las hojas fue más controlable, teniendo así una mayor presión de inóculo. Se inocularon 1936 plantas.

4.9.3. Determinación del porcentaje ponderado de infección (PPI)

Se realizaron evaluaciones semanales, la primera evaluación se la hizo el 20 de Noviembre del 2014, de acuerdo a la escala de severidad de Stover, donde se obtuvo resultados interesantes y se pudo determinar que el periodo de incubación en estas plantas vario según lo evaluado entre los 14 a los 16 días posteriores a la inoculación.

Las plantas fueron evaluadas hasta los 78 días, los datos obtenidos en la última evaluación sirvieron para calcular el Promedio Ponderado de Infección (PPI) de cada planta perteneciente a cada una de las dosis en estudio, que es un indicador de resistencia a Sigatoka negra (Almodóvar & Díaz, 2007).

4.9.4. Selección de plantas de menor reacción a *M. fijiensis*

En el Cuadro 30, se pueden observar las plantas con el PPI más bajo de cada dosis, identificadas con sus respectivos códigos en cada uno de los individuos, estos fueron seleccionados como los individuos con menor reacción ante la Sigatoka negra.

Cuadro 30. Promedios ponderados de infección más bajos de acuerdo a sus dosis.

PPI más bajos		
Dosis	Código	PPI
120 Gy-IV	2386	0,33
60 Gy-III	2267	0,50
1%-3H	1436	0,67
2%-3H	909	0,67
40 Gy-IV	439	0,83
60 Gy-IV	638	0,83
2%-3H	905	0,83
80 Gy-IV	798	1,00
100 Gy-IV	825	1,00
100 Gy-IV	818	1,00
100 Gy-IV	2201	1,00
20 Gy-IV	263	1,17
1%-6H	2633	1,33
40 Gy-III	1090	1,50
0,5%-3H	1134	1,50
0.5%-6h	2358	1,50

Se seleccionó también a cada individuo que poseía un PPI menor a 2 %, identificándolo por sus código y dosis, en el cuadro 31 se presenta la lista de las plantas mencionadas.

Cuadro 31. Lista de plantas con el "PPI" menor a 2 %, identificados con su respectivo código y dosis.

Plantas con PPI menor a 2 %											
Dosis	Cód	PPI %	Dosis	Cód	PPI %	Dosis	Cód	PPI %	Dosis	Cód	PPI %
20 Gy-IV	90	2,00	40 Gy-IV	1815	1,00	60 Gy-IV	2678	1,67	100 Gy-IV	1414	1,50
20 Gy-IV	89	1,67	40 Gy-IV	1801	1,83	60 Gy-IV	2664	1,17	120 Gy-IV	2400	2,00
20 Gy-IV	121	2,00	40 Gy-IV	1807	1,67	60 Gy-IV	2669	2,00	120 Gy-IV	2389	1,50
20 Gy-IV	124	1,67	40 Gy-IV	1945	1,67	60 Gy-IV	2667	1,33	120 Gy-IV	1385	2,00
20 Gy-IV	3	1,67	40 Gy-IV	1938	1,17	60 Gy-IV	1458	1,83	60 Gy-III	2261	1,17
20 Gy-IV	83	2,00	40 Gy-IV	1914	1,33	60 Gy-IV	2093	2,00	0,5%-3H	2822	1,83
20 Gy-IV	99	1,67	40 Gy-IV	1589	1,00	80 Gy-IV	757	1,50	0,5%-6H	2356	1,83
20 Gy-IV	97	2,00	60 Gy-IV	585	1,67	80 Gy-IV	744	1,83	1%-3H	1231	1,83
20 Gy-IV	251	1,67	60 Gy-IV	622	1,33	80 Gy-IV	762	1,17	1%-3H	1237	2,00
20 Gy-IV	239	1,83	60 Gy-IV	586	1,67	80 Gy-IV	788	1,50	1%-3H	2819	2,00
20 Gy-IV	210	2,00	60 Gy-IV	574	1,83	80 Gy-IV	791	1,83	1%-3H	1323	1,33
20 Gy-IV	173	1,83	60 Gy-IV	641	1,50	80 Gy-IV	742	1,83	1%-3H	2260	1,83
20 Gy-IV	163	1,67	60 Gy-IV	642	1,00	80 Gy-IV	753	2,00	1%-6H	2636	1,83
20 Gy-IV	1614	1,33	60 Gy-IV	664	2,00	80 Gy-IV	708	1,17	1%-6H	2651	1,67
40 Gy-IV	454	1,67	60 Gy-IV	674	1,67	80 Gy-IV	740	1,67	1%-6H	2645	1,83
40 Gy-IV	387	2,00	60 Gy-IV	673	2,00	80 Gy-IV	2149	1,67	2%-3H	906	1,67
40 Gy-IV	382	1,83	60 Gy-IV	571	1,33	80 Gy-IV	2612	1,67	2%-3H	947	1,83
40 Gy-IV	419	1,83	60 Gy-IV	643	1,83	80 Gy-IV	2605	2,00	2%-3H	882	5,00
40 Gy-IV	369	2,00	60 Gy-IV	596	1,33	100 Gy-IV	844	1,33	2%-3H	958	1,00
40 Gy-IV	476	2,00	60 Gy-IV	614	1,33	100 Gy-IV	841	2,00	2%-3H	959	1,33
40 Gy-IV	373	1,50	60 Gy-IV	542	1,67	100 Gy-IV	840	2,00	2%-3H	954	1,67
40 Gy-IV	513	1,50	60 Gy-IV	558	1,83	100 Gy-IV	847	2,00	2%-3H	936	1,83
40 Gy-IV	434	1,50	60 Gy-IV	612	2,00	100 Gy-IV	829	2,00	2%-3H	905	0,83
40 Gy-IV	517	1,00	60 Gy-IV	666	1,50	100 Gy-IV	810	2,00	2%-3H	990	1,00
40 Gy-IV	502	1,83	60 Gy-IV	635	1,83	100 Gy-IV	868	1,50	2%-3H	938	2,00

40 Gy-IV	466	2,00	60 Gy-IV	648	2,00	100 Gy-IV	850	1,50	2%-3H	944	2,00
40 Gy-IV	463	2,00	60 Gy-IV	653	1,33	100 Gy-IV	872	1,83	2%-3H	957	2,00
40 Gy-IV	446	2,00	60 Gy-IV	651	1,83	100 Gy-IV	853	2,00	2%-3H	899	1,33
40 Gy-IV	412	2,00	60 Gy-IV	670	1,00	100 Gy-IV	856	1,67	2%-3H	965	1,83
40 Gy-IV	407	2,00	60 Gy-IV	684	1,50	100 Gy-IV	2180	2,00	2%-3H	359	2,00
40 Gy-IV	389	2,00	60 Gy-IV	537	1,17	100 Gy-IV	2192	1,67			
40 Gy-IV	404	1,33	60 Gy-IV	2724	1,83	100 Gy-IV	2206	2,00			
40 Gy-IV	436	1,67	60 Gy-IV	2731	1,50	100 Gy-IV	2226	1,67			
40 Gy-IV	437	2,00	60 Gy-IV	2743	1,50	100 Gy-IV	2224	2,00			
40 Gy-IV	455	1,33	60 Gy-IV	2751	1,33	100 Gy-IV	2234	2,00			
40 Gy-IV	486	1,17	60 Gy-IV	2778	2,00	100 Gy-IV	2251	2,00			
40 Gy-IV	487	1,83	60 Gy-IV	2043	2,00	100 Gy-IV	2249	2,00			
40 Gy-IV	505	2,00	60 Gy-IV	2014	2,00	100 Gy-IV	2434	2,00			
40 Gy-IV	1860	1,33	60 Gy-IV	1529	2,00	100 Gy-IV	1405	1,83			
40 Gy-IV	1785	1,83	60 Gy-IV	2657	1,83	100 Gy-IV	1397	2,00			

4.10. Variables a evaluadas

4.10.1. Promedio ponderado de infección

En el Cuadro 36, se presentan las dosis que mostraron la mayor significancia, estas son 1%-6h (h = horas) y 20 Gy-II, con valores de 2,96 y 3,08 %, los Promedios Ponderados de Infección (PPI) más bajo, seguidas de las dosis de 1 %-3H, 100 Gy-IV, 60 Gy-IV, 2 %-3H, 80 Gy-IV, 20 Gy-IV, 40 Gy-IV, 40 Gy-III, 50 Gy-III, 0,5 %-6H, 0,5 %-3H, 120 Gy-IV, 60 Gy-III, que presentaron significancia similar a los primeros ya mencionados con valores de 3,37; 3,43; 3,49; 3,52; 3,54; 3,55; 3,56; 3,58; 3,60; 3,62; 3,73; 3,78; 3,81; 4,13 %. Las medias más elevadas se dieron en las dosis de 2 %-6h y el control (0 Gy) con un valor de 4,49 %.

Sin embargo, para ser específicos las plantas que presentaron los PPI más bajos fueron las que se ubicaron en las dosis de: 120 Gy-IV con un 0,33 %, seguida por las dosis de: 60 Gy-III con (0,50 %), 1 %-3H con (0,67 %), 2 %-3H con (0,67 %), 40 Gy-IV (0,83 %), 60 Gy-IV con (0,83 %), 80 Gy-IV con (1 %), 100 Gy-IV con (1 %), 20 Gy-IV con (1,17 %), 1 %-6H con (1,33 %), 40 Gy-III con (1,50 %), 0,5 %-3H con (1,50 %), 0,5 %-6H con (1,50 %), 20 Gy-II con (2,17 %), 50 Gy-III con (2,17 %), 2 %-6H con (3,17 %), 0 Gy con (3,50 %), el hecho de que estos resultados varíen con respecto al análisis de los datos en cada dosis se debe a que no todas las plantas presentaron los mismos PPI, presentándose dentro de una misma dosis plantas con un PPI más alto y otros más bajos, y al analizar todos el grupos no se identifica aquellas con el PPI más óptimo. En la Figura 21, se pueden observar con más detalle los promedios mencionados contrastados con los PPI más altos de cada dosis.

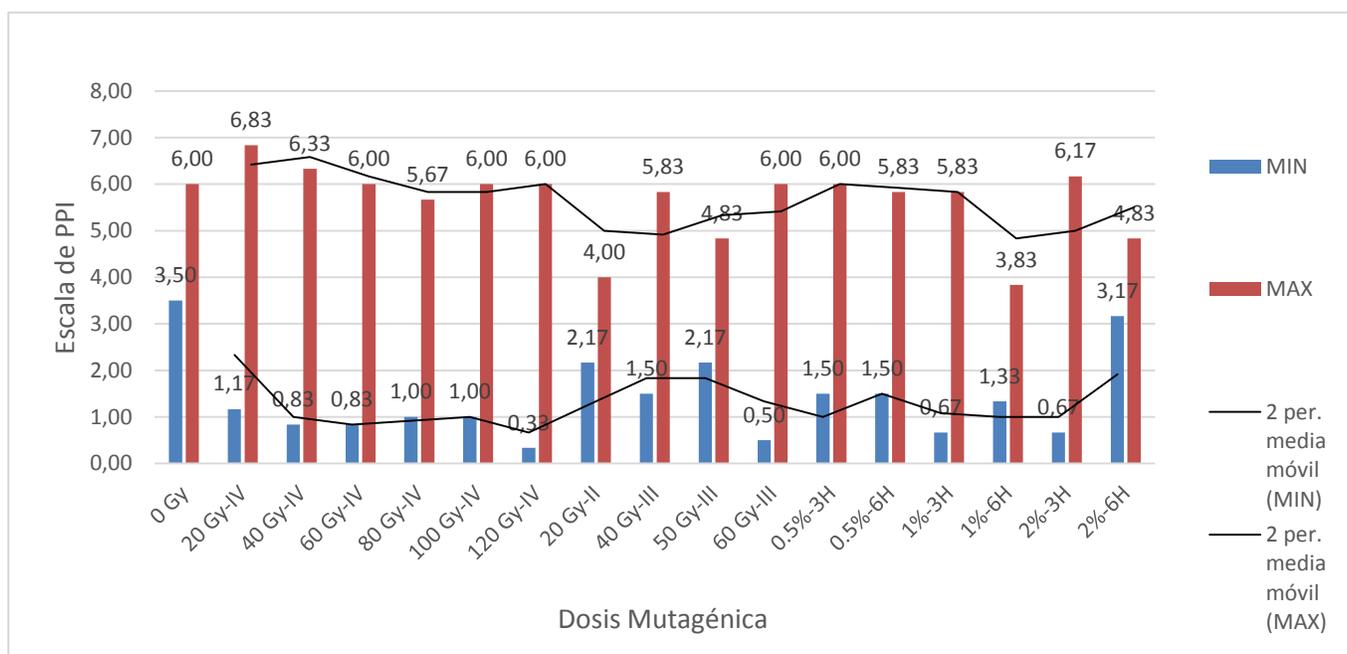


Figura 21. Promedios ponderados de infección mínimos y máximos de acuerdo a sus dosis.

Cuadro 32. Promedio ponderado de infección en plantas sometidas a mutagénicos aclimatadas en vivero

Dosis mutagénicos plantas en vivero	Promedio ponderado de infección (PPI)
1%-6H	2,96 a
20 Gy-II	3,08 a
1%-3H	3,37 a b
100 Gy-IV	3,43 a b
60 Gy-IV	3,49 a b
2%-3H	3,52 a b
80 Gy-IV	3,54 a b
20 Gy-IV	3,55 a b
40 Gy-IV	3,56 a b
40 Gy-III	3,58 a b c
50 Gy-III	3,60 a b c
0,5%-6H	3,62 a b c
0,5%-3H	3,73 a b c
120 Gy-IV	3,78 a b c
60 Gy-III	3,81 a b c
2%-6H	4,13 b c
0 Gy	4,49 c
Promedio general	3.60
Significancia estadística	*
Coeficiente de variación	8.41

Promedios con la misma letra no difieren significativamente, según la prueba de Tukey al 5 % de significancia.

* = significativo Ns: no significativo

4.10.2. Detección de variantes fenotípicas

Durante el proceso de la evaluación de Sigatoka negra, se pudieron observar plantas con cambios en su característica física (variación fenotípica) como se puede observar en la Figura 22, los cambios que se presentaron fueron específicamente en el color y forma de las hojas como por ejemplo: hojas rayadas, hojas con manchas rojas grandes, hojas albinas, hojas alargadas, hojas redondas, hojas con manchas blancas, hojas con doble coloración, hojas con bordes deformes y hojas pequeñas, cada una de las plantas fue identificada con un código, las mismas fueron contadas y ordenadas de acuerdo a su dosis mutagénica.

En la Figuras 23, se pueden observar el porcentaje de plantas, de acuerdo a su dosis mutagénica y el porcentaje de plantas de acuerdo al tipo de variación fenotípica en la Figura 24, donde el mayor porcentaje de variaciones se presentó en la dosis de 2 %-3h seguidas por las dosis de 40 y 100 Gy con 1,60 %, y en el tipo de variación donde se presentó el mayor porcentaje de plantas fue en “hojas rayadas” con 7,8 %, seguida por “hojas delgadas” con un 2,48 %. Estos valores fueron determinados del total de la población de plantas tratadas con los mutagénicos que fueron 1936 plantas.

Adicionalmente se detallan en los “Cuadros 37, 38 y 39” las listas de plantas que presentaron las diferentes variaciones fenotípicas, con su respectivo código y dosis a las que pertenecen.

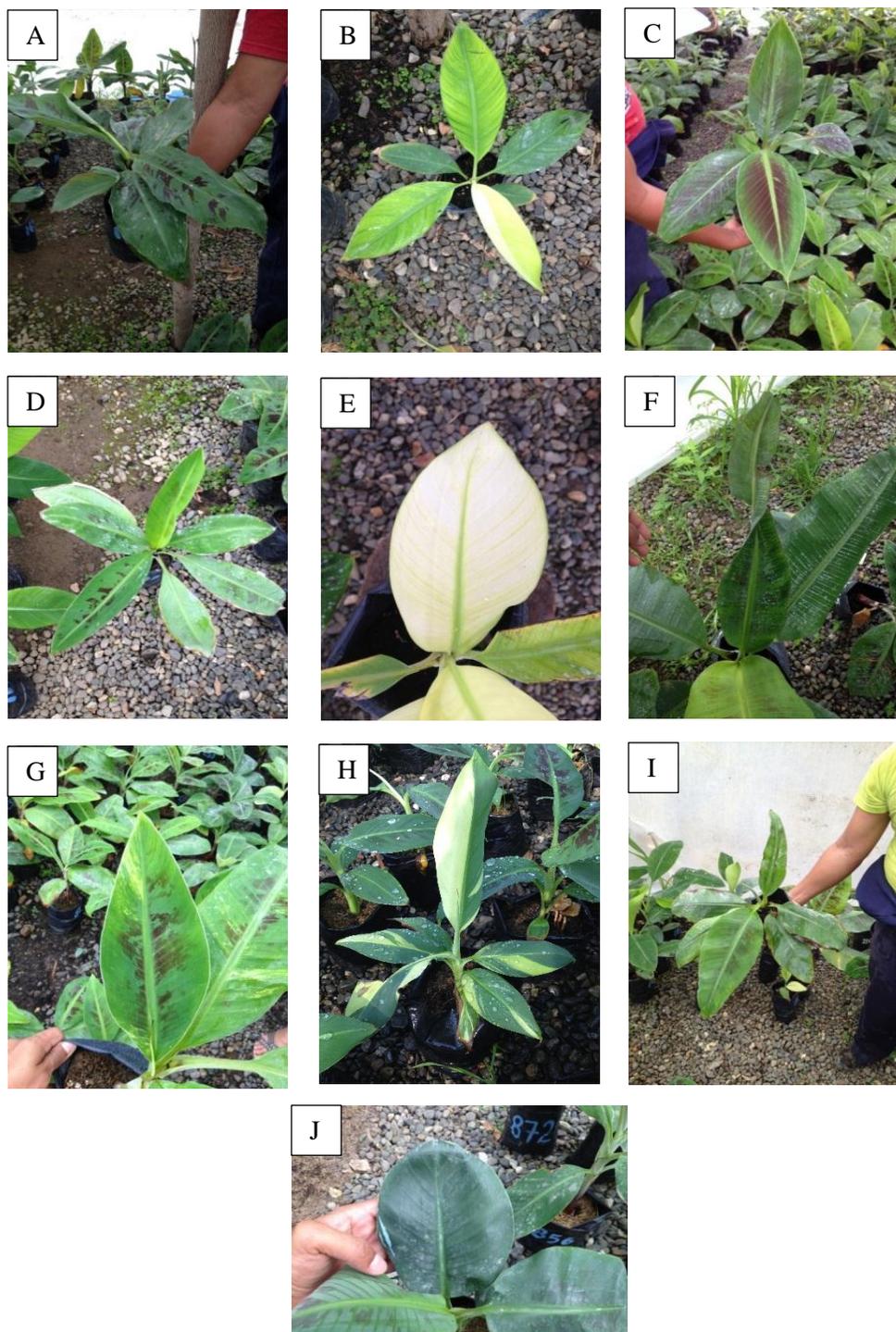


Figura 22. Variaciones fenotípicas presentes en las plantas en estudio: A) hojas pequeñas, B) hojas rayadas, C) machas rojas más desarrolladas, D) hojas delgadas y alargadas, E) hojas albinas, F) hojas deformes con hendiduras en el borde, G) hojas con manchas blancas, H) hojas con doble coloración, I) hojas deformes torcidas, J) hojas redondeadas.

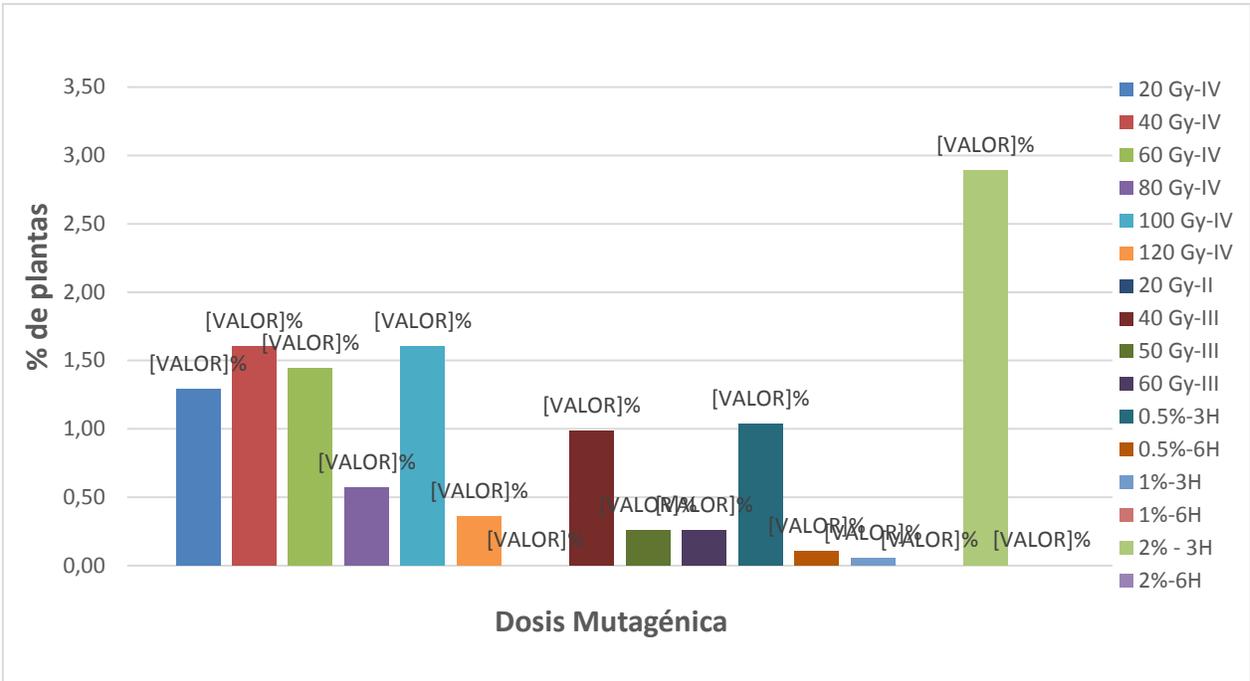


Figura 23. Porcentaje de variaciones fenotípicas por dosis mutagénica

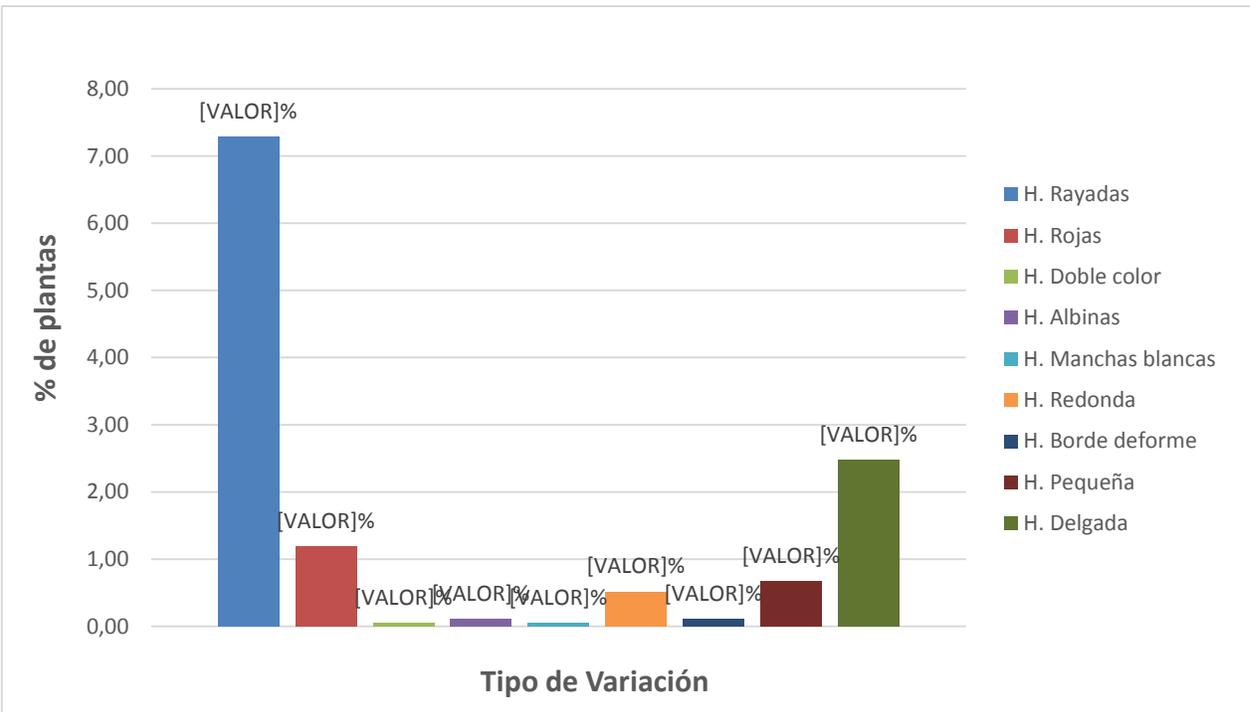


Figura 24. Porcentaje de plantas por tipo de variación fenotípica

Cuadro 33. Lista de plantas que presentaron "hojas rayadas", con su respectivo código y dosis.

H. Rayadas											
Código	Dosis	Código	Dosis	Código	Dosis	Código	Dosis	Código	Dosis	Código	Dosis
1142	0,5%-3h	946	2%-3h	1007	2%-3h	2279	2%-3h	1519	60 Gy-IV	1100	40 Gy-III
1124	0,5%-3h	947	2%-3h	1008	2%-3h	1613	20 Gy-IV	2062	60 Gy-IV	1101	40 Gy-III
1153	0,5%-3h	970	2%-3h	1003	2%-3h	1615	20 Gy-IV	1465	60 Gy-IV	1089	40 Gy-III
2320	0,5%-3h	1029	2%-3h	1004	2%-3h	103	20 Gy-IV	1484	60 Gy-IV	1084	40 Gy-III
1149	0,5%-3h	1012	2%-3h	897	2%-3h	19	20 Gy-IV	1480	60 Gy-IV	1085	40 Gy-III
1137	0,5%-3h	1061	2%-3h	892	2%-3h	48	20 Gy-IV	540	60 Gy-IV	1098	40 Gy-III
1135	0,5%-3h	1046	2%-3h	939	2%-3h	51	20 Gy-IV	703	80 Gy-IV	1074	40 Gy-III
1132	0,5%-3h	1066	2%-3h	924	2%-3h	1805	40 Gy-IV	1429	100 Gy-IV	1075	40 Gy-III
1130	0,5%-3h	1038	2%-3h	993	2%-3h	1597	40 Gy-IV	805	100 Gy-IV	1063	40 Gy-III
2486	0,5%-3h	1039	2%-3h	944	2%-3h	1598	40 Gy-IV	819	100 Gy-IV	1079	40 Gy-III
2490	0,5%-3h	1018	2%-3h	942	2%-3h	676	60 Gy-IV	878	100 Gy-IV	1076	40 Gy-III
1122	0,5%-3h	1025	2%-3h	973	2%-3h	677	60 Gy-IV	2234	100 Gy-IV	1078	40 Gy-III
1125	0,5%-3h	971	2%-3h	988	2%-3h	2711	60 Gy-IV	1422	100 Gy-IV	1077	40 Gy-III
1126	0,5%-3h	879	2%-3h	959	2%-3h	687	60 Gy-IV	1418	100 Gy-IV	1106	40 Gy-III
1129	0,5%-3h	1057	2%-3h	982	2%-3h	652	60 Gy-IV	1376	120 Gy-IV	1111	40 Gy-III
1140	0,5%-3h	1055	2%-3h	983	2%-3h	631	60 Gy-IV	1395	120 Gy-IV	1119	50 Gy-III
1141	0,5%-3h	1054	2%-3h	984	2%-3h	679	60 Gy-IV	1349	120 Gy-IV	1118	50 Gy-III
1144	0,5%-3h	1056	2%-3h	997	2%-3h	2669	60 Gy-IV	1363	120 Gy-IV	1115	50 Gy-III
1218	0,5%-3h	1024	2%-3h	1013	2%-3h	1485	60 Gy-IV	1386	120 Gy-IV	2265	60 Gy-III
2285	0,5%-3h	1035	2%-3h	1017	2%-3h	1500	60 Gy-IV	1088	40 Gy-III	2263	60 Gy-III
2309	0,5%-6h	1023	2%-3h	1026	2%-3h	1535	60 Gy-IV	1102	40 Gy-III	2273	60 Gy-III
2319	0,5%-6h	1022	2%-3h	1000	2%-3h	1538	60 Gy-IV	1103	40 Gy-III	2276	60 Gy-III
1237	1%-3H	1006	2%-3h	1011	2%-3h	1518	60 Gy-IV	1099	40 Gy-III		

Cuadro 34. Lista de plantas con "hojas rojas", "hojas delgadas", con sus respectivos códigos y dosis.

H. Rojas		H. Delgada			
Cód	Dosis	Cód	Dosis	Cód	Dosis
372	40 Gy-IV	348	2%-3h	800	80 Gy-IV
376	40 Gy-IV	174	20 Gy-IV	782	80 Gy-IV
377	40 Gy-IV	157	20 Gy-IV	801	80 Gy-IV
406	40 Gy-IV	97	20 Gy-IV	784	80 Gy-IV
431	40 Gy-IV	49	20 Gy-IV	817	100 Gy-IV
467	40 Gy-IV	134	20 Gy-IV	822	100 Gy-IV
591	40 Gy-IV	121	20 Gy-IV	824	100 Gy-IV
541	40 Gy-IV	118	20 Gy-IV	807	100 Gy-IV
464	40 Gy-IV	117	20 Gy-IV	837	100 Gy-IV
465	40 Gy-IV	139	20 Gy-IV	872	100 Gy-IV
401	40 Gy-IV	140	20 Gy-IV	870	100 Gy-IV
456	40 Gy-IV	259	20 Gy-IV	866	100 Gy-IV
469	40 Gy-IV	193	20 Gy-IV	844	100 Gy-IV
455	40 Gy-IV	390	40 Gy-IV	829	100 Gy-IV
435	40 Gy-IV	423	40 Gy-IV	830	100 Gy-IV
433	40 Gy-IV	328	40 Gy-IV	811	100 Gy-IV
439	40 Gy-IV	471	40 Gy-IV	814	100 Gy-IV
452	40 Gy-IV	420	40 Gy-IV	847	100 Gy-IV
454	40 Gy-IV	539	60 Gy-IV	832	100 Gy-IV
2099	60 Gy-IV	642	60 Gy-IV	833	100 Gy-IV
1545	60 Gy-IV	661	60 Gy-IV	1117	50 Gy-III

Cuadro 35. Lista de plantas con "hojas pequeñas", "hojas redondas", "hojas con doble coloración", "hojas albinas", "hojas con manchas blancas", "hojas con borde deforme" y "tallos alargados", con sus respectivos códigos y dosis.

H. Pequeña		H. Redonda		H. Doble color		T. Alargado		H. Albinas		H. Manchas Blancas		H. Borde deforme	
Cód	Dosis	Cód	Dosis	Cód	Dosis	Cód	Dosis	Cód	Dosis	Cód	Dosis	Cód	Dosis
996	2%-3h	1219	0,5%-3h	324	2%-3h	967	2%-3h	914	2%-3h	288	20 Gy-IV	1396	100 Gy-IV
289	20 Gy-IV	1209	0,5%-3h			922	2%-3h					558	60 Gy-IV
301	20 Gy-IV	1210	0,5%-3h			1	20 Gy-IV						
303	20 Gy-IV	1147	0,5%-3h										
302	20 Gy-IV	2088	60 Gy-IV										
279	20 Gy-IV	2223	100 Gy-IV										
633	60 Gy-IV	820	100 Gy-IV										
704	80 Gy-IV	1339	120 Gy-IV										
787	80 Gy-IV	1392	120 Gy-IV										
792	80 Gy-IV	2269	60 Gy-III										
793	80 Gy-IV												
770	80 Gy-IV												

4.10.3. Contenido de clorofila en vitroplantas

Los resultados en la medición del contenido de clorofila fueron como se esperaban, ya que esta sustancia se vio disminuida en las plantas estudiadas de cada dosis, a excepción de la dosis de 60 Gy-III.

Se pudo observar que en la medición inicial el tratamiento 8 (40 Gy-III) presentó la mayor significancia estadística con 60,22 SPAD, seguido de los tratamientos 10 (60 Gy-III), 7 (20 Gy-II), 3 (60 Gy-IV), 1 (20 Gy-IV), 5 (100 Gy-IV), 2 (40 Gy-IV), 11 (0,5 %-3h), 4 (80 Gy-IV), 15 (2 %-3h), 13 (1 %-3h), 9 (50 Gy-III), 14 (1 %-6h), 12 (0,5 %-6h) y 6 (120 Gy-IV), con valores de 52,75; 52,65; 53,3; 51,02; 49,93; 50,23; 48,27; 51,49; 50,46; 46,92; 50,92; 51,55; 47,73; 55,54 SPAD respectivamente, siendo el tratamiento 16 (2 %-6h) el valor más alejado con 44,1 SPAD.

En la medición final el tratamiento 8 (40 Gy-III) presentó la mayor significancia estadística con 60,22 SPAD, seguido de los tratamientos 10 (60 Gy-III), 7 (20 Gy-II), 3 (60 Gy-IV), 1 (20 Gy-IV), 5 (100 Gy-IV), 2 (40 Gy-IV), 11 (0,5 %-3h), 4 (80 Gy-IV), 15 (2 %-3h), 13 (1 %-3h) y 9 (50 Gy-III) con valores de , 60,22; 58,05; 50,8; 46,21; 45,98; 45,22; 44,97; 43,85; 43,64; 43,45; 43,07; 42,76 SPAD respectivamente, con significancia similar. Los tratamientos más alejados de los más significativos fueron el 14 (1 %-6h), 12 (0,5 %-6h), 6 (120 Gy-IV) y 16 (2 %-6h) con valores de 40,3; 39,4; 36,54; 35,03 SPAD respectivamente.

Por lo tanto haciendo una comparación entre el contenido inicial con el final, se observa una disminución en la clorofila en la medición final presentándose esa baja en todos los tratamientos a excepción del tratamiento 10 donde la media tuvo un aumento en el contenido final. Sacando como conclusión que el contenido de clorofila se ve afectado por el ataque de la *Sigatoka negra*.

Cuadro 36. Datos del análisis del contenido de clorofila inicial y final en unidades SPAD

Tratamiento	Inicial SPAD 1	Final SPAD 2
8	60,22 a	60,22 a
10	52,75 a b	58,05 a b
7	52,65 a b	50,8 a b c
3	53,3 a b	46,21 a b c
1	51,02 a b	45,98 a b c
5	49,93 a b	45,22 a b c
2	50,23 a b	44,97 a b c
11	48,27 a b	43,85 a b c
4	51,49 a b	43,64 a b c
15	50,46 a b	43,45 a b c
13	46,92 a b	43,07 a b c
9	50,92 a b	42,76 a b c
14	51,55 a b	40,3 b c
12	47,73 a b	39,4 c
6	55,54 a b	36,54 c
16	44,1 b	35,03 c
Promedio general	51,06	44,96
Significancia estadística	*	*
Coefficiente de variación	13,49	17,83

Promedios con la misma letra no difieren significativamente, según la prueba de Tukey al 5 % de significancia.

* = significativo Ns: no significativo

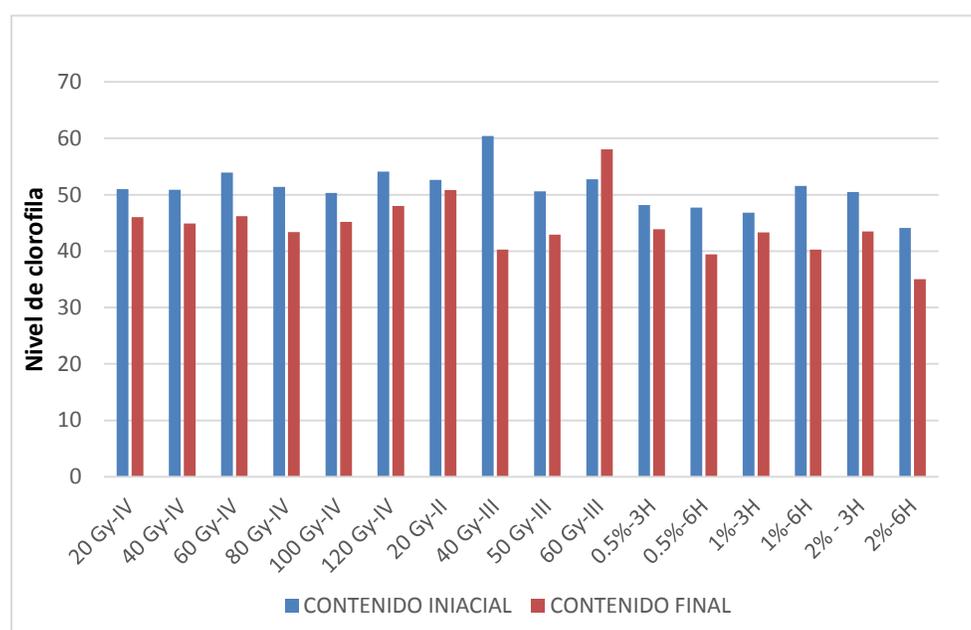


Figura 25. Promedios del contenido de clorofila por cada dosis.

5. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados, con respecto al porcentaje de sobrevivencia, los dos tipos de explantes utilizados en la presente investigación, meristemos apicales (E1) y microcormos (E2), se manejaron en condiciones de laboratorio y vivero, respectivamente; los que fueron sometidos a dos agentes mutagénicos: físico (Radiación Gamma - ^{60}Co) y químico (Ethylmethanesulfonate – EMS).

Los meristemos apicales (E1) que sobrevivieron a las radiaciones (cuatro en total), fueron sometidos a condiciones controladas y asépticas de laboratorio, propagados en un medio de cultivo artificial (MS), respondiendo de manera óptima a los procesos de multiplicación y regeneración, por medio de la cual se logró un número aproximado de 6000 vitroplantas a diferencia del mutagénico químico (EMS) que se obtuvo una cantidad de 4000 vitroplantas. Este resultado es corroborado por lo que menciona (Reyes, 2007), quien al realizar los estudios de mutaciones inducidas en banano, pudo regenerar cientos de vitroplántulas en medios de cultivo MS sin ningún inconveniente.

Con respecto a los microcormos (E2), la situación fue diferente. Las cuatro irradiaciones realizadas, no respondieron positivamente a los tratamientos utilizados en el ensayo, debido a que la mortalidad de estos explantes fue total en todas las irradiaciones realizadas. Probablemente el efecto de esta energía ionizante provocó un debilitamiento en el material, que incluso en las dosis más leves provocaron mortalidad. Igualmente las dosis aplicadas con el EMS, surgieron un efecto negativo, provocando un número bajo de plántulas. Esto puede estar relacionado con lo que mencionan Feder *et al.* y Saran *et al.* (sf), citados por Sánchez, Ramírez, & Barbosa (2007), quienes manifiestan que las proteínas que causan el stress en las células pueden ser inducidas por varios factores, entre estos la radiación gamma, el calor y el frío. Es importante mencionar también que, estos explantes fueron preparados realizando cortes de raíces y pseudotallos, lo que pudo haber sido una vía de acceso para patógenos por estar en condiciones de vivero, potenciando el proceso apoptótico severo que detuvo su desarrollo, provocándoles la muerte.

De acuerdo a los análisis de las irradiaciones, en la primera irradiación todas las dosis presentaron el mismo nivel de sobrevivencia que fue nulo a excepción del control que presentó el índice más alto con los meristemos apicales, en los microcormos tampoco hubo sobrevivencia, ya que en esta irradiación las dosis utilizadas fueron las más elevadas.

En la segunda irradiación el control junto con la dosis de 20 y 40 Gy tuvieron las más altas sobrevivencias llegando a sobrevivir hasta los 120 Gy con los meristemos apicales, no hubo sobrevivencia con microcormos.

En la tercera irradiación el control junto con la dosis de 40 Gy tuvieron las sobrevivencias más altas en los meristemos apicales las otras dosis tuvieron sobrevivencia pero fue más baja.

En la cuarta irradiación el control junto con las dosis de 20 a 100 Gy tuvieron sobrevivencia pero fue disminuyendo a medida que la dosis aumentaba (Jadán, Debut, & Niveló, sf), autores que mencionan también una disminución de sobrevivencia a medida que la radiación aumenta, dándose la más baja sobrevivencia en la dosis de 120 Gy y con dosis superiores a estas la sobrevivencia fue nula esto se dio en los meristemos apicales, con los microcormos no hubo sobrevivencia.

En el ensayo con EMS los controles fueron los que presentaron la mayor sobrevivencia en meristemos y microcormos siendo los meristemos apicales con la dosis de 0,5 %-3h y 1 %-3h los que tuvieron una sobrevivencia superior al resto de dosis, aunque las demás dosis presentaron sobrevivencias similares en meristemos y microcormos y en todos los tiempos aplicados, siendo las más alejadas las dosis de 1 %-6h y 0,5 %3-h en los microcormos.

Se pudo determinar que los explantes de banano (meristemos apicales) cv. "Williams" resisten altas concentraciones de radiación gamma teniendo como límite la dosis de 120 Gy que de acuerdo al estudio realizado hasta dicha dosis hubo sobrevivencia y los explantes se regeneraron sin inconveniente luego de 30 días de subcultivos, pasada esta dosis de energía los explantes no sobreviven. Aplicando el mutagénico químico también hay sobrevivencia en ambos explantes, teniendo en cuenta evitar la contaminación en la manipulación en el caso de los meristemos apicales.

Este estudio estuvo dirigido a probar si agentes, físicos (rayos gamma) y químicos (Ethylmethanesulphonate) provocan mutaciones útiles en vitroplantas de banano del cultivar Williams, específicamente para determinar una dosis letal media en ambos mutagénicos e inducir tolerancia o resistencia a Sigatoka negra, evaluándose en condiciones de vivero.

La dosis letal media DL_{50} encontrada en estos experimentos realizados con el irradiador de Quito y con el irradiador marca Sheperd fueron 56,64 y 58,32 Gy, respectivamente; acercándose mucho a los resultados obtenidos por López *et al.* (s.f), el que menciona que la dosis óptima para aplicar al clon “Parecido al Rey” es de 60 Gy, clon que pertenece al subgrupo Cavendish donde la genética de todos los clones pertenecientes a este subgrupo es homogénea (Román, González, Xiqués, Cazañas, & Alonso, s.f.).

López (s.f.) también menciona que para “Gran enano” con genoma (AAA) se determinó una dosis óptima de 35 Gy alejándose un poco de estos resultados, pero se aproximaron mucho con los resultados obtenidos por Ali (1997), quien determinó para el clon Gran Enano una DL_{50} de 33,6 Gy. Yang *et al.* (1995) citado por Ali (1997) mencionan que la DL_{50} óptima para el cultivar Williams es de 40 Gy, mientras que García *et al.* (2000), mencionan que 40 Gy en el cultivar Gran Enano (AAA) da como resultado un porcentaje muy alto de mortalidad (82 %), considerándola como letal y recomendando la dosis de 25 Gy; sin embargo (Roux N. , s.f.) recomienda para los clones con genotipo triploide un rango de irradiación que va de 30 a 40 Gy.

Según Chai, Ho, Liew, & Asif (s.f) el mayor porcentaje de variantes, como los cambios en la hoja de coloración y textura de la hoja, la deformación de la hoja, retraso en el crecimiento, etc se obtuvo con el tratamiento con 45 Gy, presentando similitud con los resultados en este estudios donde la mayoría de la variaciones se dieron en cambios de coloración y forma de las hojas.

Por último los datos que más contrastan con los mencionados son los de Rodríguez (2000), quien determinó que para el genotipo triploide (AAA) Gran Enano la dosis de irradiación óptima es de 15 Gy (Reyes, 2007) obtuvo resultados para el cultivar Williams donde la DL_{50} estuvo entre 79,7 a 88,1 Gy, contrastando un poco con los resultados obtenidos en esta investigación en lo referente a la aplicación de rayos gamma.

En lo referente al ensayo con EMS en meristemos apicales, la DL_{50} determinada fue de 0,83 % (4,83 mM), durante 5 horas con 42 minutos de tiempo de incubación, según Perea (1992) se ha logrado inducir mutaciones, introduciendo vitroplantas en una solución de EMS de 0,1 a 1,0 %, resultados que se aproximan a la DL_{50} determinada en el estudio, y contrastando con los datos presentados por Robinson & Galán (2011) que indican una concentración de 0,2 % durante 3 horas de incubación induce mutaciones. Los datos obtenidos en el ensayo con microcormos dieron como DL_{50} una concentración de 0,38 % (0,56 mM), durante 8 horas con 10 minutos y 8 segundos de incubación, los explantes sobrevivientes debían ser introducidos a condiciones de laboratorio una vez regeneradas las plantas tratadas, pero en el momento del establecimiento los meristemos de estas vitroplantas, se contaminaron dejándonos sin material procedente de este ensayo.

Las variaciones fenotípicas que se expresaron en estas plantas fueron de tres tipos: coloración, forma y tamaño de la hoja. El tipo de variación fenotípica que presentó el mayor porcentaje de plantas fue “Hojas rayadas” con un 7,28 % que pertenece al grupo de plantas con cambios en su coloración, seguida por “Hojas delgadas” con el 2,48 %, “Hojas rojas” con 1,19 %, “Hojas pequeñas” con 0,67 %, “Hojas redondas” con 0,52 %, “Hojas albinas” con 0,10 %, “Hojas con borde deforme” con 0,10 %, “Hojas con doble color (quimera) con 0,05 %, “Hojas con manchas blancas” con 0,05 %, concordando con los datos obtenidos por García *et al.* (2000) que expone, que el mayor número de variaciones fenotípicas que obtuvo fueron en la coloración de las hojas. Lináreo y Vásquez (1993) citado por Fuchs, Gonzales, Castroni, Diaz, & Castro (2002); también mencionan que entre los cambios que presentan las plantas tratadas con mutagénicos destaca el albinismo que pertenece a cambios en la coloración de las hojas, en estos resultados no destaca el albinismo, pero si se presentó ese tipo de variación.

En lo referente al contenido de clorofila en las hojas, de acuerdo a los datos de la medición final realizada a los 78 días después de la inoculación, arrojaron que el contenido final de clorofila disminuyó en relación a la medición inicial tomada antes de la inoculación de las plantas ya que al verse afectado por el ataque de este patógeno, destruye el tejido fotosintético de las hojas, aumentando la tasa de respiración foliar y reduciendo la conductividad estomática, que contribuye al desplome de la fotosíntesis neta (Fn) y la transpiración foliar (E), como consecuencia, el ataque del patógeno reduce la proporción de

fotoasimilados disponibles para la plantas y por ende el crecimiento y producción de área foliar decaen, por el aumento de la severidad de esta enfermedad (Hidalgo, Tapia, Ridríguez, & Serrano, 2006). Se conoce que la fotosíntesis es la conversión de la energía solar o lumínica en energía química, para transformarlos en compuestos orgánicos asimilables por los organismos autótrofos, es un proceso complejo que incluye el transporte de electrones y el metabolismo fotosintético del carbono. La clorofila es un pigmento esencial en el proceso de la fotosíntesis, ya que absorbe la luz visible en forma de fotones, y esta una vez cargada transporta electrones al aceptor primario de electrones en el fotosistema, proceso que sirve para la síntesis de ATP. Los pigmentos absorben luz de diferentes longitudes de onda y las longitudes de onda que se absorben, desaparecen. Cuando se observa una hoja, se percibe el color verde debido a que la clorofila absorbe luz azul-violeta y roja (Campbell & Reece, 2007). La reflectancia espectral a 675 nm es muy sensible a los cambios en el contenido de clorofila, pero esto limita su uso a solo unas muestras con concentraciones muy bajas de clorofila ($<10\mu\text{g cm}^{-2}$) (Araus *et al.*, 2001) citado por (Reynolds, Pask, Mullan & Chávez, 2012). Sin embargo, la absorción de la clorofila a 550 nm es menor, significando que es menos sensible a los cambios de la clorofila, que no es fácil de saturar y que puede ser usada para estimar contenidos de clorofila en doseles o en hojas a través de un rango, mayor. Existen índices que han sido usados para estimar contenidos de clorofila y carotenoides en otras especies. El medidor de clorofila SPAD-502 es un medidor manual para una sola hoja que mide la clorofila mediante la transmisión de la luz a 650 nm y 940 nm. Las lecturas del SPAD han demostrado estar fuertemente correlacionados con la clorofila extraída de las plantas (Yadava, 1986; Dwyer *et al.*, 1991 citados por Reynolds, Pask, Mullan & Chávez 2012)

El contenido de clorofila en la hoja está estrechamente relacionado con la concentración de N ya que este es necesario para la síntesis de clorofila. Determina el nivel de verdor de las hojas y la eficiencia de los procesos fotosintéticos que se realizan en ellas. Así, plantas adecuadamente fertilizadas con nitrógeno presentan un color más verde en sus hojas, en comparación con aquellas sometidas a una fertilización deficiente. De hecho, la deficiencia de nitrógeno se manifiesta al comienzo, con un amarillamiento de las hojas más viejas (hojas basales), síntoma que puede llegar a ser masivo. Dada esta base fisiológica es posible deducir que, al medir el contenido de clorofila, se puede estimar el contenido de nitrógeno en la planta

y así conocer el estado nutricional del cultivo. Este hecho nos permitiría mejorar este estado nutricional en el caso de que fuese deficiente (Villar *et. al.*, 2003 citado por Pezonaga, 2013).

Las plantas con los promedios ponderados de infección (PPI) más bajos poseen los códigos: “2386” con 0,33 % (120 Gy-IV), “2267” con 0,50 % (60 Gy-III), “909” con 0,67 % (2 %-3H-), “1436” con 0,67 % (1 %-3H-), “439” con 0,83 % (40 Gy-IV), “638” con 0,83 % (60 Gy-IV), que presentaron índices inferiores a 1% lo cual nos indica una tolerancia mayor en relación a los controles y las demás plantas ya que como menciona (Almodóvar & Díaz, 2007), un PPI menor de 2 % indica un bajo índice de daño en plantaciones con un buen manejo, y que el índice de daño será mayor según aumenta el PPI, por lo tanto podemos decir que a menor daño, mayor tolerancia.

6. CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos se concluye:

La DL_{50} óptima de irradiación gamma para meristemos apicales en el cultivar “Williams” se encuentra en el rango de entre 55 a 60 Gy, y la concentración óptima del químico (EMS) en meristemos apicales fue de 0,83 % que representan 120 mg de EMS en la solución mutagénica o 120 uL de EMS en la solución (4,83 mM/L), con un TL_{50} de 5 horas con 42 minutos, y en microcormos fue de 0,38 % que representan 57 mg de EMS, con un TL_{50} de 8 horas con 10 minutos, en la solución mutagénica o 57 uL de EMS en la solución (0,56 mM/L)

Las plantas que presentaron de acuerdo a las evaluaciones la mayor tolerancia a Sigatoka negra, presentando un PPI menor al 1 % pertenecen a los códigos: “2386” con 0,33 % (120 Gy-IV), “2267” con 0,50 % (60 Gy-III), “1436” con 0,67 % (1 %-3H-) y “909” con 0,67 % (2 %-3H-), “439” con 0,83 % (40 Gy-IV), “638” con 0,83 % (60 Gy-IV), “905” con 0,83 % (2 %-3H).

Los resultados indican que en la dosis de 120 Gy la sobrevivencia fue de un 7 % pudiéndose multiplicar los explantes sobrevivientes los cuales respondieron con un buen desarrollo y se regeneraron sin problemas, podemos concluir entonces con que los explantes pueden soportar hasta dicha dosis, pero el porcentaje de sobrevivencia es mínimo, y una vez regenerados recuperan su potencial de crecimiento y desarrollo sembrados en las condiciones apropiadas.

A partir de los 140 Gy la sobrevivencia fue nula, siendo letal también en las dosis superiores a esta, y así se pudo demostrar que a medida que aumentó la dosis de irradiación la mortalidad también aumentaba.

El mayor porcentaje de variaciones fenotípicas que se observó, fueron en las plantas tratadas con el mutagénico químico, en la dosis de 2 %-3H con un número de 56 plantas que conforman el 2,89 % del total de las plantas sobrevivientes, seguida de la dosis de 40 y de 60 Gy con un porcentaje de 1,60 % y 1,60 % respectivamente y un número de 31 plantas en cada una de estas dosis.

El mayor porcentaje de plantas presentes por cada uno de los tipos de variaciones fenotípicas se observaron en el grupo de plantas con cambios en la coloración de las hojas, donde la característica principal fueron rayas blanquecinas (hojas rayadas) con 7,28 %, seguida por las hojas delgadas con 2,48 % en relación del total de las plantas sobrevivientes.

Es evidente que de acuerdo a los datos obtenidos, la mortalidad en el ensayo con los microcormos a los que se les aplicó radiación gamma, fue descartado, ya que no hubo sobrevivencia y solo se trabajó con los meristemas apicales, en los microcormos a los que se les aplicó EMS si hubo sobrevivencia; pero también fue baja, debido a que las condiciones en las que se desarrollaron los meristemas fueron más favorables.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con la investigación en condiciones de campo ya que así se podrá probar si las variaciones fenotípicas se mantienen en estos individuos desarrollados totalmente, y si se mantienen, se podría observar si son heredables, realizando evaluaciones en otros ciclos del cultivo.

Las plantas que presentaron los promedios ponderados de infección (PPI) más bajos deben ser inoculadas en condiciones de campo y evaluar la severidad de la Sigatoka negra en sus hojas bajo estas condiciones, de esta manera se podrían confirmar los datos de tolerancia obtenidos en las evaluaciones en vivero.

Para obtener un mayor número de mutantes funcionales se recomienda seguir probando otros ensayos con dosis en el rango entre 55 y 60 Gy en el caso de radiación gamma y dosis entre 0,5 y 1 % de EMS con tiempos entre 5 y 6 horas en el caso del mutagénico químico ambos mutagénicos trabajando con el explante manejado en condiciones *in vitro* denominado meristemo apical, y es necesario trabajar con un número de plantas manejables para realizar las evaluaciones a nivel de vivero.

La contaminación de los explantes en condiciones *in vitro* por mantener a estos en remojo y así bajar la concentración hormonal, no es recomendable ya que aumenta el porcentaje de contaminación de estos.

Realizar pruebas con vitroplantas enteras sin removerle sus raíces ni su pseudotallo ya que al dañarlas se estresan y los cortes son vías de acceso para cualquier patógeno, ya que el efecto que causan los mutagénicos sumado con los cortes realizados, estresan al microcormo e influyen en el desarrollo del mismo.

Realizar pruebas de citometría celular para verificar si hubo una disminución, aumento o cambio en el ADN del cultivar de banano en estudio.

8. RESUMEN

Existen varias enfermedades que atacan al banano, pero la principal es la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) que es una enfermedad que ataca a las hojas, reduciendo su capacidad fotosintética, bajando de esta manera los rendimientos en las haciendas. Para controlar esta enfermedad se utilizan fungicidas que causan resistencia en esta plaga; además, un gran daño al ambiente y las personas que viven y trabajan en las bananeras. Se han buscado alternativas para controlar esta enfermedad, pero se ha concluido en que el mejoramiento genético es la mejor vía. Convencionalmente llegar a obtener un nuevo genotipo resulta extremadamente difícil en este cultivo, por su esterilidad y partenocarpia, por esta razón es que se ha tomado la alternativa del mejoramiento mediante mutagénesis inducida aplicando mutagénicos físicos y químicos y complementando con la técnica de cultivo de tejidos, para obtener mutantes que presenten resistencia o tolerancia a varias enfermedades.

Para este estudio se utilizaron Rayos Gamma y Ethylmethanesulfonate que son agentes, que han sido utilizados en varios estudios ya que pueden provocar mutaciones, las dosis de radiación aplicadas fueron: 0, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 150, 160, 180, 200, 250, 300, 350 y 500 Gy. Las dosis aplicadas de EMS fueron: 0, 0.5, 1 y 2 % por dos tiempos: 3 y 6 horas. El material vegetal utilizado para este estudio fueron meristemos apicales y microcormos del cultivar Williams (AAA) perteneciente al subgrupo Cavendish, los cuales se manejarían en condiciones *in vitro* y de vivero, respectivamente.

Estos explantes fueron evaluados a los 30 días posteriores a la aplicación de los mutagénicos, para determinar el porcentaje de mortalidad producido por estos agentes, variable que sirvió para la determinación de la DL_{50} , que en el ensayo con rayos gamma, en los meristemos apicales fue de 56,64 Gy en el irradiador de Quito y 58,32 Gy en el irradiador de Aloag. La DL_{50} en los microcormos no se pudo determinar ya que la mortalidad fue total. En el ensayo

con EMS la DL_{50} en meristemos apicales fue de 0,83 % que representan 120 mg de EMS en la solución mutagénica o 120 uL de EMS en la solución 4,83 mM/L y en los microcormos fue de 0,38 % que representan 57 mg de EMS en la solución mutagénica o 57 uL de EMS en la solución (0,56 mM/L). Para la determinación de la dosis letal media se utilizó el método Próbit.

Los explantes sobrevivientes fueron micropropagados en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental del Litoral Sur Dr. Enrique Ampuero Pareja, hasta completar 10000 plantas. De estos solo se aclimataron 1936 a las cuales se les midió el contenido de clorofila de sus hojas antes de ser inoculados con soluciones miceliales de (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) a una concentración de $2,06 \times 10^6$ fragmentos de micelio/mL. Este hongo se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología de la misma estación. Posteriormente fueron evaluadas de acuerdo al método de Stover modificada por Ghaur, donde se evaluó el desarrollo y evolución de pizcas de Sigatoka de acuerdo a la escala de Fouré, para determinar el índice de severidad en cada planta y determinar el Promedio Ponderado de Infección (PPI), que es un indicador de resistencia o tolerancia, las plantas con el PPI más bajo fueron identificadas. También se detectaron las variaciones fenotípicas desarrolladas, donde la dosis de 2 %-3h con 2,89 % presentó el mayor número de variaciones fenotípicas seguida por las dosis de 40 y 100 Gy con 1,60 % de variaciones cada una; se evaluó también el tipo de variación que presentó mayor número de plantas las que fueron: “hojas rayadas” con 7,8 %, seguida por “hojas delgadas” con un 2,48 %; por último a los 78 días a estas plantas se les volvió medir el contenido de clorofila para realizar la comparación con la medición inicial dándonos como resultado una baja de la clorofila en la medición final, la que se presume fue debido a la destrucción del área foliar ocasionado por la Sigatoka negra.

9. SUMMARY

There are several diseases that attack bananas, but the main one is the black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet), which attacks the leaves, reducing their photosynthetic capacity, thus lowering the output on farms. Fungicides to control the disease cause pest resistance, great damage to the environment and also to the people who live and work on banana plantations. To control this disease some alternatives have been sought, although genetic improvement is the best way. Conventionally in this crop, to get a new genotype is extremely difficult because of sterility and parthenocarpy conditions, for this reason, improvement through mutagenesis using physical and chemical mutagens and the tissue culture technique as a complement to get resistant or tolerant mutants to diseases have been used.

As in several studies to cause mutations, Gamma rays and ethylmethanesulfonate have been used, in this case doses 0, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 150, 160, 180, 200, 250, 300, 350 and 500 Gy of radiation were applied. For EMS doses 0, 0.5, 1 and 2% were applied for two times: 3 and 6 hours. The plant material used for this study were apical meristems and microcorms of Williams cultivar (AAA) subgroup Cavendish, which were managed under in vitro conditions and nursery respectively.

These explants were evaluated 30 days after application of mutagens to determine the percent mortality produced by these agents. To determine the median lethal dose probit method was used. Thus the LD₅₀ was determined as 56.64 Gy in the Quito's irradiator and 58.32 Gy in the irradiator of Aloag. The LD₅₀ in microcorms could not be determined because of the total mortality of these plant material. In the assay with EMS, LD₅₀ for apical meristems was 0.83 % that represented 120 mg of EMS in the mutagenic solution or 120 uL of 4.83 mM the EMS / L while in microcorms was 0.38 % representing 57 mg of EMS in the mutagenic or 57 uL solution of EMS in (0.56 mM / L) solution.

To complete 10,000 plants, the survivors explants were micropropagated in the Biotechnology Laboratory of the Experimental Station Dr. Errique Ampuero Pareja of INIAP; nevertheless only 1936 were put in nursery where the chlorophyll content of the leaves were

measured before being inoculated with mycelial solutions (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) of 2.06×10^6 mycelial fragments / mL as concentration. This fungus was developed in the Laboratory of Pathology of the station.

In nursery, the banana plants were evaluated according to the Stover's method modified by Ghaul where the development and evolution of spots of Sigatoka according to the scale of Fouré, was evaluated to determine the severity index in each plant and determine the Weighted Average Infection (PPI), which is an indicator of resistance or tolerance, plants with the lowest PPI were identified. Phenotypic variations were determined, where the dose of 2 % to 2.89 % -3h had the highest number of phenotypic variation followed by doses of 40 Gy and 100 variations with 1.60 % each; furthermore the type of variation presented was analyzed, thus "striped leaves" with 7.8 % and "long slim leaves" with 2.48 %; Finally, 78 days after, the chlorophyll content was measured again for comparison with the initial measurement, where low chlorophyll in the final measurement was revealed, which was presumable due to the destruction of leaf area caused by black Sigatoka.

10. LITERATURA CITADA

- Ali, M. (1997). Optimal dose rate of gamma irradiation and EMS concentration for mutation induction on shoot tip of banana cv. Grand Nain. *Optimal dose rate of gamma irradiation and EMS concentration for mutation induction on shoot tip of banana cv. Grand Nain*, 3. Tissue Culture Laboratory, Agricultural Research Corporation, Wad Medani. Disponible. Obtenido de <http://arcsudan.sd/arc/conferences/meeting38/pdf/pdf16.pdf>
- Almodóvar, W., & Díaz, M. (2007). Identificación y manejo de Sigatoka negra y otras enfermedades de plátano y guineo. 7-9. Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico-Recinto de Mayagüez. Recuperado el 5 de Enero de 2012, de http://academic.uprm.edu/walmodovar/HTMLobj276/Manual_ID_y_MIP_de_SN_y_Enferm_Plát_y_Guineo.pdf
- Almodóvar, W., & Díaz, M. (2007). Identificación y manejo de Sigatoka negra y otras enfermedades de plátano y guineo. 16-17. Recinto de Mayagüez., Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico. Recuperado el 5 de Enero de 2012, de http://academic.uprm.edu/walmodovar/HTMLobj276/Manual_ID_y_MIP_de_SN_y_Enferm_Plát_y_Guineo.pdf
- Angarita, A., & Perea, M. (1984). Micropropagación de plátanos y bananos. *Micropropagación de plátanos y bananos*, 499. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Departamento de Biología.
- Angarita, A., & Perea, M. (1993). Capítulo 22: Micropropagación de plátanos y bananos. En W. M. Roca, & L. A. Mroginski, *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones* (pág. 498). Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Bermúdez, I., Leiva, M., Alvarado, Y., García, L. R., Veitía, N., & Acosta, M. (Enero - Marzo de 2007). Evaluación en casa de cultivo de cinco mutantes de porte bajo del híbrido de plátano 'FHIA-21' (Musa AAAB) mediante la inoculación artificial de *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología Vegetal*, 7(1), 15.
- Bornacelly, H. D. (2009). Estudio del ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis* en tres clones de banano (Musa AAA) en tres regiones de la zona bananera del Magdalena. En H. D. Bornacelly, *Estudio del ciclo de vida de Mycosphaerella fijiensis en tres clones de banano (Musa AAA) en tres regiones de la zona bananera del Magdalena* (págs. 18-22.). Palmira, Colombia.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. (U. N. (UNAM), Ed.) *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 3. Obtenido de http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf. p3.

- Campbell, N., & Reece, J. (2007). Biología. En N. A. Campbell, & J. B. Reece, *Biología* (págs. 181-189). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, S.A. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=QcU0yde9PtkC&pg=PA184&dq=fotosintesis&hl=es&sa=X&ei=-xyjVd-cCcXkoASZshw&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=fotosintesis&f=false>
- Carey, J. (2011). Genética médica. En J. Carey, *Genética médica* (págs. 33-37). Barcelona: Elsevier España, S. L. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=_j-nB4wq7VQC&pg=PA37&dq=tipos+de+mutagenos+y+como+causan+mutaciones&hl=es&sa=X&ei=ZW-VVYuDGYKFyQSGuIKwAQ&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=tipos%20de%20mutagenos%20y%20como%20causan%20mutaciones&f=false
- Carey, J. (2011). Genética médica. En J. Carey, *Genética médica* (pág. 37). Barcelona: Elsevier España, S. L. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=_j-nB4wq7VQC&pg=PA37&dq=tipos+de+mutagenos+y+como+causan+mutaciones&hl=es&sa=X&ei=ZW-VVYuDGYKFyQSGuIKwAQ&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=tipos%20de%20mutagenos%20y%20como%20causan%20mutaciones&f=false
- Cedeño, G. (2010). Evaluación del comportamiento de doce cultivares de musa spp, inoculados con *Mycosphaerella fijiensis* morelet. Agente causal de la sigatoka negra. *Evaluación del comportamiento de doce cultivares de musa spp, inoculados con Mycosphaerella fijiensis morelet. Agente causal de la sigatoka negra.* . Manabí, Ecuador: Universidad Técnica de Manabí.
- Chai, M., Ho, Y., Liew, K., & Asif, J. (s.f.). Biotechnology and in vitro mutagenesis for banana improvement. *Biotechnology and in vitro mutagenesis for banana improvement.* Malaya: University of Malaya. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/007/ae216e/ae216e08.htm#TopOfPage>
- Cubero, J. (2002). Inducción a la mejora genética vegetal. En J. I. Cubero, *Inducción a la mejora genética vegetal.* (2da ed., pág. 598). Córdoba. ES.: Mundi-Prensa Libros, S.A.
- De la Rosa, M., & Ruiz, A. (sf). Capítulo 6: Mutagénesis y carcinogénesis ambiental. En M. E. De la Rosa, & A. L. Ruiz, *Capítulo 6: Mutagénesis y carcinogénesis ambiental* (pág. 82). México, D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México. (UNAM).
- Florio, S., De Real, L., & Mogollón, N. (2010). Regeneración in vitro de plátano cv. “Hartón gigante” (Musa AAB). *44*(4), 437.
- Fouré, E. (1994). *Leaf spot disease of banana and plantain caused by Mycosphaerella fijiensis and Mycosphaerella musicola.* In: *The improvement and testing of Musa: A global*

- partnership*. Proceedings of the first global conference of the international testing muse. Programme (D. Jones, ed) . Montpellier: INIBAP.
- Frankel, E. (2003). DNA el proceso de la vida. En E. Frankel, *DNA el proceso de la vida* (págs. 85-88). México: Siglo XXI editores, S. A. de C. V. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=jRJlzwU150IC&pg=PA88&dq=mutaciones+naturales&hl=es&sa=X&ei=eM-UVcanBsKqNsO1grAL&ved=0CDYQ6AEwBQ#v=onepage&q=mutaciones%20naturales&f=false>
- Fuchs, M., Gonzales, V., Castroni, S., Diaz, E., & Castro, L. (2002). Efecto de la radiación gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. *Efecto de la radiación gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos*. Maracay, Venezuela.: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA).
- Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. (sf.). www.fhia.org.hn. Recuperado el 18 de Noviembre de 2012., de www.fhia.org.hn: www.fhia.org.hn/htdocs/banano_y_platano.html
- García, L., Bermúdez , I., Orellana, P., Veitía, N., García, L., Clavero, J., & Romero , C. (2000). Inducción de mutaciones por radiaciones Gamma en el cultivo in vitro de brotes del cultivar Gran Enano (AAA). *Biotecnología vegetal*, 4. Recuperado el 5 de Septiembre de 2011, de <http://www.forum.villaclara.cu/UserFiles/forum/Ponencias>
- García, L., Bermúdez, I., Orellana, P., Veitía, N., García, L., Clavero, J., & Romero, C. (2000). Inducción de mutaciones por radiaciones Gamma en el cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*(1), 46-48.
- Hidalgo, M., Tapia, A., Ridríguez, W., & Serrano, E. (2006). Efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar de banano (*Musa* sp. AAA, cv. Valery). *Agronomía Costarricense*, 30(1), 39. Obtenido de www.mag.go.cr/rev_agr/inicio.htm
- INIA. (2005). Capítulo 3: Estadios del Cultivo de Tejidos. En H. Prieto, M. Jordan, L. P. Barrueto, M. J. Cordeiro, & D. Durzan, *Biotecnología Vegetal* (pág. 60). Santiago: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA.
- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. (2012). La raza tropical 4 del Mal de Panamá: amenaza potencial para la industria bananera y platanera del Ecuador. *La raza tropical 4 del Mal de Panamá: amenaza potencial para la industria bananera y platanera del Ecuador*.(418), 4-5. Quevedo, Los Ríos, Ecuador: INIAP.

- Jadán, M., Debut, A., & Niveló, K. (sf). EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA RADIACIÓN GAMMA COBALTO 60. Ecuador: DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7925/1/AC-B-ESPE-047650.pdf>
- Krikorian, A. (1993). Capítulo 5: Propagación Clonal in vitro. En W. Roca, & L. Mroginski, *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones* (pág. 102). Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. En E. V. Levitus Gabriela., *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (pág. 12). Argentina: Argen-Bio-Ediciones INTA.
- López, J., Strosse, H., De la C. Ventura, J., Sánchez, R., Rodríguez, S., Swennen, R., . . . Afza, R. (s.f.). Banana Improvement. *Field evaluation of potential mutants obtained after gamma irradiation of banana and plantain (Musa spp.) Shoot-tip and embryogenic cell cultures*. Villa Clara, Cuba: F.A.O.
- Manzo, G., Guzmán, S., Rodríguez, C. M., James, A., & Orozco, M. (2005). Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 88.
- Manzo, G., Guzmán, S., Rodríguez, C. M., James, A., & Orozco, M. (2005). Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 88-89.
- Marín, D. H., Romero, R. A., Guzmán, M., & Sutton , T. B. (2003). Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *The American Phytopathological Society: Plant Disease*, 87(3), 209. Obtenido de http://www.academia.edu/12453049/Black_Sigatoka_An_Increasing_Threat_to_Banana_Cultivation
- Marín, D. H., Romero, R. A., Guzmán, M., & Sutton , T. B. (2003). Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *The American Phytopathological Society: Plant Disease*, 87(3), 209. Obtenido de http://www.academia.edu/12453049/Black_Sigatoka_An_Increasing_Threat_to_Banana_Cultivation
- Martillo, E., & Solano, P. (2003). Situación de la Sigatoka negra en el Ecuador. En G. Rivas, & F. Rosales, *Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nemátodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos* (pág. 13). Guayaquil: INIBAP.

- Maura, L. F. (2007). Manejo alternativo de Sigatoka negra, utilizando biofertilizantes, en plantaciones comerciales de banano Cavendish, variedad Williams, cantón Taura. En L. F. Pazmiño, *Manejo alternativo de Sigatoka negra, utilizando biofertilizantes, en plantaciones comerciales de banano Cavendish, variedad Williams, cantón Taura*. (págs. 20-21). Ecuador: Escuela Superior Politecnica del Litoral.
- Morales, F. (2012). Estimación de la concentración y tiempo letal del nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) para el control de *Cosmopilites sordidus* (Coleóptera: Curculionidae). *Estimación de la concentración y tiempo letal del nemátodo entomopatógeno Heterorhabditis bacteriophora (Nematoda: Heterorhabditidae) para el control de Cosmopilites sordidus (Coleóptera: Curculionidae)*. Zamorano, Honduras: Escuela Agrícola Panamericana. Obtenido de <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1236/1/T3404.pdf>
- Ortega, N. (2010). Obtención de Multimeristemas y Callos de diferentes variedades de Banano y Plátano (*Musa spp.*) a partir de 'Meristemas Apicales' y 'Scalps'. *Obtención de Multimeristemas y Callos de diferentes variedades de Banano y Plátano (Musa spp.) a partir de 'Meristemas Apicales' y 'Scalps'*. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica Del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/.../ORTEGA%20PEREZ%20NATHALI...>
- Ortiz, R., López, A., Ponchner, S., & Segura, A. (2007). El cultivo del banano. En R. Ortiz V, A. López M, S. Ponchner G, & A. Segura M, *El cultivo del banano* (págs. 158-159). San José, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- Perea, M. (1992). Sistemas "in vitro", un complemento en el mejoramiento de las Musaceas. *Revista Académica Colombia Ciencia*, 17(70), 326. Obtenido de http://www.accefyn.org.co/revista/Volumen_18/70/324-331.pdf
- Pezonaga, S. (2013). UTILIDAD DEL MEDIDOR DE CLOROFILAS (SPAD-502®) EN LOS PROGRAMAS DE FERTILIZACIÓN NITROGENADA DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN REGADÍO. *PROGRAMAS DE FERTILIZACIÓN NITROGENADA DE TRIGO (Triticum aestivum L.) EN REGADÍO*. Navarra: Universidad Pública de Navarra. Obtenido de <http://academica-e.unavarra.es/bitstream/handle/2454/8785/578157.pdf?sequence=1>
- Pico, J. T., & Guadamud, N. A. (2004). Manejo de los principales problemas fitosanitarios en el cultivo del plátano. Universidad Técnica de Manabí. Facultad de Ingeniería Agronómica. *Manejo de los principales problemas fitosanitarios en el cultivo del plátano. Universidad Técnica de Manabí. Facultad de Ingeniería Agronómica.*, 7. Manabí, Manabí, Ecuador: Universidad Técnica de Manabí.

- Pierce, B. (2010). *Genética: Un enfoque conceptual*. En B. Pierce, *Genética: Un enfoque conceptual* (pág. 472). Madrid: Médica Panamericana S. A. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=ALR9bgLtFhYC&printsec=frontcover&dq=%22Gen%C3%A9tica%22.+Ed.+Revert%C3%A9+S.A.+1982.&hl=es&sa=X&ei=MlyUVZGqKMulNry0kqAI&ved=0CC8Q6AEwAzgU#v=onepage&q&f=false>
- PRO ECUADOR. (2013). *Análisis del Sector Banano*. Instituto de Promoción de Exportaciones e inversiones, Dirección de inteligencia Comercial e Inversiones, Ecuador. Obtenido de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/09/PROEC_AS2013_BANANO.pdf
- PRO ECUADOR. (2013). *Análisis del Sector Banano*. Instituto de Promoción de Exportaciones e inversiones, Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, Ecuador. Obtenido de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/09/PROEC_AS2013_BANANO.pdf
- PRO ECUADOR. (2013). *Análisis del Sector Banano*. Instituto de Inteligencia Comercial e Inversiones, Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, Ecuador. Obtenido de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/09/PROEC_AS2013_BANANO.pdf
- Randhawa, M. A. (2009). Calculation of LD50 values from the method of miller. *J Ayub Med coll Abbottabad*, 184-185.
- Rekha, A., Ravishankar, K. V., Anand, L., & Hiremath, S. (2001). Diversidad genética y genómica en banano (especies y cultivares de musa) basada en el análisis D2 y marcadores RAPD. *INFOMUSA*, 10(2), 29.
- Reyes, W. (2007). *Gamma Rays and Carbon Ion-Beams Irradiation for Mutation Induction to Breed Banana (Musa spp.), Especially on Response to Black Sigatoka Disease. Gamma Rays and Carbon Ion-Beams Irradiation for Mutation Induction to Breed Banana (Musa spp.), Especially on Response to Black Sigatoka Disease.*, 37. Tsukuba, Japón: Universidad de Tsukuba.
- Reynolds, M. P., Pask, J. D., Mullan, D. M., & Chávez, P. N. (2012). Fitomejoramiento fisiológico I: Enfoques Interdisciplinarios para mejorar la adaptación del cultivo. En M. P. Reynolds, J. D. Pask, D. M. Mullan, P. N. Chávez, M. P. Reynolds, J. D. Pask, D. M. Mullan, & P. N. Chávez (Edits.), *Fitomejoramiento fisiológico I: Enfoques Interdisciplinarios para mejorar la adaptación del cultivo*. México D. F.: CIMMYT. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=FgWhMhLxhzoC&pg=PA76&lpg=PA76&dq=como+medir+el+contenido+de+clorofila+en+las+hojas&source=bl&ots=0SAartz0->

A&sig=YfMplrN6nEFzbbpfYi7E7LDTnT8&hl=es&sa=X&ei=XKuiVcP3CpHaoAS117dY&ved=0CEQQ6AEwBjgK#v=onepage&q=como%20medir%

- Robinson, J. C., & Galán, V. (2011). Plátanos y bananos. En J. C. Robinson, & V. Galán, *Plátanos y bananos* (2da ed., pág. 237). España: Ediciones Mundi Prensa. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=mAv3EQAcgZ8C&pg=PA318&dq=Soto+B,+M.+1985.+BANANOS:+Cultivo+y+comercialización.&hl=en&sa=X&ei=oZ7oVN-1B8GLgwTlnIT4DQ&ved=0CEgQ6AEwBg#v=onepage&q=Soto%20B%2C%20M.%201985.%20BANANOS%3A%20Cultivo%20y%20comercializaci%C3%B3>
- Rodríguez, J. (2000). Estimación de la variación somaclonal y la inducida por rayos gamma en banano (*Musa spp.*). Determinación de índices para el proceso de selección. *Estimación de la variación somaclonal y la inducida por rayos gamma en banano (Musa spp.). Determinación de índices para el proceso de selección*, 6-7. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Subdirección de estudios de postgrado. Obtenido de <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080110328.PDF>
- Rodríguez, J. (2000). Estimación de la variación somaclonal y la inducida por rayos gamma en banano (*Musa spp.*). Determinación de índices para el proceso de selección. *Estimación de la variación somaclonal y la inducida por rayos gamma en banano (Musa spp.). Determinación de índices para el proceso de selección.*, 75. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Subdirección de estudios de postgrado. Obtenido de <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080110328.PDF>
- Román, M., González, C., Xiqués, X., Cazañas, J., & Alonso, M. (s.f.). Estudio de la variabilidad en clones triploides de plátano fruta (*Musa spp.*). *Estudio de la variabilidad en clones triploides de plátano fruta (Musa spp)*. Santo Domingo, Villa Clara, Cuba: F.A.O. Obtenido de <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1049/cuf0105s.pdf>
- Roux, N. (s.f.). *Mutation induction in Musa - review*. Austria: Plant Breeding Unit - FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/007/ae216e/ae216e09.htm#TopOfPage>
- Roux, N., Tolaza, A., Busogoro, J. P., Panis, B., Strosse, H., Lepoivre, P., . . . Zapata, F. J. (2003). Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance *Mycosphaerella* leaf spot diseases. En L. Jácome, P. Lepoivre, D. Marín, R. Ortiz, R. Romero, & J. Escalant, *Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the Workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases held* (pág. 240). San José: International Plant Genetic Resources Institute.

- Sánchez, S., Ramírez, E., & Barbosa, O. (2007). El estrés impuesto por los rayos gamma, peróxido de hidrógeno y calor es amortiguado por cambios en la expresión y localización de la HSP70 en células Hela. (*redalyc*) *Red de Revistas Científicas de America Latina y el Caribe, España y Portugal*, 3.
- Sandoval, J. (1999). Micropropagación de Plátano Y Banano (musa Aab, Aaa) en El Catie. *Micropropagación de Plátano Y Banano (musa Aab, Aaa) en El Catie*, 7. Costa Rica: CATIE. Obtenido de <http://books.google.com.ec/books?id=EiEOAQAIAAJ&pg=PA18&lpg=PA18&dq=sandoval,1986+micropropagacion+de+musaceas&source=bl&ots=zqi9nmO-8J&sig=f-pyieMHQMeeZMLjP8lx5LORdB4&hl=es&sa=X&ei=x5FsVO6TMMuhNqerg4AI&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=sandoval%2C1986%20micro>
- Sierra, L. E. (1993). El cultivo de banano: Producción y comercio. En L. E. Sierra, *El cultivo de banano: Producción y comercio*. (pág. 31). Medellín, Colombia.
- Silva, A. (2003). Bases para el Manejo Racional de Insecticidas. *Bases para el Manejo Racional de Insecticidas*. ., 310. Chillán, Chile: Universidad de Concepción/Facultad de Agronomía. Fundación para la Innovación Agraria (FIA). Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/64648821/DL50#scribd>
- Soto, M. (1985). BANANOS: Cultivo y comercialización. En M. Soto, *BANANOS: Cultivo y comercialización* (pág. 21).
- Suárez, E. (30 - 10 de Octubre - Noviembre de 2006). Primer curso de capacitación en mejoramiento genético del arroz. *Mejoramiento genético mediante inducción de mutaciones*, 2. Bauta, La Habana, Cuba: Sanoti Espiritu. Recuperado el 20 de Octubre de 2012, de [http://www.agr.unne.edu.ar/.../Mejoramiento y mutaciones](http://www.agr.unne.edu.ar/.../Mejoramiento_y_mutaciones).
- Suárez, E. (30 - 10 de Octubre - Noviembre de 2006). Primer curso de capacitación en mejoramiento genético del arroz. *Mejoramiento genético mediante inducción de mutaciones*, 2-3. Bauta, La Habana, Cuba: Sanoti Espiritu. Recuperado el 20 de Octubre de 2012, de [http://www.agr.unne.edu.ar/.../Mejoramiento y mutaciones](http://www.agr.unne.edu.ar/.../Mejoramiento_y_mutaciones).
- Valdez, A., Orellana, P., Veitia, N., & Torres, D. (2004). Crecimiento, regeneración y radiosensibilidad de callos de cana de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. "SP 70-1284") tratados con radiación gamma fuente ⁶⁰Co. *Biotecnología Vegetal*, 165-169.
- Villalobos, V., & Thorpe, T. (1993). Capítulo 6: Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En M. Roca, & L. Mroginski, *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones* (pág. 128). Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

11. ANEXOS

Anexo 1. Lista de reactivos, materiales y equipos

Reactivos	Materiales
Nitrato de amonio NH_4NO_3	Guantes de látex
Nitrato de Potasio KNO_3	Mascarillas
Potasio dihidrógeno fosfato KH_2PO_4	Hojas de bisturí N° 11 rz 10922-05
Fosfato de potasio monobásico	Mango para bisturí hoja N° 11 rz 10922-05
Ácido bórico H_3BO_3	Tarrinas transparentes con tapa 500 ml.
Sulfato de Manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Tarrinas transparentes con tapa 250 ml.
Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Tarrinas transparentes con tapa 125 ml.
EthylMetanosulfonate	Vasos transparentes de plástico con tapa de 250 ml
Sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Erlenmeyer Flask 125 ml GLASSCO
Sulfato de magnésio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Erlenmeyer Flask 250 ml GLASSCO
Yoduro de potasio KI	Pipetas
Acido Nicotínico	Vasos de precipitación
Cloruro de cobalto	Probetas
Ácido molíbdico	Fundas autoclavables
Glicina	Pinzas
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	Papel aluminio
$\text{Fe}_3\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Cajas Petri
Biotina	Strech film
Caseína Hidrolizada	Parafilm
Sucrosa	Desinfectantes
Ácido indol 3 acético	Papel Toalla
6-Bencilaminopurina	
Gellam gum	Equipos
Adenine sulfate	Shaker
Tetraciclina Hydrochloride	Platos calentadores
L-Cysteina	pH metro
Myoinositol	Cámara de flujo laminar
alcohol etanol 98% y 70%	Autoclave
Cloro 10%	Irradiador
Thiamina	Balanza analítica
Arginina	Estufa
Ácido Ascórbico	Congelador
6-Furfurilaminopurina	
Piridoxina	

Anexo 2. Lista de reactivos para la preparación de las soluciones Stock o madres para la preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).

Constituyentes	Concentración de la solución madre	Volúmen de la solución madre por litro de medio
Macros		
Nitrato de potasio	76 g/L	25 ml
Nitrato de amonio	66.5 g/L	
Fosfato de potasio monobásico	6.8 g/L	
Sulfato de magnesio heptahidratado	14.8 g/L	
Micros		
Sulfato de manganeso monohidratado	16.9 g/L	1 ml
Ácido bórico	6.2 g/L	
Sulfato de cobre	0.5 g/L	
Sulfato de zinc	10.5 g/L	
Ácido molíbdico	0.5 g/L	
Cloruro de cobalto	0.05 g/L	
Hierro		
Sulfato ferroso	2.78 g/L	10 ml
EDTA disodium salt	3.74 g/L	
CALCIO		
Cloruro de calcio	17.6 g/L	2,9 ml
Yoduro		
Yoduro de potasio	0.8 g/L	1 ml
Vitaminas		
Acido nicotínico	50 mg/L	10 ml
Piridoxina	50 mg/L	
Thiamina	100 mg/L	
Glicina	200 mg/L	
Arginina	1.25 mg/L	
Biotina	170 mg/L	
AIA		
Ácido Indol Acético	1 g/L	Varía de acuerdo al medio
KIN		
6-Furfurilaminopurina	1 g/L	Varía de acuerdo al medio
BAP		
Bencilaminopurina	1 g/L	Varía de acuerdo al medio

Anexo 3. Lista de soluciones Stock y cantidades para la preparación de 1L de medio de cultivo MS, para utilizar en diferentes etapas de crecimiento del explante.

Stock	Iniciación	Multipliación	Enraizamiento
1. Macronutrientes	25 ml	25 ml	25 ml
2. Micronutrientes	1 ml	1 ml	1 ml
3. Hierro	10 ml	10 ml	10 ml
4. Calcio	2,9 ml	2,9 ml	2,9 ml
5. Yoduro	1 ml	1 ml	1 ml
6. Vitaminas	10 ml	10 ml	10 ml
7. AIA	1 ml	...	5 ml
8. KIN	1 ml
9. BAP	1 ml	5 ml	...
10. 2-4-D
11. Myo-Inositol	100 mg	100 mg	100 mg
12. Ácido Ascórbico	50 mg	50 mg	50 mg
13. Sacarosa	30 g	30 g	30 g
14. Gellam Gum	2 g	2 g	2 g
15. Carbón activado	200 mg
16. pH	5,6 – 5,8	5,6 – 5,8	5,6 – 5,8

Anexo 4. Dosis y tiempos de aplicación de radiación gamma en explantes (Irradiador Politécnica Nacional, Quito)

Dosis (Gy)	Tiempo (minutos)		Tasa de Dosis (Gy/h)	
	Distancia		Tasa a 40 cm	Tasa a 50 cm
	40cm	50 cm	169,32	116,01
20	7,08	10,34		
40	14,17	20,68		
50	17,72	25,86		
60	21,26	31,03		
70	24,8	36,2		
80	28,35	41,37		
100	35,44	51,72		
120	42,52	62,05		
140	49,61	72,39		
150	53,15	77,58		
160	56,7	82,73		
180	63,79	93,07		
200	70,87	103,44		
250	88,59	129,3		
300	106,31	155,16		
350	124,03	181,02		
400	141,74	206,88		
450	159,46	232,74		
500	177,18	285,6		

Tiempo de exposición

Distancia al centro

Dosis de irradiación

Se explican las dosis aplicadas en las irradiaciones hechas en la unidad de irradiación de la Politécnica Nacional de Quito, donde los explantes fueron ubicados a diferentes distancias y dependiendo de la distancia se determinan los tiempos de exposición.

Anexo 5. Dosis y tiempos de aplicación de radiación gamma en explantes (Irradiador Aloag)

Tiempo de irradiación en meristemas apicales de banano.				
Dosis (Gy)	Repeticiones			Minutos
	I	II	III	
0	10	10	10	0
20	10	10	10	2.79
40	10	10	10	5.58
60	10	10	10	8.37
80	10	10	10	11.16
100	10	10	10	13.94
120	10	10	10	16.73
140	10	10	10	19.52
160	10	10	10	22.31
180	10	10	10	25.1
Subtotal	100	100	100	

Tiempo de irradiación en microcormos de banano				
Dosis (Gy)	Repeticiones			Minutos
	I	II	III	
0	50	50	50	0
20	50	50	50	2.79
40	50	50	50	5.58
60	50	50	50	8.37
80	50	50	50	11.16
100	50	50	50	13.94
120	50	50	50	16.73
140	50	50	50	19.52
160	50	50	50	22.31
180	50	50	50	25.1
Subtotal	500	500	500	

Se explican las dosis aplicadas en la irradiación hecha en Aloag, donde la dosis depende de los tiempos de radiación a la que se expusieron los explantes.

Anexo 6. Cuadro de transformación de porcentajes de mortalidad a Próbit

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

Anexo 7. Protocolo para la obtención de colonias de Sigatoka negra.

Protocolo de aislamiento y multiplicación de ascosporas de (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet.), para formación de colonias y desarrollo del inóculo.

Estas actividades se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Litoral Sur, Dr. Enrique Ampuero Pareja del INIAP y en haciendas de la localidad.

Colecta de muestras foliares para el aislamiento del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet.

El protocolo utilizado fue el de Stover 1976, citado por Cedeño (2010), las muestras se tomaron en diferentes zonas, se seleccionaron hojas enfermas en estadio 6 en la escala de Fouré, y se cortaron las partes más afectadas, para luego trasladarlas al Laboratorio de Fitopatología para realizar el aislamiento del hongo. Se empezó limpiando con papel toalla el exceso de polvo de las muestras, luego se cortaron en trozos pequeños rectangulares las partes con mayor cantidad de peritecios que es donde se almacenan las ascosporas. Estas muestras se sometieron al proceso de cámara húmeda, para ello; se remojó el papel toalla con agua destilada y se lo colocó en el fondo de la funda (en una de las puntas) luego, se guardaron dentro de esta dejando una cámara de aire y se la selló. Estas muestras se mantuvieron durante 48 horas a temperatura ambiente para la maduración de los peritecios.

Preparación del medio agar agua.

Se pesaron 30 g de Agar-Bacto (Gelose Bacto) en una caja Petri. Esto se vertió en agua destilada (1000 mL) dentro de un recipiente metálico el cual se sometió al fuego hasta que el agar se disolvió por completo. Después se dispensó el agar (1000 mL) dividiendo el volumen total en 4 matraces Erlenmeyer (250 mL c/u), para esterilizados en el autoclave a 121°C por 30 minutos. Posteriormente, se dispensó el medio en cajas Petri estériles, dentro de una cámara de flujo laminar, para evitar cualquier riesgo de contaminación, utilizando como ayuda el mechero de alcohol.

Proceso de descarga de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet.

Luego del proceso de cámara húmeda, los trozos cortados fueron grapados en rectángulos de cartulina con dimensiones de 10 cm de largo y 8 cm de ancho, para luego sumergirlos dentro de un recipiente (vaso de precipitación) con agua destilada durante 5 minutos, de ahí se los retiró y se los dejó escurrir bien. Finalmente, se los ubicó de manera rápida entre la base de la caja Petri y su tapa, dejándolos sostenidos entre ambos, de manera que la muestra de hoja quede mirando hacia el agar agua para que se descarguen las ascosporas sobre este, el proceso de descarga fue de 2 horas.

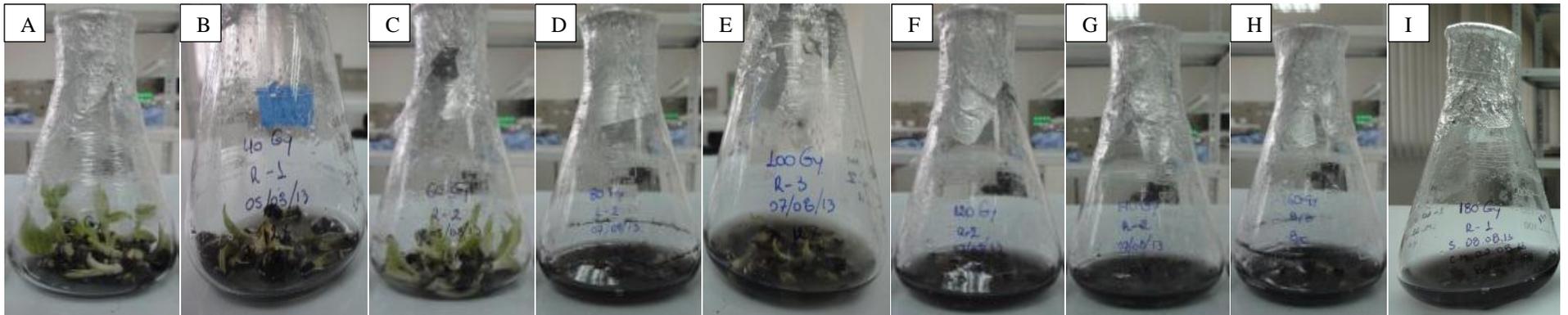
Observación de ascosporas en el medio agar agua y aislamiento de las mismas.

Una vez que se completaron las dos horas, se procedió a la observación del agar-agua dentro de las cajas Petri, para poder realizar el aislamiento de las ascosporas usando un asa esterilizada, esta actividad se realizó dentro de una cámara de flujo laminar utilizando para la observación un microscopio, cuando se logró detectar una ascospora se la capturó con el asa y se la inoculó en el agar PDA, esto para el desarrollo de las colonias, manteniéndolas en incubación a 26 °C por 20 días, en condiciones de total oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo, las colonias visibles se transfirieron a un Erlenmeyer de un litro de capacidad, conteniendo 300 mL de medio líquido V8 y se mantuvo a 28 °C en un agitador (130 rpm) por 15 días. Luego de este periodo, se observó la formación de colonias en formas de pequeñas esferas algodonosas de color gris oscuro que se separaron del medio líquido mediante filtración a través de cuatro capas de gazas estériles.

Preparación del agar PDA (potato dextrose agar).

Para la preparación de este medio, se utilizó el mismo procedimiento que se usó para la preparación del agar agua, pero se sustituyó el agar agua por Difco™ Potato Dextrose Agar 39 g/L de agua destilada. Al momento de la dispensación se aplicó una gota de ácido láctico por caja Petri para mantener el medio desinfectado.

Anexo 8. Evaluación de los meristemas apicales a los 15 de días posteriores a la irradiación, donde se puede observar la diferencia en el desarrollo a medida que la dosis aumenta.- A. 20 Gy; B. 40 Gy; C. 60 Gy; D. 80 Gy; E. 100 Gy; F. 120 Gy; G. 140 Gy; H. 160 Gy; I. 180 Gy



Anexo 9. Evaluación de los meristemas apicales a los 30 de días posteriores a la irradiación, donde se puede observar la diferencia en el desarrollo a medida que la dosis aumenta.- A. 20 Gy; B. 40 Gy; C. 60 Gy; D. 80 Gy; E. 100 Gy; F. 120 Gy; G. 140 Gy; H. 160 Gy; I. 180 Gy

