



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

INSTITUTO DE CIENCIAS MATEMÁTICAS

AUDITORIA Y CONTROL DE GESTION

**“AUDITORÍA Y CONTROL DE CALIDAD
DE LOS PROCESOS DE BIOFABRICACIÓN DE
PLANTACIONES”**

TESIS DE GRADO

**Previa a la obtención del Título de:
AUDITORA EN CONTROL DE GESTION**

Presentada por:

PAOLA PATRICIA CRUZ TENECELA

GUAYAQUIL – ECUADOR

**AÑO
2005**

AGRADECIMIENTO

A Dios, ser supremo y todopoderoso por permitirme llegar a terminar mi carrera universitaria.

A mis padres, que con sus consejos y dedicación despertaron en mí el compromiso de culminar mis metas.

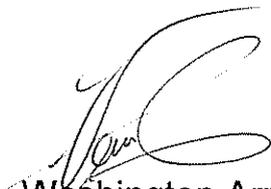
Al personal docente del ICM quienes me dieron la formación académica y profesional, en especial a mi director de tesis, el Ing. Jorge Fernández quien siempre estuvo brindándome su guía.

A mis amigos que en todo momento me dieron su apoyo incondicional, incentivándome a seguir adelante.

DEDICATORIA

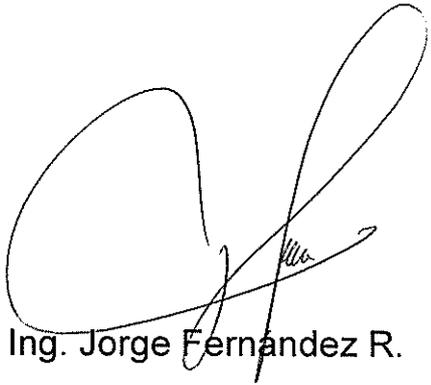
Dedico este trabajo
A mis padres.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ing. Washington Armas

PRESIDENTE



Ing. Jorge Fernández R.

DIRECTOR DE TESIS



Ing. Soraya Solís

VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta tesis de grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de graduación del la ESPOL)


Paola Cruz Tenecela

RESUMEN

El presente trabajo contiene la evaluación de los procesos de una Biofábrica, para ello se presenta en el primer capítulo varios conceptos que antes de auditar una Biofábrica se deben de considerar para poder dar un dictamen correcto.

En su segundo capítulo se procede a revisar la situación internacional de la biotecnología, gracias a la herramienta del Internet que permite recorrer virtualmente lugares en los que se lleva este tipo de estrategias para desarrollar masivamente plántulas de banano, las cuales garantizarán a los agricultores plantaciones de alta calidad genética y fitosanitaria.

En el tercer capítulo, se detalla el diagnóstico realizado a una Biofábrica en el Ecuador, y se describe los procesos que emplean desde que ingresa la semilla donante hasta la entrega de la plántula al cliente.

Con toda la información obtenida hasta el momento se procederá a realizar en el cuarto capítulo un modelo óptimo de una Biofábrica, en la que se establecerán los parámetros idóneos que permitirán utilizar eficientemente los recursos.

El quinto capítulo presenta los hallazgos, causas y efectos que se encontraron al comparar la Biofábrica auditada con el modelo elaborado, y finalmente en el sexto capítulo un conjunto de conclusiones y recomendaciones para el fortalecimiento de este tipo de Biofábricas en nuestro país.

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	I
ÍNDICE GENERAL.....	II
ABREVIATURAS.....	IX
INDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPITULO 1

1. CONCEPTOS

Células	04
Genética	06
Manipulación Genética.....	07
Biotecnología	07
Usos de la Biotecnología.....	08
Propagación	10
Cultivo in vitro	10

Micro propagación.....	12
Meristemo.....	13
Colino.....	14
Variación Somaclonal.....	14
Biofábrica.....	14

CAPITULO2

2. ANALISIS DE BIOFABRICAS EN ECUADOR Y EL MUNDO

Investigación abierta en Internet.....	16
Potencial de las Biofábricas.....	16
Importancia tecnológica.....	17
Importancia Económica.....	20
Especies en las que se recomienda la tecnología de propagación in vitro.....	21
Banano in vitro.....	22
Ventajas del Banano in Vitro.....	24
Desventajas del Banano in Vitro	27
Consulta a expertos.	29
Cultivo de Meristemas.....	29

Asepsia.....	34
Aspecto económico del Banano in Vitro en el Ecuador	37
Información Literaria	41
Establecimiento de una Biofábrica.....	41
Sub – área de Preparación.....	43
Sub – área de Lavado y Esterilización.....	44
Sub – área de Transferencia.....	45
Sub – área de Incubación.....	48
Sub – área de Observación y Examen.....	49
Área de crecimiento.....	50
Área de Cuarentena.....	52
Área de Control Fitosanitario.....	52
Área de Oficina.....	55

CAPITULO 3

3. DIAGNOSTICO DE UNA BIOFABRICA DE PLANTAS EN LA CIUDAD DE GUAYAQUIL

Levantamiento de Información.....	56
--	-----------

Antecedentes de la Biofábrica.....	56
Instalaciones de la Biofábrica.....	57
Productos que elabora.....	58
Descripción de los parámetros utilizados.....	60
Técnica.....	60
Características del agua.....	60
Lavado de Cristalería.....	61
Esterilización.....	64
Sustrato.....	65
Descripción de los procesos realizados.....	68
Selección y recolección del material vegetal.....	68
Cuarentena.....	70
Laboratorio.....	71
Preparación de Soluciones Madres.....	71
Preparación de Medios de Cultivo.....	72
Introducción.....	75
Establecimiento del explante.....	77
Propagación.....	77
Enraizamiento.....	77
Lavado de Plantas.....	79

Cultivo Protegido.....	82
Fase I.....	82
Fase II.....	86

CAPITULO 4

4. ELABORACIÓN DE UN MODELO ÓPTIMO DE UNA BIOFÁBRICA DE PLANTAS

Flujo de Producción en una Biofábrica.....	90
Selección en Campo de plantas donantes... ..	91
Banco de Donantes	91
Laboratorio.....	92
Medios de Cultivo.....	92
Introducción de meristemas.....	93
Micro propagación.....	94
Enraizamiento.....	95
Adaptación a tierra.....	96
Plantas comerciales.....	96
Parámetros para optimizar recursos.....	96
Agua.....	97

Lavado de Cristalería.....	99
Uso de Balanzas.....	102
Medidas de Seguridad y limpieza en el laboratorio.....	103
Lavado de Vitro plantas.....	105
Siembra de Vitro plantas.....	105
Transplante de Vitro plantas.....	106
Medidas de Seguridad en el área de Crecimiento.....	107

CAPITULO 5

5. AUDITORIA DE LOS PROCESOS

Alcance de la Auditoria	109
Objetivos de la Auditoria	109
Hallazgos	110
Lavado de Cristalería.....	110
Envases utilizados en Laboratorio.....	111
Introducción del material vegetal.....	113
Proceso de propagación de explantes.....	114
Manejo de plántulas contaminadas.....	115
Selección de plántulas para ser sembradas.....	117

Control de plántulas fuera de tipo.....	118
Capacidad de los invernaderos.....	119

CAPITULO 6

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones.....	122
Recomendaciones.....	124

GLOSARIO

BIBLIOGRAFIA

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura del ADN.....	5
Figura 1.2 Plántulas de banano in Vitro.....	11
Figura 1.3 Micro propagación in Vitro.....	13
Figura 2.1 Plantación de banano in Vitro.....	25
Figura 2.2 Planta de Banano fuera de tipo.....	28
Figura 2.3 Asepsia en el laboratorio.....	35
Figura 2.4 Estructura de una Biofábrica.....	42
Figura 2.5 Esquema de un Flujo Laminar.....	46
Figura 2.6 Sub - Área de Incubación.....	48
Figura 2.7 Plantas en bandeja.....	51
Figura 3.1 Estructura de la Biofábrica de Plantas.....	59
Figura 3.2 Equipos para obtener agua bidestilada.....	61
Figura 3.3 Lavadero de Cristalería.....	62
Figura 3.4 Almacenamiento de cristalería.....	63
Figura 3.5 Cuarto de Autoclaves.....	64
Figura 3.6 Tamo de Arroz	67
Figura 3.7 Porcentajes de preparación de sustrato	68

Figura 3.8 Tallo de una planta parida	69
Figura 3.9 Área de Cuarentena	71
Figura 3.10 Preparación de medios de Cultivo.....	73
Figura 3.11 Almacén de Medios	75
Figura 3.12 Propagadores de Meristemas.....	76
Figura 3.13 Lavado de plantas	79
Figura 3.14 Clasificación previa a la siembra	80
Figura 3.15 Siembra en gavetas (Fase uno)	82
Figura 3.16 Llenado de Funda	87

INDICE DE TABLAS

TABLA I	Productos obtenidos con la biotecnología.....	9
TABLA II	Parámetros productivos del banano en el ecuador.....	40
TABLA III	Volumen vs. Tiempo de esterilización.....	65
TABLA IV	Clasificación de las plantas según la altura.....	80
TABLA V	Tiempo de permanencia de las plantas en fase uno según tamaño.....	83
TABLA VI	Hallazgos.....	121

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
BBTV	Virus del extremo del racimo del banano.
BBMV	Virus del Mosaico de la bráctea del banano.
BSV	Virus del estriado del banano.
ISO	Organización Internacional de Estandarización.
NaOCl	Oxido cloruro de Sodio

INTRODUCCION

El avance de la tecnología hoy en día ha permitido que se consiga manipular a los genes, y que las actividades basadas en procesos biológicos comienza a crecer a pasos agigantados especialmente en las industrias relacionadas con la salud humana, la agricultura y agroindustria en general, es decir en todas aquellas áreas que se relacionan con seres vivos.

En el caso de la agricultura y agroindustria, en particular, la biotecnología claramente ofrece la posibilidad de un nuevo crecimiento de la productividad de la agricultura primaria, mediante la superación de limitaciones biológicas básicas de plantas y animales a través de la manipulación de su base genética. De esta forma, pueden superarse los topes de aumento de la productividad de los principales cultivos que se han venido alcanzando en los últimos años, debido al agotamiento del potencial genético explotable mediante tecnologías tradicionales.

En el caso de la biotecnología agropecuaria se trata principalmente de insumos para la agricultura y la producción y salud animal, tales como variedades vegetales, semillas, razas animales, alimentos, vacunas, etc. El carácter biológico de estos productos obliga, en muchos casos, a su adaptación a condiciones ecológicas.

Una de las preocupaciones que suscitó la biotecnología desde su nacimiento fue sus impactos sobre los países en desarrollo, a la vez que se reconocían las oportunidades que ofrece para superar problemas básicos de salud y de producción.

El objetivo del presente trabajo es determinar si los procesos empleados en las diferentes áreas de producción de la Biofábrica de plantas en nuestro país son en realidad el reflejo de un correcto control de Calidad, para la cual se investigará la situación de otras Biofábricas, sus avances, la problemática y la identificación de opciones y acciones específicas para presentar sugerencias que ayuden a su fortalecimiento.

Como el mundo de la biotecnología es bastante extenso y el objetivo es enfocar los procesos que se realizan en una producción específica, se ha considerado como muestra del análisis el proceso productivo de las plántulas de banano, debido a que su fuerte poder económico impacta en los países de Latinoamérica, entre ellos Ecuador y merece que se estudie el proceso biotecnológico que se debe ejecutar, los cuidados y los parámetros dentro de los cuales se logrará una planta y/o semillas libre de enfermedades y con alta productividad.

CAPITULO 1

1. CONCEPTOS

1.1 CELULAS

Las células son las unidades básicas de la vida, son los bloques con los que están conformados todos los seres vivos. Suelen ser del tamaño microscópico.

Dentro de la célula la estructura más importante es el *núcleo*, sin el cual la célula muere, es allí donde está toda la información genética contenida en la moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN), el cual tiene la notable capacidad de reproducirse a si mismo y se almacena en estructuras llamadas *cromosomas*.

La molécula de ADN (Figura 1.1) está formada por una doble hélice, es decir, dos largos hilos perfectamente enrollados. Cada hilo se constituye a partir de una secuencia de bases nucleicas, cuatro en concreto - adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T) -, que representan las letras moleculares del mensaje genético.

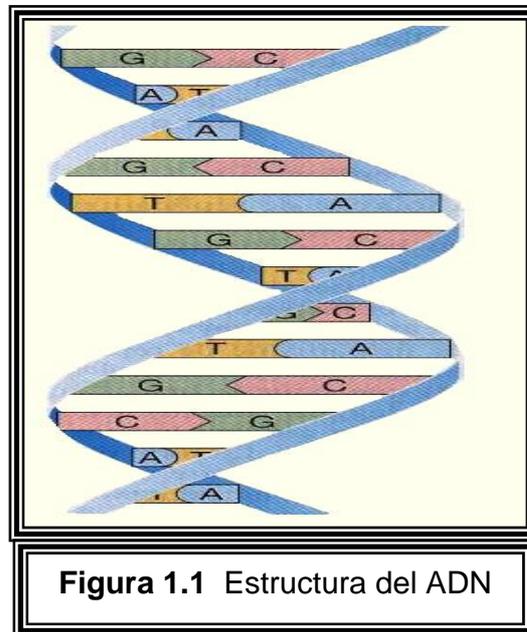


Figura 1.1 Estructura del ADN

Los científicos Schwann y Schleiden (1838) hicieron un aporte importante sobre el conocimiento de la célula. En su teoría celular, ellos la describieron como la unidad biológica más pequeña y que podía ser considerada como totipotente y por lo tanto capaz de regenerar una planta completa si se la ubica en condiciones favorables.

1.2 GENETICA

La herencia es el mecanismo por el cual se transmiten características de los padres a los hijos. Estas características incluyen desde el color de los ojos o la estatura hasta parámetros no tan evidentes del metabolismo corporal, como la estructura y la cantidad de enzimas. A este estudio detallado del mecanismo hereditario se llama Genética.

Hace más de diez mil años, cuando el hombre estaba en los comienzos de la agricultura se dio cuenta que podía conseguir cosechas cada vez mejores reproduciendo las plantas más idóneas que hubieran surgido espontáneamente en la naturaleza. Sin embargo, hasta mediados del siglo XIX nadie se ocupó ni de cual era el mecanismo subyacente que permitía esta mejora de razas ni de los factores implicados en la transmisión de caracteres a través de generaciones.

En 1866, un padre agustino aficionado a la botánica llamado Gregorio Mendel publicó los resultados de unas investigaciones que había realizado pacientemente en el jardín de su convento durante más de diez años. Éstas consistían en cruzar distintas variedades de guisantes y comprobar cómo se transmitían algunas de sus características a la generación siguiente.

1.2.1 MANIPULACIÓN GENÉTICA

La manipulación genética es "la introducción de genes extraños en una célula"; al introducir material genético extraño, se pretende producir nuevos caracteres hereditarios que no estaban en el material genético original.

Esta técnica se realiza mayormente en mamíferos, más específicamente, en ratones, ya que tienen mayor aceptación para someterse a este tipo de "manipulaciones". Se piensa que las "manipulaciones" abrirían un camino para la creación de nuevas especies, con un rendimiento mejor o con una crianza menos costosa; y por otro lado, servirían para el reforzamiento, en una especie determinada, de ciertos caracteres, ampliando el campo de la Biología experimental, más precisamente, de la Biología Molecular.

1.3 BIOTECNOLOGÍA

Se conoce a la Biotecnología como el conjunto de técnicas que utiliza el Hombre para reproducir los fenómenos que ocurren en la Naturaleza, a nivel de laboratorio para su bien.

Las biotecnologías consisten en la utilización de bacterias, levaduras y células animales en cultivo, cuyo metabolismo y capacidad de biosíntesis son orientados hacia la fabricación de sustancias específicas.

Gracias a la aplicación integrada de los conocimientos y las técnicas de la bioquímica, la microbiología y la ingeniería química permiten aprovechar en el plano tecnológico las propiedades de los microorganismos y los cultivos celulares. Permiten producir a partir de recursos renovables y disponibles en abundancia gran número de sustancias y compuestos.

1.3.1 USOS DE LA BIOTECNOLOGÍA

Los usos o aplicaciones de la biotecnología son múltiples y van en aumento, a continuación mediante un cuadro se mostrará con ejemplos lo que se ha permitido obtener a nivel mundial, dando una explicación más extensa en la Agricultura, por tratarse del tema que ayudará a mi análisis en el presente trabajo.

TABLA I
PRODUCTOS OBTENIDOS CON LA BIOTECNOLOGÍA

AREAS	PRODUCTOS
Medicina	Interferon, insulina, antibióticos.
Energética	Biogas
Química	Biocatálisis
Alimentos	Producción de nuevas variedades de queso, vinos y proteínas
Ambiente	Tratamiento de desechos
Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> • Obtención de nuevas variedades de diferentes cultivos con alto rendimiento agrícola resistentes a enfermedades. • Saneamiento de virus. • Conservación de germoplasma. • Recuperación de especies en peligro de extinción. • Montaje de biofábricas para la propagación masiva " IN VITRO " de plantas "Elites".
Veterinaria	Obtención de vacunas para los animales, hormonas de crecimiento.

1.4 PROPAGACIÓN

La propagación de plantas consiste en efectuar su multiplicación por medios tanto sexuales como asexuales. Para propagar las plantas con éxito es necesario conocer las manipulaciones mecánicas y procedimientos técnicos, cuyo dominio requiere de cierta práctica y experiencia.

El éxito en la propagación de plantas requiere del conocimiento de la estructura y la forma de desarrollo de la planta, lo cual puede decirse que constituye la ciencia de la propagación. Esta puede ser en forma tradicional o mediante el uso de la biotecnología mediante el cultivo *in vitro*.

1.4.1 CULTIVO IN VITRO

El término cultivo “*in vitro*” se define como el cultivo de plantas, semillas, órganos, explantes o pequeñas porciones de tejidos que provienen de la planta donante en un medio nutritivo, bajo condiciones estériles y utilizando para ello diferentes recipientes de vidrio (Figura 1.2).

Este complejo celular se mantiene en un equilibrio que al ser alterado, provoca cambios a veces irreversibles; sin embargo si se toma una porción de células, tejidos u órganos y se colocan en un medio de cultivo con todos los requerimientos nutricionales, este explante puede crecer y evolucionar hasta dar origen a una planta con características similares a la planta normal que se vale de las raíces y órganos fotosintéticos para su crecimiento.



Figura 1.2 Plántulas de banano in vitro

El desarrollo de la técnica del cultivo de tejidos ha hecho aportes indiscutibles en el campo de la Biotecnología, siendo sus principales aplicaciones:

- La mejora genética
- Obtención de plantas libres de virus y otros patógenos
- Conservación de plantas
- Micro propagación.

1.4.2 MICRO PROPAGACIÓN

Propagación acelerada de genotipos seleccionados por su alto valor genético, u otros provenientes de otras vías Biotecnológicas en cualquier época del año y en cantidades ilimitadas. Para lo cual existen técnicas que no pueden ser violadas cuando se trata del empleo de la técnica del cultivo in Vitro (Figura 1.3) y se desea llegar a resultados favorables; estos son:

1. Selección adecuada del explante o porción pequeña de tejido.
2. Desinfección del material
3. Establecimiento de un ambiente óptimo para el desarrollo de las siembras efectuadas.



1.4.3 MERISTEMO

Tejido caracterizado por una activa división celular, del cual se forman otros tejidos adultos y diferenciados. Estas células están localizadas en el extremo del tallo o la raíz.

Con respecto al banano, se lo encuentra en la parte interna del colino y es escogido de la parte más joven de la planta, en el medio de cultivo este debe permanecer de 20 a 30 días y cada hijo que este obtenga va reproducirse de la misma forma.

1.4.4 COLINO

Cuando hablamos de colinos en plantas nos referimos a la raíz de la planta. En medios de cultivos entre hormona (citóquininas, auxinas, giberelinas, Azúcares como los aminoácidos), vitaminas, macronutrientes (nitrógeno, potasio, fósforo, calcio), y micronutrientes (azufre, boro, radical amonio).

1.4.5 VARIACIÓN SOMACLONAL

Variabilidad del tipo genético encontrada en células somáticas de plantas obtenidas “in vitro”. Esto provoca cambios en los cromosomas que son permanentes y se transmiten a la descendencia.

1.5 BIOFÁBRICA

Es el centro de producción masiva de plantas y semillas que mediante una amplia selección de plantas élites, con características fenotípicas muy definidas para un objetivo concreto.

Este proceso de clonación brinda la posibilidad de alcanzar altos rendimientos con elevados ingresos por las ventas de sus productos. El carácter estratégico de la Biofábrica radica en su posibilidad de desarrollar masivamente una agricultura sustentable.

Las diferentes técnicas de propagación en una Biofábrica surgen como una alternativa real y novedosa para solucionar algunos problemas de gran importancia en la reforestación y agricultura moderna y que, muchos de los viveros tradicionales no pueden cumplir ya sea porque producen material vegetal sin calidad certificada, o con tecnologías tradicionales (artesanales) poco eficientes, mano de obra no calificada y volúmenes de producción bajos que significan altos costos y baja productividad.

CAPITULO 2

2. Análisis de Biofábricas en Ecuador y el mundo

2.1 Investigación abierta en Internet

2.1.1 Potencial de la Biofábrica

La biotecnología moderna surge a comienzos de la década de los años setenta en los Estados Unidos, como consecuencia de una serie de inventos hechos en laboratorios de investigación universitarios. A mediados de la década se inicia la comercialización de productos basados en las nuevas tecnologías por parte de empresas creadas para explotarlas.

Según los estudios realizados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) se estima que durante los

próximos 30 años, más de tres cuartos del crecimiento de la producción agrícola que se requiere para satisfacer la necesidad creciente de alimento, deberá provenir del aumento del rendimiento de los cultivos. Esto será posible únicamente si se da una innovación tecnológica sustancial.

Es aquí donde nacen las Biofábrica como en lugar idóneo para que las herramientas biotecnológicas más actuales de recombinación del ADN, incluyendo la ingeniería genética ofrezcan algunas oportunidades para generar este tipo de innovación.

2.1.2 Importancia tecnológica

Las Biofábrica surgen como una alternativa real y novedosa para solucionar algunos problemas de gran importancia en la agricultura moderna, entre ellos:

- ✚ Producir masivamente plantas libres de enfermedades, especialmente de carácter viral y bacteriano las cuales son hoy un problema en muchas especies de gran importancia agrícola.

- ✚ Posibilitar el movimiento de material vegetal entre regiones de un país y entre países sin riesgo de transmitir plagas o enfermedades y con bajos costos debido al menor volumen de material.

- ✚ Introducir rápidamente nuevas variedades de plantas para sustituir variedades que han sido afectadas por alguna enfermedad o plaga debido a su susceptibilidad, o por que son más productivas, de mayor calidad en su producto o de mayor aceptación comercial.

- ✚ Producir en condiciones controladas en cualquier época del año sin afectaciones por factores edafoclimáticos.

- ✚ Multiplicar según las necesidades de los clientes sólo las plantas élites, garantizando que toda la población obtenida se corresponda con el genotipo seleccionado y mantener la seguridad del germoplasma así como proteger la patente si el caso fuera.

- ✚ Multiplicar especies que por sus características biológicas o genéticas no pueden multiplicarse por semillas botánicas y sólo puede hacerse su propagación por la vía vegetativa. Para estos casos las tecnologías disponibles permiten incrementar entre 100 y 10.000 veces los coeficientes de multiplicación en comparación a las técnicas convencionales.

- ✚ Responder a demandas de semilla en un corto plazo.

- ✚ Una Biofábrica moderna, debe de estar diseñada para multiplicar una o varias especies a la vez y cambiar rápidamente a nuevas especies, pues en este caso sólo cambia el proceso que se hace a cada especie y no la infraestructura tecnológica.

2.1.3 Importancia Económica

Como toda industria, una Biofábrica requiere una Inversión inicial en su infraestructura y la formación de personal, lo principal es que se haga un buen estudio de la factibilidad de introducir estas tecnologías y comenzar por aquellas especies de mayor impacto en la región, zona o país donde se pretenda crear el proyecto y que el personal directivo y principales especialistas reúnan la capacidad e idoneidad requerida.

Además es de gran importancia que la entidad mantenga convenios o estrecha relación con una entidad de investigación en este campo que le permita introducir nuevas tecnologías ya sea para las especies que tradicionalmente trabaja o para otras nuevas y dar solución a problemas imprevistos que puedan presentarse.

La inversión de una Biofábrica puede recuperarse en un plazo entre 2 y 4 años si se logra una explotación de su capacidad productiva a un mínimo del 60%. Un mayor porcentaje de explotación reduce el tiempo de recuperación de la inversión.

Los precios unitarios de los productos que en ella se generan no son en todos los casos inferiores a los que tienen los productos convencionales (semillas botánicas, esquejes, tubérculos), sin embargo, si se tiene en cuenta el valor agregado por las posibilidades de la Biotecnología Vegetal que no se logran por la vía convencional, se puede estar seguro de tener un producto de altísima calidad, tanto desde el punto de vista genético, como sanitario, que lo hacen muy competitivo con los productos tradicionales.

2.1.4 Especies en las que recomienda la tecnología de propagación in vitro.

Las especies en las cuales no existe un buen sistema de reproducción por semillas botánicas, ya sea por que estas producen segregación genética, por baja fertilidad o viabilidad o rápida degeneración o aquellas en la cual su reproducción es por trozos o esquejes o por que el producto usado como semilla es a la vez el producto que se comercializa (Ej. Tubérculos de papa, esquejes de caña, semillas de ajo, etc.) Son las que precisan de estas técnicas.

Por otra parte, estas técnicas constituyen la única solución para multiplicar especies que son fácilmente contaminadas por enfermedades virales en el campo (Ej. Papa, caña de azúcar, papaya, plantas ornamentales.)

De igual manera para aquellas especies que como los plátanos y bananos tienen un bajo coeficiente de multiplicación por la vía de chopos o candeleros donde no se logra más de 1:40 por año por esta vía pueden lograrse hasta 1: 10 000 en el mismo tiempo.

En la actualidad estas técnicas han sido desarrolladas para más de 1000 especies de importancia agrícola o industrial en el mundo. El comercio mundial de plantas multiplicadas por algún sistema in vitro es de más de 500 millones cada año, siendo los países líderes, Estados Unidos, Holanda, Japón, Tailandia y China. Sólo en Cuba, líder en América Latina, es de más de 20 millones.

Las especies agrícolas de mayor volumen y más establemente han sido: Papa, Caña de azúcar, Plátano, Banano, fresa, piña, Papaya, Yuca, plantas ornamentales y diferentes especies forestales.

2.1.4.1 Banano in vitro

La micro propagación in vitro por medio del cultivo de tejidos significa que los tejidos de un organismo, en este caso del banano, se desarrollan en un medio de cultivo adecuado utilizando un sustrato artificial, en el que se encuentran todas las sustancias necesarias para un rápido crecimiento, y en

condiciones óptimas de iluminación, temperatura, humedad relativa y composición de gases. El órgano que se utiliza en la micro propagación de esta planta es la yema apical.

La yema apical, a partir de la cual se establece el cultivo, se extrae de un retoño selecto en el campo. De la planta madre se aísla el meristemo apical y algunos primordios foliares, se limpian, se desinfectan y luego se plantan en un sustrato de establecimiento en un ambiente esterilizado y en recipiente especiales. El sustrato contiene una mezcla de sales, vitaminas y sustancias de crecimiento destinadas a asegurar el desarrollo del explante y una sustancia coagulante. La dificultad en el pasaje de las condiciones naturales en que se desarrolla la planta madre a las del laboratorio en que se instala el explante reside en que el medio de cultivo del laboratorio favorece la proliferación de hongos y bacterias, y aún de ácaros; el pasaje de un medio séptico a un medio aséptico requiere medios especializados y pericia.

Un índice bajo de infecciones es prueba de la aplicación de un protocolo correcto y de una labor profesional en el laboratorio, mientras que un índice elevado significa un alto porcentaje de material rechazado y el encarecimiento del producto final. Los explantes están también expuestos a los ataques de virus

y de infecciones bacterianas o micosis internas, males que no se detectan fácilmente en el proceso de micro propagación, por lo cual es imperativo llevar a cabo exámenes de laboratorio muy especializados para detectar principalmente las virosis frecuentes de la especie, como el virus del mosaico de la bráctea del banano (BBMV), el virus del extremo del racimo (BBTV), y el virus del estriado del banano (BSV).

2.1.4.2 Ventajas del Banano in vitro

Entre las ventajas que nos ofrece la tecnología de propagar plantas de banano in vitro tenemos:

- ✚ La multiplicación in vitro es masiva y más rápida en forma higiénica y segura, para poder transportarse a cualquier parte del mundo sin problemas fitosanitarios.

- ✚ A veces es posible propagar especies in vitro, que no pueden ser multiplicadas en forma tradicional; esto es posible al fenómeno de rejuvenecimiento, que sólo es posible realizarlo in vitro.

- ✚ El crecimiento de las plantas propagadas in vitro es frecuentemente más vigoroso que el de las clonadas in vivo; esto se debe sobre todo

al rejuvenecimiento y / o al hecho de que las plantas in vitro se encuentran libres de enfermedades.

- ✚ Utilizando el cultivo in vitro es posible, conseguir una multiplicación libre de enfermedades, bien por una rigurosa selección del material inicial, o bien liberando el material inicial de enfermedades.
- ✚ Homogeneidad del material (Figura 2.1), se obtiene uniformidad de crecimiento y de la cosecha; así como la posibilidad de programar la cosecha durante un período relativamente corto.



Figura 2.1 Plantación de banano in vitro

- ✚ Debido a que se requiere una cantidad de material relativamente pequeña para iniciar un cultivo in vitro, se puede realizar una cuidadosa selección del mismo.

- ✚ Los meristemos son más precoces y tienen mayor productividad que el plantío (primera generación) de semilla convencional. Estas ventajas se mantienen durante el segundo ciclo de producción. Las plantas de meristemos tienen mayor vigor, tienen seudotallos más gruesos, y de mayor altura, mayor área foliar, más manos por racimo, menor tiempo para producir cosecha.

- ✚ El rizoma de una planta in vitro tiene 77% mayor cantidad de materia seca que el de un cormo convencional cinco meses después de la siembra.

- ✚ También las hojas nuevas producidas por las plantas in vitro tienen una tasa fotosintética 18% mayor que las hojas de plantas convencionales, por lo que se duplica el área foliar funcional y el total de la materia seca cinco meses después de la siembra.

- ✚ Se ha calculado un 20% de aumento en la productividad por año con plantas de meristemo, en comparación con plantas propagadas convencionalmente.
- ✚ Son plantas libres de plagas, enfermedades, semillas de maleza, por provenir de laboratorio, presentan una rápida multiplicación, en un año se puede producir 2000 plantas por cultivo de tejidos de un solo meristemo. Con el sistema de rebrotes, apenas 10 plantas pueden producirse en un año de una sola planta.

2.1.4.3 Desventajas del Banano in vitro

Así también si no se toman el cuidado respectivo durante la recolección del donante y el proceso de propagación podemos encontrarnos con las siguientes desventajas:

- ✚ Las plantas producidas in vitro pueden mostrar características poco convenientes in vivo: Excesiva producción de ramas laterales y paso total a la fase juvenil.

- ✚ La aclimatación de las plántulas es un proceso difícil y puede que muchas veces, los mayores porcentajes de la pérdida se presenten en esa etapa.
- ✚ Pueden presentar mutantes desde 2% hasta un 50% (Figura 2.2), para evitar esto el laboratorio debe usar genotipos estables y no producir más de 1000 plantas por meristemo, posteriormente la selección en el vivero debe ser muy cuidadosa para evitar dichas plantas lleguen al campo.



Figura 2.2 Planta de Banano fuera de tipo

- ✚ Se podría propagar plantas con virus si no son eliminados en el proceso, por lo que es importante realizar la indexación de plantas que permite saber cuales tienen virus.

- ✚ Alto costo de establecimiento de un laboratorio, lo que incide indirectamente en el precio final de la planta producido de esta manera. Su costo generalmente es 5 veces mayor que el de un rebrote convencional.

- ✚ Necesidad de una mano de obra especializada.

2.2 Consulta a expertos

2.2.1 Cultivo de un meristemo

Una de las características necesarias para la propagación es que las plántulas obtenidas deben estar libres de virus. Se sugiere que por medio del cultivo de meristemos, se obtienen de forma automática plantas libres de virus, pero en realidad no ocurre así.

Las investigaciones llevadas a cabo por More (1960) con *Cymbidium*, demostraron que se obtenían plantas libres de virus, sólo en el caso de que se utilicen meristemas (de aprox. Un 1 mm.) con dos primordios foliares. El clonado que se hace actualmente, con porciones apicales de vástago mucho más grande que las utilizadas por Morel, tiene pocas probabilidades de producir plantas libres de virus.

Para la realización es aconsejable usar vástagos en crecimiento, siempre que sea posible, cuando se vaya a hacer cultivos de meristemas cuando el meristemo que se va a aislar está activo (compuesto de una zona meristemática y una subapical que crece rápidamente), la posibilidad de eliminar virus es mayor.

Los vástagos se deben limpiar cuidadosamente, de forma previa. Se retiran las hojas de los vástagos, siempre que sea posible, y entonces los vástagos (o yemas, si no se han retirado las hojas) se sumergen durante un momento en alcohol de 70 % para eliminar el aire que pueda haber atrapado. Después de esto se realizan la esterilización en lejía diluida o $\text{Ca}(\text{OCI})_2$, aclarando finalmente con agua estéril. Se retiran entonces algunas hojas, trabajando con la ayuda de un estereo microscopio.

Se continúa el proceso de esterilización, utilizando concentraciones más bajas de lejía, o con tiempos más cortos de esterilización, aclarando posteriormente con agua estéril. En algunos laboratorios, se usa alcohol al 70% para la segunda esterilización, no haciéndose en este caso ningún aclarado más. Si se emplea agua para el aclarado, es posible que las gotas dificulten el aislamiento. Se retiran entonces uno por uno los primordios foliares y hojas restantes, trabajando con la ayuda del estereomicroscopio, y utilizando frecuentemente en esta operación agujas o fragmentos de cuchilla de afeitar, montados sobre el mango de aguja de siembra.

El ápice del vástago se mantiene firmemente con una mano (pinza o dedos limpios), mientras que la operación se realiza con la otra mano. La aguja se debe esterilizar de forma libre, junto con uno o dos primordios foliares (generalmente un pequeño cubo de material), se corta usando una cuchilla de afeitar, y se siembra inmediatamente (para evitar que se seque), sobre un medio nutritivo.

Para impedir la deshidratación del meristemo, se debería emplear luz fría, para iluminar el campo en el que se trabaja con el estereomicroscopio. El

meristemo con los primordios foliares es muy pequeño (0.1 mm. de diámetro; 0.2 - 0.4 mm. de longitud).

La composición del medio nutritivo es compleja, ya que un meristemo es una porción mínima de la planta. Cada especie vegetal diferente, e incluso distintas variedades de una misma especie pueden requerir un medio diferente.

El medio de aislamiento no es generalmente el mismo que el de enraizamiento. Debido a que la elección del medio adecuado requiere un gran esfuerzo, el cultivo de meristemos debería ser utilizado exclusivamente cuando un clon está completamente infectado y cuando el tratamiento por calor no produce efecto deseado.

Los meristemos se aíslan sobre medio sólido, aunque en algunos casos se utilizan medios líquidos. El pH por lo general se sitúa entre 5.4 y 6, siendo la sacarosa el azúcar habitual (2 - 5 % p/v).

Frecuentemente se utiliza vitaminas: Vitamina B1, piridoxina, ácido nicotínico, ácido pantoténico. Los reguladores suelen utilizarse en bajas concentraciones (0.1 - 0.5 MG. l⁻¹); la auxina puede ser necesaria para la

formación de raíces, auxinas y citokininas para estimular la división celular; el GA3 se añade a veces para lograr la elongación del vástago.

La temperatura normal de crecimiento es de 21° - 25° C.; aunque la mayor parte de las plantas bulbosas requieren una temperatura más baja. Mientras que las temperaturas más altas (35 - 39 o C) se utilizan solamente, para inactivar al virus. Los meristemas se cultivan generalmente con la luz fluorescentes (longitud del día de 14 - 16 horas, irradian alrededor de 8 - 12 W m²); a veces la luz fluorescente se suplementa con algo de luz roja. En ocasiones es necesario utilizar una irradiación más baja, durante los primeros días después del aislamiento.

A veces puede surgir el problema de que el meristemo produce un buen vástago, pero sin raíces. Morel (1964) resolvió estos problemas, en dalias, injertando el vástago libre de virus, obteniendo in vitro, sobre una plántula libre de virus. Cuando la planta se hace mayor, es posible obtener esquejes sin problemas. En caso de que no se tenga más que un vástago libre de virus, es posible estimular el desarrollo de yemas laterales, de manera que se puedan obtener así más vástagos libres de virus.

2.2.2 Asepsia

Las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir los cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo.

Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su manipulación.

Es complejo lograr cultivos 100% estériles, por lo que se sugiere:

- ✚ **Trabajar en un ambiente adecuado.**- antes de comenzar a trabajar se debe desinfectar la mesa y las paredes de la cámara con etanol al 70 %. Igualmente es conveniente desinfectar la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo o el agua estéril, antes de introducirlos en la cámara.

Es necesario que las manos y, eventualmente los antebrazos del cultivador o propagador sean desinfectados con etanol al 70%. El uso

de máscaras y gorros no es imprescindible (Figura2.3), pero reduce la contaminación si se opera en flujos laminares de aire estéril.



Figura 2.3 Asepsia en el laboratorio

Los instrumentos metálicos empleados deben flamearse previamente con etanol al 95%. El material de vidrio utilizado como soporte para las disecciones debe estar esterilizado al igual que las pipetas que comúnmente también se usan.

- ✚ **Esterilizar los medios de cultivo.-** Los antibióticos aplicados al medio de cultivo pueden ser de utilidad para la desinfección de los explantes. Sin embargo, en general, su empleo solamente se justifica en casos de cultivos de corta duración, ya que la alta concentración

de los antibióticos no implica que previenen la proliferación de todos los microorganismos; además, tales productos modifican la composición de los medios de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes.

✚ **Desinfectar superficialmente los explantes.-** el procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes. No es factible recomendar un procedimiento general para este propósito, y se debe considerar de manera especial las especies vegetales y el tipo de explante.

Es interesante observar que si bien en ocasiones se emplea solo etanol, o solamente NaOCl, lo más frecuente es la utilización de ambos, es decir, una inmersión (generalmente de corta duración) en etanol al 70%, seguida de una en NaOCl y de varios lavados con agua estéril.

Los explantes que provienen de vegetales que crecen en invernaderos o en cuartos climatizados son relativamente más fáciles

de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo; también es más fácil la desinfección de explantes de órganos jóvenes que la de explantes provenientes de materiales adultos. Las aplicaciones de fungicidas o bactericidas, aplicadas previamente a las plantas, puede ser de utilidad.

2.2.3 Aspecto Económico del Banano in Vitro en Ecuador

En los últimos años, la economía mundial del banano experimenta cambios en lo referente a la competencia, la inestabilidad en el mercado mundial, la desaceleración, que está provocando una fase de contracción, y el incremento en los costos unitarios que dificulta aun más su situación, dando lugar a una fuerte reducción en los márgenes de ganancia en los canales comerciales del mercado abierto.

Agravando más la situación para los países latinos productores de banano, las políticas proteccionistas que el mercado europeo está usando en sus colonias, y que sobre todo afectan al Ecuador puesto que está considerado como el primer exportador mundial de la fruta.

Para el Ecuador no cabe duda que el crecimiento de su economía dependerá fundamentalmente de lo que se haga en el sector agropecuario. Siendo el banano uno de los pilares más importantes en dicho sector se estima que el aumento venga de la productividad, mejorando los rendimientos, la calidad y la competitividad del banano ecuatoriano como su esfuerzo para mantener y mejorar la conquista del mercado internacional, el mismo que, como en los párrafos anteriores, no muestra un futuro fácil.

Así pues el productor ecuatoriano sea del tamaño que fuese debe tratar de adaptarse a las nuevas exigencias del mercado, ó en el camino para el gran avance en la productividad tendrá que abandonar el cultivo con grandes pérdidas económicas.

Existen diferentes tipos de material reproductivo dentro de los cuales se destacan: la semilla (cormo) que es la de uso tradicional, aun cuando su obtención es difícil y se requiere de tiempo y planeamiento para obtener la cantidad deseada; las plántulas reproducidas por cultivo de tejidos (plantas meristemáticas) que han mostrado ser un sistema eficiente y seguro para la producción económica de bananos; y las plántulas reproducidas por rebrotes, que constituye en sí, el uso de yemas.

Por todo lo mencionado y desde el punto de vista de productividad, eficiencia y seguridad, las plantas meristemáticas prestan las ventajas que se obtienen de producir un cultivo sano y de alta potencialidad de producción en relación con materiales contaminados y envejecidos de baja potencialidad de producción, no acordes con las exigencias del mundo moderno de alta eficiencia.

Es indudable que las plantas meristemáticas abren un nuevo capítulo en el cultivo económico del banano, obteniendo ventajas como el de mantener uniformidad en tamaño, origen genético y condiciones fisiológicas; el permitir realizar la planificación de las siembras y el deshije para optimizar la producción; el control de plagas y enfermedades; alta producción que llega a superar las 3000 cajas por hectárea al año, mientras que el promedio nacional es de 1800; precocidad que garantiza casi tres cosechas en los dos primeros años, versus el cultivo tradicional que da 2,42 cosechas en el mismo lapso de tiempo; mejor calidad de fruta, racimos densos, compactos, manos y dedos bien formados que facilitan el embalaje; entre las más sobresalientes de sus características que son la base para investigar y evaluar su aplicación.

Para analizar el comportamiento de la producción se definen tres variables básicas:

- ✚ Ratio de conversión
- ✚ Cosechas por año y
- ✚ Producción promedio anual por hectárea.

TABLA II
PARAMETROS PRODUCTIVOS DEL BANANO EN EL ECUADOR

Nº	ALTERNATIVA	* RATIO	** COSECHA	\$	*** PRODUCCIÓN	\$
1	Tradicional	1.0	3.75	1.21	1815	6,806.00
2	Meristemas	1.5	5.63	1.49	3360	12,600.00
3	Diferencia	0.5	1.88	0.28	1545	5,794.00

* Cajas por racimo cosechado

** En un año calendario

*** Cajas producidas en una hectárea en un año calendario

Asumiendo que el costo de producir una caja de banano tecnificado y sembrado tradicionalmente con cepas es de \$ 2.70 como lo reportó la Compañía Bananera Noboa a finales de 2002 y que el precio oficial promedio es de \$ 3.00, se pueden establecer los costos como el 90% del precio de la caja.

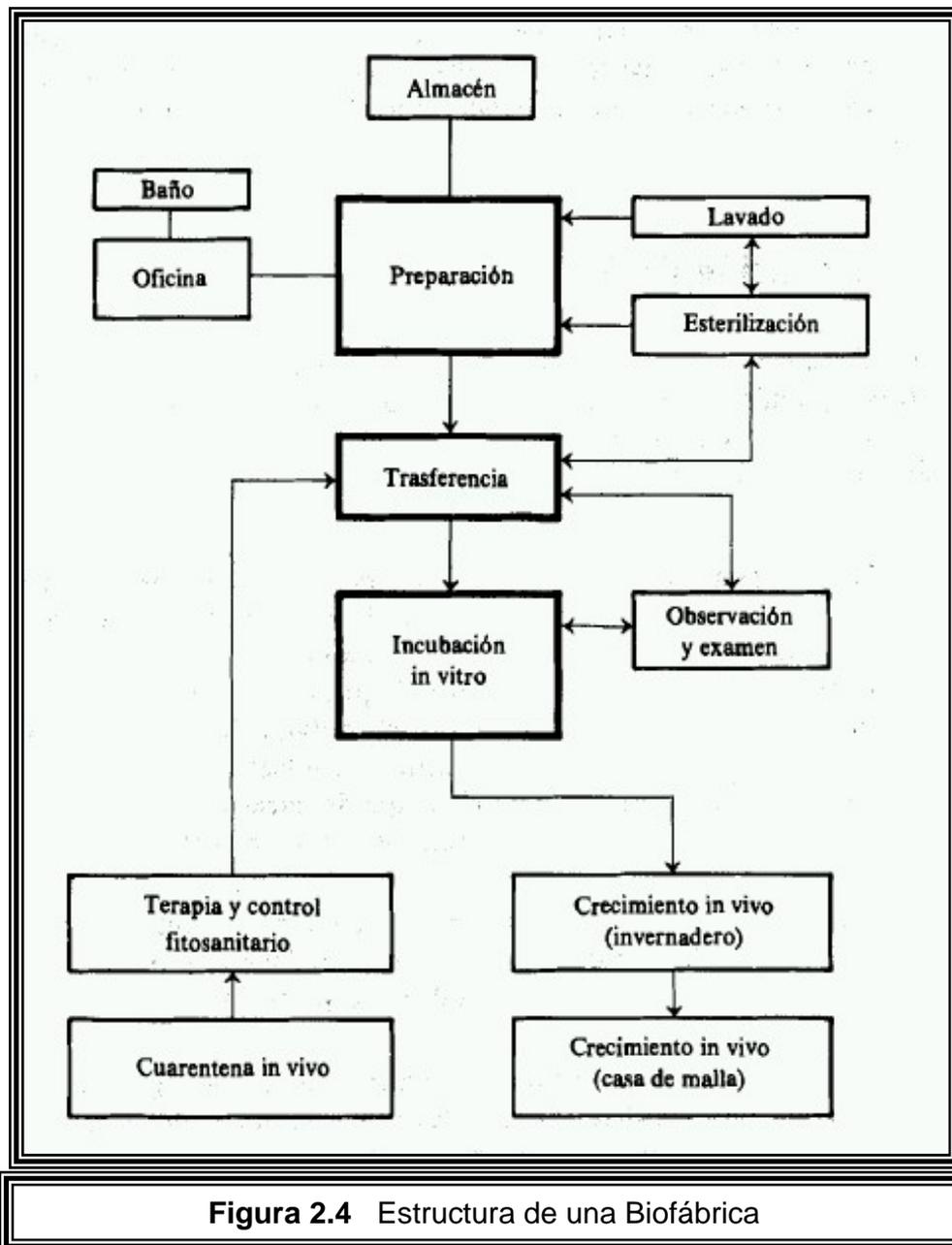
2.3 Información Literaria

2.3.1 Establecimiento de una Biofábrica

El establecer una Biofábrica requiere de un estudio y análisis crítico acerca de las necesidades de hacerlo, dentro de un contexto integral del desarrollo de la investigación y la producción agrícola o forestal de una región o país. Por lo tanto, si se trata de una Biofábrica con la finalidad de producir y vender deberá incluir además de su Laboratorio de Cultivo de tejidos y su área de crecimiento, facilidades para el área de Cuarentena y para la evaluación fitosanitaria.

El Laboratorio de cultivo in vitro se lo debe dividir en diferentes sub-áreas, y estas a su vez tendrán una función específica dentro del proceso de producción de las vitro-plántulas. (Figura 2.4)

El área de Crecimiento in vivo, donde las plántulas se adaptan paulatinamente a las condiciones naturales.



2.3.1.1 Sub – Área de Preparación

Se utiliza principalmente para preparar los medios de cultivo, pero debe proveer también un espacio para almacenar los materiales de vidrio y de plástico y los reactivos químicos.

Debe contar con mesas de trabajo para la preparación de los medios, para colocar la balanza, el medidor de pH, los platillos, también debe incluir vitrinas, estanterías y espacio para el equipo de refrigeración, y para la incubadora o cámara de crecimiento.

Para realizar un medio de cultivo se tiene que mezclar más de 25 componentes químicos y algunos en muy pequeñas cantidades, los cuales no se pueden pesar con mucha precisión. Si vamos a pesar a cada uno de los componentes, eso llevaría mucho tiempo, la preparación de los medios de cultivo se convertiría en un trabajo difícil por un lado y por otro lado el investigador podría cometer errores irreparables cada vez que pesa.

Para evitar estos problemas se prepara las soluciones madres o soluciones stock de los macronutrientes y micronutrientes, vitaminas, hormonas y otros. Posteriormente en un recipiente volumétrico que tiene la mitad ocupado

con el agua destilada, con la cantidad correspondiente se añaden según la receta confeccionada ya todos los ingredientes del medio de cultivo, uno por uno, hasta la disolución completa, se ajusta el PH hasta 5.8 y solamente después se añade agar al medio de cultivo, el recipiente con el medio de cultivo se coloca sobre una cocina eléctrica con agitación magnética y se calienta hasta que el agar se derrita completamente. Posteriormente este medio de cultivo se embasa en los pomos de 200 – 250ml a razón de 20 – 25 ml. por pomo, se tapa y se esteriliza.

2.3.1.2 Sub – Área de Lavado y Esterilización

Puede estar constituida por dos sub – áreas conectadas entre sí, o por un solo ambiente, y puede estar localizada dentro del área general de preparación.

Esta sub – área de lavado debe incluir por lo menos un lavadero grande con agua caliente y agua fría y una fuente de agua de alto grado de pureza, preferiblemente agua doblemente destilada; para el efecto se debe usar un destilador de vidrio o de material no tóxico y un desionizador de agua colocado entre el destilador y el lavadero.

Esta área debe disponer de un espacio para almacenar agua destilada en botellas de plástico; también debe proveer basureros adecuados para el material vegetal, inorgánico y de vidrio que se deseche.

El área de esterilización debe tener espacio para la autoclave vertical u horizontal, el cual puede ser pequeño (olla de presión) o grande (de carga frontal y de enfriamiento lento y rápido), según sea el volumen del material que se procese. También puede incluir espacio para otros accesorios básicos como bandejas de aluminio y de plástico de varios tamaños, gradillas para secado. Estufas para esterilización y secado y un lavadero con agua caliente y fría.

2.3.1.3 Sub – Área de Transferencia

En esta área del laboratorio se realiza el trabajo de escisión, inoculación y transferencia de los explantes a los medios de cultivo. Este trabajo requiere los más altos niveles de limpieza ambiental, se recomienda la instalación de gabinetes de flujo horizontal o vertical de aire filtrado bajo presión, o la construcción de cuartos de transferencia.

Sin embargo, ciertas operaciones de inoculación como la escisión y el cultivo de ápices y meristemas en tubos de ensayo, se pueden realizar sobre

una mesa limpia, ubicada en un lugar del laboratorio libre de corriente de aire y polvo.

Los gabinetes de flujo laminar (Figura 2.5) deben ubicarse, en lo posible en un lugar alejado de las puertas y con un mínimo de corriente de aire, con el fin de prolongar la vida útil de los filtros.

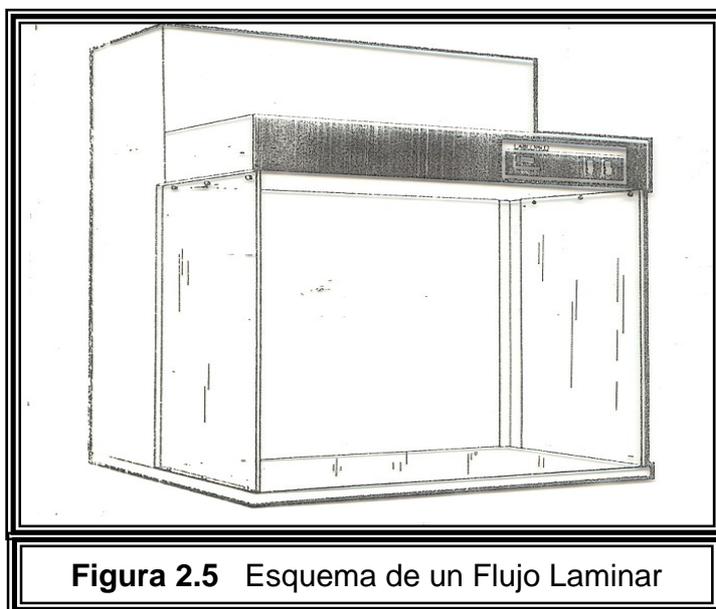


Figura 2.5 Esquema de un Flujo Laminar

Se necesitan también piezas adicionales como: cuchillas N° 10 y N° 11, mangos para cuchillas, agujas de disección, pinzas, tijeras, navajas de afeitar, frascos de alcohol, mechero de alcohol, máscaras, guantes, marcadores a prueba de agua, bandejas y tacho para basura.

El establecimiento del explante dura unas 3 semanas y después se lo divide longitudinalmente en 2-4 partes, las cuales se plantan en un nuevo medio de cultivo distinto al anterior que será su sustrato nuevo y además contiene hormonas estimulantes de la reproducción y del despertar de las yemas axilares.

Cada 4 semanas se trasladan a un nuevo medio de cultivo, separando y dividiendo las plántulas que se han formado. Generalmente se multiplican al doble o al triple en cada traslado y cabe mencionar que los cambios en la composición del medio de cultivo influyen en el despertar de yemas axilares y en la aparición de yemas adventicias y así afectan los índices de multiplicación.

No es conveniente acrecentar la multiplicación en exceso, puesto que lo importante es mantener la calidad de las plántulas; tampoco se quiere alentar el crecimiento de yemas adventicias, para mantenerse fiel a la variedad propagada.

Después de unos cuantos meses se interrumpe la multiplicación mediante el traslado a un medio de cultivo diferente, sin hormonas o con la presencia de ciertas hormonas que estimulan el enraizamiento. En esta etapa la plántula deja

de reproducirse, se arraiga y fortalece, hasta que está en condiciones de ser retirada de su ambiente in vitro.

2.3.1.4 Sub – Área de Incubación

Los cultivos se incuban en un cuarto apropiado también llamados gabinetes o cámaras de crecimiento; éstas pueden ser más eficientes en cuanto al control ambiental, pero son más costosas (Figura 2.6). El área de incubación o crecimiento in vitro debe proporcionar un buen control de la temperatura (20 – 28° C), de la iluminación (variable, según las necesidades: 1000 a 5000 lux) y de la humedad relativa (70% - 80%)



Figura 2.6 Sub - Área de Incubación

En el cuarto de incubación se instalan estanterías metálicas o de madera para colocar los cultivos. Estas estanterías pueden tener dimensiones variables: el ancho entre 0.30 m y 1.00 m, el largo de acuerdo con el tamaño del cuarto, y la altura total de 1.80 a 2.20 m; la distancia entrepaños es de 0.20 a 0.50 m.

Es necesario propiciar una buena distribución del aire en este cuarto para evitar zonas de recalentamiento por efecto de las luces. Cuando se utilizan tubos fluorescentes, es conveniente sacar los balastos fuera de este cuarto.

La regulación de la temperatura se puede lograr por medio de aparatos de aire acondicionado de pared o de un sistema central. En cualquier caso, es necesario tomar precauciones para evitar el calentamiento excesivo, instalando alarma y controles para cortar la iluminación cuando falle el aire acondicionado.

2.3.1.5 Sub – Área de Observación y Examen

Generalmente los microscopios (estéreo, compuesto, invertido y otros) se localizan tanto en el área de incubación como en la transferencia, pero ocasionalmente pueden estar en el área separada. El objetivo de esta área es

realizar observaciones periódicas de los cultivos, tanto en medios semisólidos como en líquidos.

Las áreas descritas se pueden considerar como el núcleo del laboratorio de Cultivo de tejidos. Los laboratorios de investigación y desarrollo y los de producción comercial deben contar, además, con área de Crecimiento, de Cuarentena y Control fitosanitario.

2.3.1.6 Área de Crecimiento

Las plantas extraídas de su medio de cultivo in vitro necesitan pasar por un periodo de aclimatación a la humedad relativa ambiente más baja, al suministro de agua y minerales a través de sus raíces y a la producción de hidratos de carbono mediante la fotosíntesis, o sea de una alimentación heterotrófica a una alimentación autotrófica.

El primer paso en la aclimatación se da normalmente en un invernadero con humedad relativa elevada y radiación limitada. Se extraen las plántulas de sus recipientes, se les quita todo residuo de medio de cultivo y se las planta en bandejas sobre un sustrato que debe mantenerse bien humedecido y que contiene turba y un fertilizante de liberación lenta (Figura2.7).



Figura 2.7 Plantas en bandeja

Normalmente las plántulas echan muy pronto raíces nuevas y funcionales, además de hojas, y se arraigan muy bien después de 3-4 semanas; a continuación se trasladan las plántulas a un invernadero con un porcentaje de sombra del 50% en bolsitas con una capacidad de 2-3 litros de un sustrato cuya composición depende de lo disponible del área, por ejemplo en las regiones tropicales, arena de río bien lavada y abono orgánico (compost) bien fermentado. Las bolsitas se colocan en hilera y sobre cada una se instala un gotero; la aplicación de fertilizantes por el sistema de goteo acelera el crecimiento de las plantas y asegura su calidad.

Normalmente podrán ser transportadas al campo después de 4-6 semanas en estas condiciones, cuando han alcanzado una altura de 20-30 cm y el grosor del tronco en la base es de 20-30mm.

2.3.1.7 Área de Cuarentena

Cuando la función del laboratorio es la producción de materiales élites de sanidad certificada, se hace necesario contar con un área para la recepción de las muestras o plantas destinadas a la limpieza clonal, generalmente protegida contra insectos.

Esta área de cuarentena debe estar separada del resto del laboratorio pero cercana al área de control fitosanitario.

2.3.1.8 Área de Control fitosanitario

En el área de control fitosanitario se realizan las pruebas necesarias para comprobar la sanidad del material vegetal, especialmente de enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos. La mayor o menor complejidad del equipo usado para realizar estas pruebas depende del conocimiento de la patología de la especie y del grado de garantía fitosanitaria que se demanda o se desea ofrecer con el material vegetal.

Cuando el cultivo es afectado por alguna enfermedad causada por bacterias, hongos, parásitos, insectos, etc. y su recuperación y pronósticos no son buenos, se debe proceder a descartar del material afectado e incinerarlo o enterrarlo lejos del vivero. El material que sobreviva será técnicamente tratado con los productos adecuados para garantizar su condición fitosanitaria.

Existe un proceso de selección y eliminación que debe ser realizado por personal debidamente entrenado cuando se presenta material vegetal con problemas fisiogénicos y/o mutaciones, es decir plantas fuera de tipo que presentan características fenotípicas bien definidas, entre algunas de estas mutaciones tenemos:

Enanas.- se presentan más comúnmente que las demás mutaciones y las plantas se caracterizan por tener:

- Disminución del tamaño con respecto a las demás del lote.
- Longitud del pseudopecíolo corto.
- Angulo foliar presenta invaginación
- La distancia entre los puntos de emisión de las hojas es corto en un solo plano y hay apiñamiento en esos sitios.
- Las hojas pueden presentar forma de corazón.

Mazadas.- El haz de las hojas de las plantas presenta una concentración anormal de la antocianina a cada lado de la nervadura central y a lo largo de ella. Sobre ésta coloración aparecen finas rayas o “culebrillas” de un verde intenso en cualquier dirección, en el envés de la hoja se hace aún más intenso.

Variegado.- Se le llama también hojas manchadas, se caracteriza por presentar franjas amplias o cortas de color amarillo – crema en algún sector de la hoja, perpendicular a la nervadura central y que se hacen muy evidentes por el contraste con el verde normal.

Deforme.- Se presenta con deformación de la superficie foliar por sectores, con arrugamiento y ondulaciones del parenquima foliar y sensación coriácea al tacto, la cutícula del tejido, la deformación progresa comprometiendo los bordes de las hojas, dando una apariencia de fácil reconocimiento dentro de las demás de un lote.

Lacatán.- Presentanseudotallos y pseudopécíolos demasiado finos y alargados hasta el punto de producir hojas deformes por el exceso en su longitud, la coloración de estas plantas es un verde pálido uniforme y su fragilidad y clorosis se hacen evidentes a simple vista.

2.3.1.9 Área de Oficina

En ésta se deben ubicar el mobiliario de oficina como escritorios, archivos y almacenamiento de datos, los libros de referencias y de control del laboratorio, los catálogos y otros documentos. También se coloca en ella el equipo de cálculo o computación.

La seguridad física del personal del laboratorio es importante, por esta razón se debe tomar precauciones para ubicar estratégicamente en el laboratorio equipos de primeros auxilios, extintores de incendios y frazadas contra fuego, así como duchas para baños del cuerpo entero y de los ojos.

Lo más indicado es prevenir los accidentes con medidas de seguridad como el uso de compartimientos especiales para almacenar reactivos peligrosos (solventes orgánicos, ácidos, alcohol, nitrógeno líquido) ubicados en el área general de preparación y en otras áreas del laboratorio; la capacitación del personal en las técnicas de manipulación y uso apropiado del equipo, material de vidrio, reactivos, y otros elementos es la mejor forma de prevenir accidentes en el laboratorio.

CAPITULO 3

3. Diagnostico de una Biofábrica de plantas en la ciudad de guayaquil

3.1 Levantamiento de Información

3.1.1 Antecedentes de la Biofábrica

La Biofábrica en la Ciudad de Guayaquil, es una compañía cuya actividad principal es la producción y venta de plantas meristemáticas, es decir aplicando la biotecnología garantiza a los productores agrícolas del país, en especial a los bananeros de la costa, la entrega de plantas élite basado en la selección de material vegetal donante que sea de alta calidad filogenética, fitosanitaria y de excelente rendimiento.

Misión

Mejorar los rendimientos de la producción agrícola ecuatoriana aplicando técnicas biotecnológicas en propagación y conservación de plantas, basándose en la investigación científica y tecnológica.

Visión

Ser reconocida como la empresa ecuatoriana líder del mercado de cultivos comerciales, de alta calidad genética y fitosanitaria.

3.1.2 Instalaciones de la Biofábrica

El Complejo industrial posee 10 hectáreas de terreno (Figura 3.1), dentro de las cuales presenta la siguiente infraestructura:

El área Administrativa, dentro de la cual se encuentran las oficinas de Gerencia, Producción, Asuntos Contables, Recepción de Documentos y Compras.

El área de Cuarentena, donde se realiza el saneamiento de las plantas procedentes de los lotes donde se hizo la selección de las muestras. Esta área tiene una capacidad máxima anual de 9.300 plantas en funda.

El área de Laboratorio de Cultivo de Tejidos con una área de mantenimiento de cultivos para los 2'000.000 de plantas enraizadas.

El área de Cultivo Protegido cuenta con las siguientes condiciones controladas:

- ✚ **Fase uno** con una capacidad máxima anual de 1'300.000 plantas en gavetas.

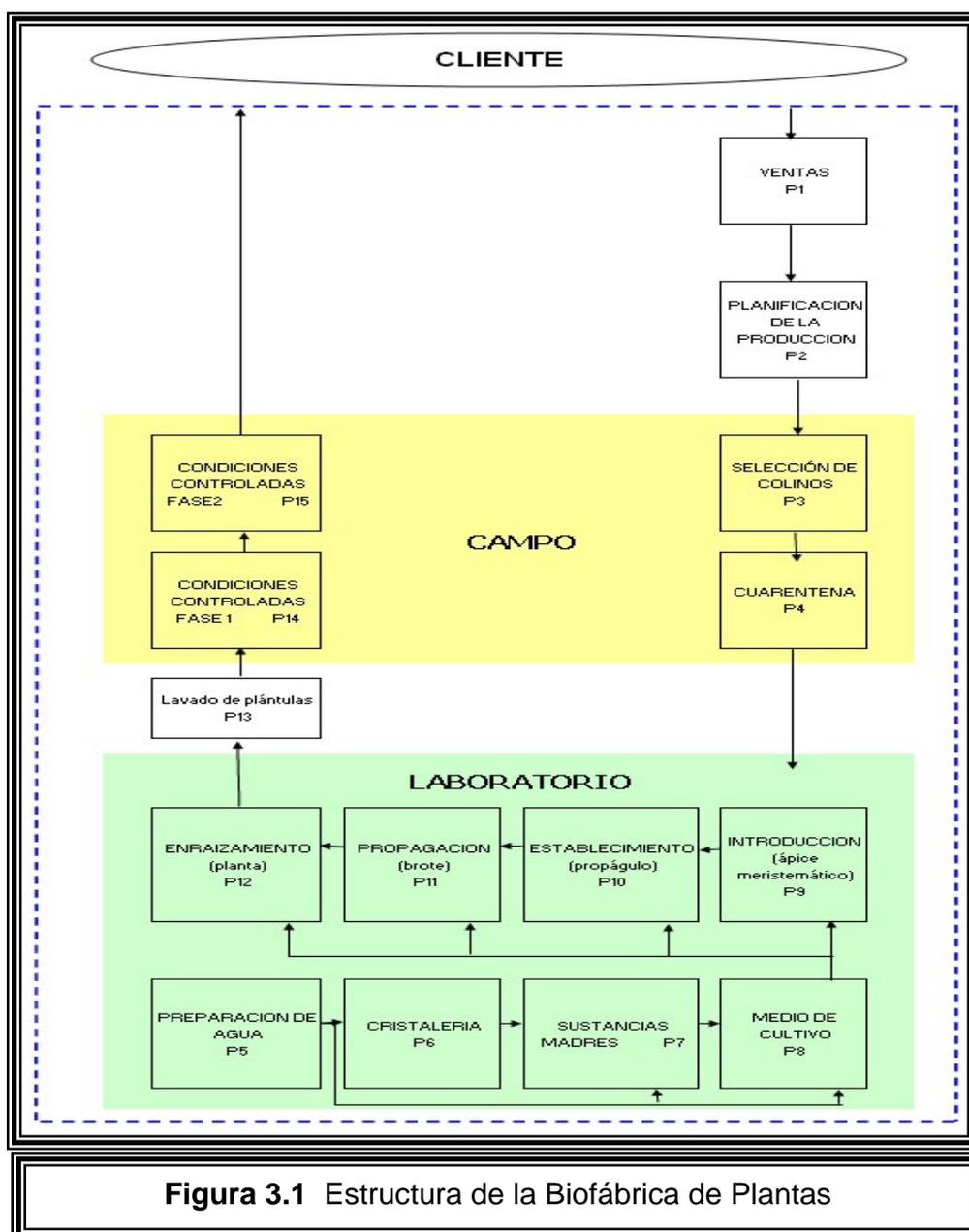
- ✚ **Fase dos** con una capacidad máxima anual de 700.000 plantas en funda.

3.1.3 Productos que elabora

El Banano es su principal producto, ya que representa el 80% de sus ingresos, en la actualidad se produce la variedad Williams.

La Caña de Azúcar es su segundo producto que aporta un 15% de sus ingresos y las variedades que se procesan son: Ragnar, SJ -1, LN-910 y limeña.

El 5% restante de su producción está compuesto por Plátano variedad Dominico y Curare enano; Plantas Maderables como la teca y Flores.



3.2 Descripción de los parámetros utilizados

3.2.1 Técnica Utilizada

Propagación masiva de plantas, utilizando meristemas

3.2.2 Características del Agua

Para la preparación de los medios de cultivo se utiliza agua bidestilada (2 veces destilada). El agua destilada es una clase de agua que casi no tiene impurezas inorgánicas y orgánicas. Se obtiene mediante conversión de agua de la llave en vapor el cual posteriormente se condensa en un tubo frío, es decir el agua corriente se la hace circular por las columnas de desionización para retener los aniones y cationes, obteniendo agua menos dura.

Esta agua pasa luego por el destilador, en este proceso se retiene los residuos orgánicos que podrían existir para de esa forma obtener agua más pura (Figura 3.2).

Se la hace circular por el Bidestilador para obtener agua con menos dureza y menos conductividad eléctrica, óptima para la preparación de soluciones madres y medios de cultivo.



Figura 3.2 Equipos para obtener agua bidestilada

3.2.3 Lavado de Cristalería

La cristalería que se utiliza en el laboratorio de cultivo de tejidos debe ser químicamente limpia, al contrario, las impurezas pueden alterar el contenido de los medios de cultivo o conducir a la contaminación. (Figura 3.3).

Existen distintos métodos de lavado de cristalería, uno de ellos es la mezcla sulfocrómica, que es la mezcla de ácido sulfúrico con bicromato de potasio.

Para comenzar a lavar la cristalería con la mezcla, primero se enjuaga con el agua de la llave y después se añade la mezcla hasta $\frac{1}{3}$ o $\frac{1}{4}$ del volumen del recipiente y con cuidado se enjuagan las paredes con esa solución. Después se saca de la mezcla y se deja en reposo durante 5 minutos, posteriormente se enjuaga con el agua de la llave 8-10 veces y después 2-3 veces con el agua destilada. Normalmente el color de la mezcla es naranja oscuro si es recién preparada y se convierte después en verde oscuro que no tienen las propiedades correspondientes y hay que eliminarla.



Figura 3.3 Lavadero de Cristalería

La mezcla sulfocrómica se utiliza en la cristalería que será usada por primera vez, para que garantice la eliminación de todas aquellas sustancias orgánicas e inorgánicas que existan en las paredes de los pomos que la obtienen en la fabricación de los mismos.

El secado de cristalería, consta de ubicar los pomos en gavetas o bandejas para que se escurra a medio ambiente, pasando por la estufa, la temperatura oscila entre los 100 y 120 grados y el tiempo es de 30 a 50 minutos

El almacenamiento de la cristalería, por la asepsia se lo ubica en las gavetas en un cuarto cerrado, limpio para protegerlo del polvo (Figura 3.4).



Figura 3.4 Almacenamiento de cristalería

3.2.4 Esterilización

Para la esterilización de los medios y otros materiales se utilizan los equipos que se llaman Autoclaves. Son equipos que deben ser manipulados con mucho cuidado (Figura 3.5).



Figura 3.5 Cuarto de Autoclaves

El tiempo requerido para la esterilización también depende del volumen del medio de cultivo en el pomo, donde se propone realizar el cultivo de tal o cual tejido de la planta.

TABLA III
VOLUMEN VS. TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN

VOLUMEN (ml.)	TIEMPO (min.)
25	20
100	28
1000	40
2000	48
4000	63

3.2.5 Sustrato

Debido a que uno o dos de los componentes del sustrato son orgánicos y a la contaminación que puede poseer la arena, el sustrato poseerá contaminantes como ciertas bacterias, hongos y demás microorganismos que pueden ser perjudiciales al momento del trasplante de las Vitro plantas. Por eso es necesario prevenir la presencia de estos contaminantes, cuyo procedimiento para reducir la presencia de aquellos microorganismos es el siguiente:

Utilizar una solución compuesta de formol al 10%. Una vez preparada cualquiera de las mezclas (sustratos) mencionadas anteriormente, se colocan

en una cama de aproximadamente 1.8 cm de ancho, 2.5 cm de largo y 10 – 15 cm de altura, siendo este un volumen manejable de sustrato (65 carretillas de sustrato preparado aproximadamente)

Uniformizar la mezcla en la cama y humedecerla previamente con suficiente agua. Aplicar la solución de formol al 10 % con regadera; además el que realiza ésta labor debe estar protegido con mascarilla y guantes. Cubrir la cama con plástico negro preferentemente durante 48 horas. Luego de éste tiempo, descubrir la cama por 12 horas y lavar el sustrato en la misma cama por lo menos con dos riegos para eliminar trazas de formol.

El sustrato a utilizarse para la siembra de las plántulas, pueden servir tanto para las plántulas a sembrarse en la fase I como para la Fase 2. El material a utilizarse es frecuentemente arena y una fuente orgánica que puede ser tamo de arroz (Figura 3.6) o cachaza descompuesta.

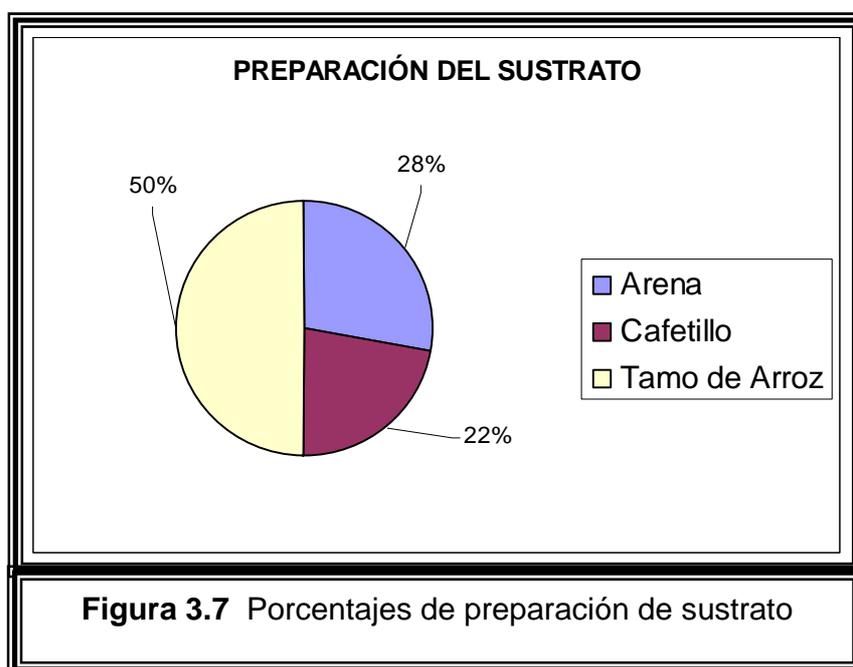


Figura 3.6 Tamo de Arroz

Mediante el uso de una carreta como instrumento de medición y transporte se ubica en primer lugar la arena, para luego agregar por capas el tamo de arroz y el cafetillo. Se mezclan todos los componentes hasta formar una cama del largo y ancho que permita el terreno y de una altura no mayor a los 18 cm.

Luego se humedece con agua corriente o con agua de pozo, en base al volumen por m^3 se procede a la desinfección del sustrato aplicando Basamid granulado una dosis de 200 gramos por m^2 , en caso de utilizar Vidate-L, se utiliza 1.5 ml por litro y suministrado con regadera, empapando el sustrato. Luego de esto se procede a tapar con plástico preferiblemente negro la cama o sustrato por el lapso de 8 días.

Transcurrido este tiempo sacamos el plástico y se deja así expuesto por 48 horas, y se vira el sustrato preparado hasta que no existan malos olores producto de los desinfectantes químicos. A continuación se detallan las proporciones en porcentaje a utilizarse:



3.3 Descripción de los Procesos realizados

3.3.1 Selección y recolección del material vegetal

En este proceso se selecciona las plantas élite en el campo basándose en criterios de fitosanidad, generación, producción agrícola y tipo de explante,

garantizando de esta manera un material vegetal de excelentes características fenotípicas y genotípicas.

Los criterios para seleccionar los colinos de las plantas son:

- Escoger plantas paridas (Figura3.8) esto es, con racimos bien cargados (de cada racimo debe salir, por lo menos, 1 caja y media de banano).
- Escoger plantas de la variedad Williams, esto es, el racimo debe ser curvo.



Figura 3.8 Tallo de una planta parida

- ✚ Las hojas tienen que estar verdes
- ✚ El diámetro del tallo debe ser de 80cm y de color verde.

- ✚ La bellota debe ser bien grande, porque así se asegura el tamaño del racimo.
- ✚ El colino debe ser de tercera generación.

Hay que tener mucho cuidado con las mutaciones de plantas, porque aparentemente pueden tener las características de las plantas sanas y aptas para seleccionar el colino. Se las puede reconocer por sus hojas amarillas, deformes y con huecos ya que las larvas se las van comiendo poco a poco, el color del tallo es negruzco y el tamaño de la planta es pequeño.

3.3.2 Cuarentena

Los colinos extraídos de las plantaciones, posteriormente son sometidos a tratamientos fitosanitarios en las condiciones de vivero, con el objetivo de eliminar patógenos saprofitos, asegurando así que el explante esté exento de microorganismos y plagas.

En esta área se mantienen las plántulas aproximadamente por 3 meses, o hasta que el personal de laboratorio estime conveniente ingresarla para ser propagada. (Figura 3.9)



3.3.3 Laboratorio

3.3.3.1 Preparación de soluciones madres

Para la preparación de las mismas, se utiliza, balanza técnica, balanza analítica, cristalería pasada por el autoclave, reactivos absolutos de marca registradas y garantizadas :Sigma, Merck, pomos plásticos de litro, medio litro y 250 ml., fiolas, beakers, matras aforados, Peachímetro, conductímetros, plancha de calentamiento, y el refrigerador y congelador, lápices cristalográficos. Se las prepara con los reactivos absolutos elaborando de esta forma:

- ✚ Macronutriente
- ✚ Micronutrientes,
- ✚ Enzimas,
- ✚ Vitaminas y
- ✚ Reguladores de crecimiento.

El almacenamiento, se lo hace en un congelador, identificando las soluciones madres realizadas con membretes para que en el siguiente proceso sean identificadas fácilmente: Sustancia A, B, C, D, E, F, G, K, I, J, L, y M, también se realiza un registro o bitácora de la fecha y la cantidad elaborada para luego realizar un inventario mensual de los reactivos utilizados, así como los saldos de sustancias que quedan cada mes.

3.3.3.2 Preparación de Medios de Cultivo

El medio de cultivo de revestimiento es la propagación masiva de plantas, utilizan vitaminas, antibióticos, hormonas, aminoácidos, y la vitamina B y C, estas son utilizadas para que no se oxide el fruto, es decir no se ponga negro como por ejemplo la manzana, el guineo entre otros.

El medio de cultivo de propagación sucede de 20 a 30 días este consiste en propagar más plantas In Vitro, es decir que se debe reproducir más colinos, cabe señalar que no se trata de una reproducción sexual por lo contrario es de reproducción asexual esto quiere decir que no intervienen órganos sexuales sino que intervienen hormonas. (Figura 3.10)

Antes de la preparación de los medios de cultivo, se deben de sacar todas las soluciones madres para el descongelamiento con una o dos horas de anticipación.



Figura 3.10 Preparación de medios de Cultivo

Una vez preparado los medios de cultivo, se dosifica en los pomos y tubos de ensayo, en cada pomo el volumen a usar oscila entre 15 a 30 ml. Y los tubos no más de 10 ml. Se los tapa con papel aluminio extra fuerte, papel kraft y ligas de tubos de bicicleta.

Se autoclavan a 121 grados y 0.5 libras de presión por 30 minutos, transcurrido este tiempo se destapa la autoclave por 30 minutos, se sacan los recipientes y se almacenan en la bodega de medios de cultivo, antes de que pasen a la bodega se los rotula con una identificación por lotes y fecha de realización.

En la bodega de Almacenamiento de medios de Cultivo, por la asepsia se lo ubica en las gavetas en un cuarto cerrado, existe una persona que lleva el control de los medios que ingresan y los que salen tanto para las Cámaras de flujo laminar, también se registran aquellos pomos que se rompen o se contaminan y aquellos que serán puesto en observación para medir su PH y verificar por medio un control biológico si está apto para continuar en el proceso de propagación. (Figura 3.11)



Figura 3.11 Almacén de Medios

3.3.3.3 Introducción

El tejido vegetal o explante (meristemo) es extraído del área de cuarentena o en muchos casos directamente de la hacienda, al mismo que se le hace lavados previos para la eliminación de residuos de suelo material muerto y se lo lleva al área aséptica de un tamaño de 5 cm de altura por 2 cm de diámetro, para la desinfección de los mismos, se usa cloro al 3 %, durante 20 minutos.

Luego el paso a seguir es ir a la cámara de flujo laminar donde cada muestra es seccionada tanto en altura como en diámetro y se la deja de un tamaño de 1 cm^3 , cada meristemo es introducido en un frasco con la solución de medio de cultivo designada, se flamea la boca del pomo, se tapa y se lo sella con termoencogible y se los rotula como P0, para luego ser trasladado al cuarto de crecimiento, donde permanecerá aproximadamente un periodo de 30 días (Figura 3.12).



Figura 3.12 Propagadores de Meristemos

3.3.3.4 Establecimiento del explante

Esta etapa significa de P0 el meristemo se adaptó a las condiciones del medio del cultivo, en P1 significa que el meristemo fue seccionado en dos, pero en una solución nutritiva, en P1-1 significa que se realiza nuevamente secciones, obteniendo esta vez como resultado cuatro explantes, los mismos que ya demuestran ahijamientos y en P2 una vez adaptado el meristemo P0.

3.3.3.5 Propagación

Es la etapa del trozado de los explantes que se han cultivado en condiciones in vitro, cuando estos han adquirido el desarrollo apropiado. Inicia con el P3 hasta el P10 en el cual se van propagando masivamente las plantas y se las ubica en medios de cultivo diferente, ocho plántulas por cada pomo por un periodo de 30 días.

3.3.3.6 Enraizamiento

Es ésta etapa es mejor utilizar un medio de cultivo líquido, ya que se evita el lavado del agar que se adhiere a las raíces, es muy rico en nutrientes lo que hace que rápidamente se proliferen bacterias u otros contaminantes peligrosos para el normal desarrollo de las vitro plantas.

Con el medio de cultivo líquido solo se hacen enjuagues a las raíces desarrolladas por el material. Cuando la disponibilidad de material es escasa y se requiere de un mayor número se pueden tomar aquellas que aún están en la etapa de propagación.

Con esto se deja expresado que al tratarse de una Biofábrica que produce y vende plántulas, está buscando satisfacer las necesidades de los clientes y muchas veces varía el pedido que realizan, siendo necesario acelerar la entrega de plantas, y para lograr esto se enraíza a todas aquellas plántulas que están en pases menores (P-4, P-5, P-6) para que en los próximos 30 días se encuentren con raíz y puedan ser entregadas al siguiente proceso que es el lavado de plantas.

De presentarse una demora en la venta de las plantas se avanza en los pases hasta P-10 para luego enraizarlo, lo cual se conoce como R10.

3.3.3.7 Lavado de las plántulas

Una vez que las plántulas terminan su proceso en el Laboratorio se procede a enviarlas al área de lavado, donde se las saca de los frascos o tubos de ensayo, se enjuaga con abundante agua para que se desprenda el medio de cultivo que lleva cada plántula.



Figura 3.13 Lavado de plantas

El material que se desarrolla en condiciones in vitro, generalmente adquiere diferentes tamaños en la etapa de enraizamiento, lo que significa que al momento de que las plántulas que ya están listas para salir del laboratorio se necesita hacer una clasificación del material de acuerdo a su tamaño.

A continuación se desarrolla una tabla donde se considera la altura de las plántulas y su denominación.

TABLA IV
CLASIFICACIÓN DE LAS PLANTAS SEGÚN LA ALTURA

ALTURA (cm)	DENOMINACION
1 ½ - 2	Planta grande
1 – 1 ½	Planta Mediana
0.5 – 1	Planta Pequeña
Menos	Planta Muy pequeña

Una vez clasificadas por la altura que presentan, las Vitro plantas pasarán a lo que se denomina como Fase Uno



Figura 3.14 Clasificación previa a la siembra

El Control de calidad, es una constante que acompaña a todo el proceso y está en la obligación de rechazar cualquier procedimiento que no permita obtener resultados positivos. En el área de lavado existe una inspección diaria, ya que dentro de los pomos pueden existir plántulas que presentan variaciones genéticas o mal formaciones y no se las considera aptas para ser sembradas.

En el proceso de Lavado, el Control de Calidad que se realiza es también para identificar plántulas que se encuentran contaminadas pero que pueden ser rescatadas y sembradas, así como también plántulas muertas por los microorganismos que son eliminadas del proceso.

Luego de clasificarlas por su tamaño y por sus características se procede a entregar un formulario en el que se reporta la cantidad de plantas grandes, medianas, pequeñas y muy pequeñas que se han sembrado en una semana, así como también se identifica si estas plantas son contaminadas o son buenas, ya que durante el proceso de propagación en el laboratorio, muchas veces dentro de un frasco contaminado se rescatan plántulas a las que se denominan “reversibles” , las mismas que se lavan con permanganato de potasio.

3.3.4 Cultivo Protegido

3.3.4.1 Fase Uno

Luego de la clasificación de los grupos de vitro plantas, éstas deberán ser sembradas y cumplir un tiempo determinado en las gavetas de siembra y esto va a depender del tamaño en que éstas se hayan encontrado.

Las gavetas de siembra contienen 98 huecos o cubos de aproximadamente 3 cm En la parte ancha (boca) y 2 cm En el fondo.



Figura 3.15 Siembra en gavetas (Fase uno)

En la tabla siguiente, se detalla la denominación en tamaño del material y el tiempo que deberán permanecer en las gavetas.

TABLA V

**TIEMPO DE PERMANENCIA DE LAS PLANTAS
EN FASE UNO SEGÚN TAMAÑO**

DENOMINACIÓN	TIEMPO
Planta grande	3 semanas
Planta Mediana	4 semanas
Planta Pequeña	5 semanas
Planta Muy pequeña	6 semanas

El **Control de Calidad** presenta reportes en los que indica la cantidad de plantas que se rechazan durante esta etapa de adaptación climática, los motivos por los que se rechazan es por mortalidad y por encontrarse fuera de tipo (mutaciones), esta inspección se la realiza cuando se está seleccionando las plantas que ya cumplen con las características necesarias para ingresar a la siguiente fase, las cuales son:

- ✚ Las plántulas deben alcanzar alturas mínimas de 7 cm en la gaveta.

- ✚ Deben poseer entre 75 y 100% de raíces en el sustrato (en cubo de la gaveta).
- ✚ Plántula con valores menores pueden aumentar los porcentajes de mortalidad.

El Control fitosanitario se realizará solamente cuando sea necesario por la existencia de ciertos hongos presentes en el vivero, se pueden utilizar algunos productos químicos.

La fertirrigación es una tecnología de alta aplicabilidad en estos casos, donde las plántulas reciben las dosis de fertilizantes por medio del sistema de riego con una eficiencia del más del 90% en la recepción del fertilizante por la planta.

El Llenado de gavetas, se lo realiza en bandejas de polietileno de 98 hoyos y se procede a llenar con el sustrato ya antes mencionado.

El Balizado de gavetas consiste en trasladar las gavetas del lugar donde fueron llenadas hacia los bancos ubicado dentro del Invernadero identificado

como Fase uno, se procede a regar el sustrato que está dentro de las gavetas con agua corriente con una regadera.

La Siembra, después las plántulas son sembradas por tamaño y una plántula por cada hoyo y se identifica el cultivo, la variedad y la fecha en que ingresaron a esta área, también si proceden de un área buena o contaminada. En época lluviosa se hacen aplicaciones adicionales de Vitavax 0.8 gramos por litro preparada en un tanque de 60 litros y distribuido con una regadera, esta aplicación se la realiza después de la siembra para prevenir de ataques por microorganismos patógenos.

El Riego depende de las condiciones climáticas atmosféricas los cuales oscilan de 2 a 4 diarios con microaspersión

La Fertilización Se la hace mediante el uso de una regadera 2 veces al día usando fertilizantes comerciales: Nitrato de Potasio, Sulfato de Amonio, Nitrato de Calcio, Nitrofoska foliares, Fertilon Combi

La Fitotecnia consiste en eliminar malezas, mortalidades y plantas con variaciones genéticas presentes en las gavetas.

Esta actividad le compete exclusivamente al personal de Control de Calidad, porque ellos serán los que determinan las cantidades que se consideran eliminadas por ser plantas fuera de tipo o por mortalidad.

3.3.4.2 Fase Dos

Una vez transplantadas las plantas en fundas más grandes permanecen aquí posteriormente 8-12 semanas, bajo condiciones determinadas de fertilización y riego hasta alcanzar un tamaño establecido para esta fase.

La Preparación del Sustrato que se usa es el mismo que en Fase I.

El Llenado de Fundas es una actividad en la que se utilizan fundas negras cuyas medidas son 8.5 x 7 x 2 y con cuatro orificios, las mismas que son llenadas con el sustrato anteriormente detallado. (Figura 3.16)



La Balizada consiste en trasladar las fundas del lugar donde son llenadas a la casa Sombra en la que van a ser ubicadas por camas que son de 2 m. de ancho y el largo depende de las dimensiones de la casa sombra. En su mayoría se habla de 1000 plantas aproximadamente por cama.

El Riego se procede a realizar con agua corriente mediante el uso de una manguera funda por funda para garantizar que todo el sustrato este totalmente húmedo.

El Transplante se da cuando a las plántulas previamente clasificadas en Fase I se las lleva a la funda, en la que se ubican una planta por funda.

El Fertirriego oscila de 3 a 4 veces por día, antes de la fertilización se proporciona 5 minutos de agua por aspersión, seguidos 10 minutos de fertirriego y finalmente 5 minutos más de agua con el objetivo de lavar todo residuo de fertilizante que hayan quedado en las hojas.

La Solución Nutritiva se la prepara en un tanque de 200 litros y distribuida mediante un inyector con impulso de la fuerza de agua conducida por la tubería. La solución nutritiva consta de macronutrientes, nitrato de potasio, sulfato de amonio y nitrato de calcio.

Aspersiones con Motobomba se usa para aquellas áreas donde se encuentra el follaje de las plantas, aquí se realizan aplicaciones mediante esta vía de micronutrientes y de activadores de crecimiento.

El Control de Calidad en este punto se realiza con la finalidad de entregar al cliente solo plantas óptimas, por lo que previamente a las entregas o ventas de plantas se realiza una inspección rigurosa en la que se eliminan aquellas plántulas que presentan variaciones genéticas y aquellas que no cumplen con los parámetros de altura, vigor, número de hojas y sistema radical.

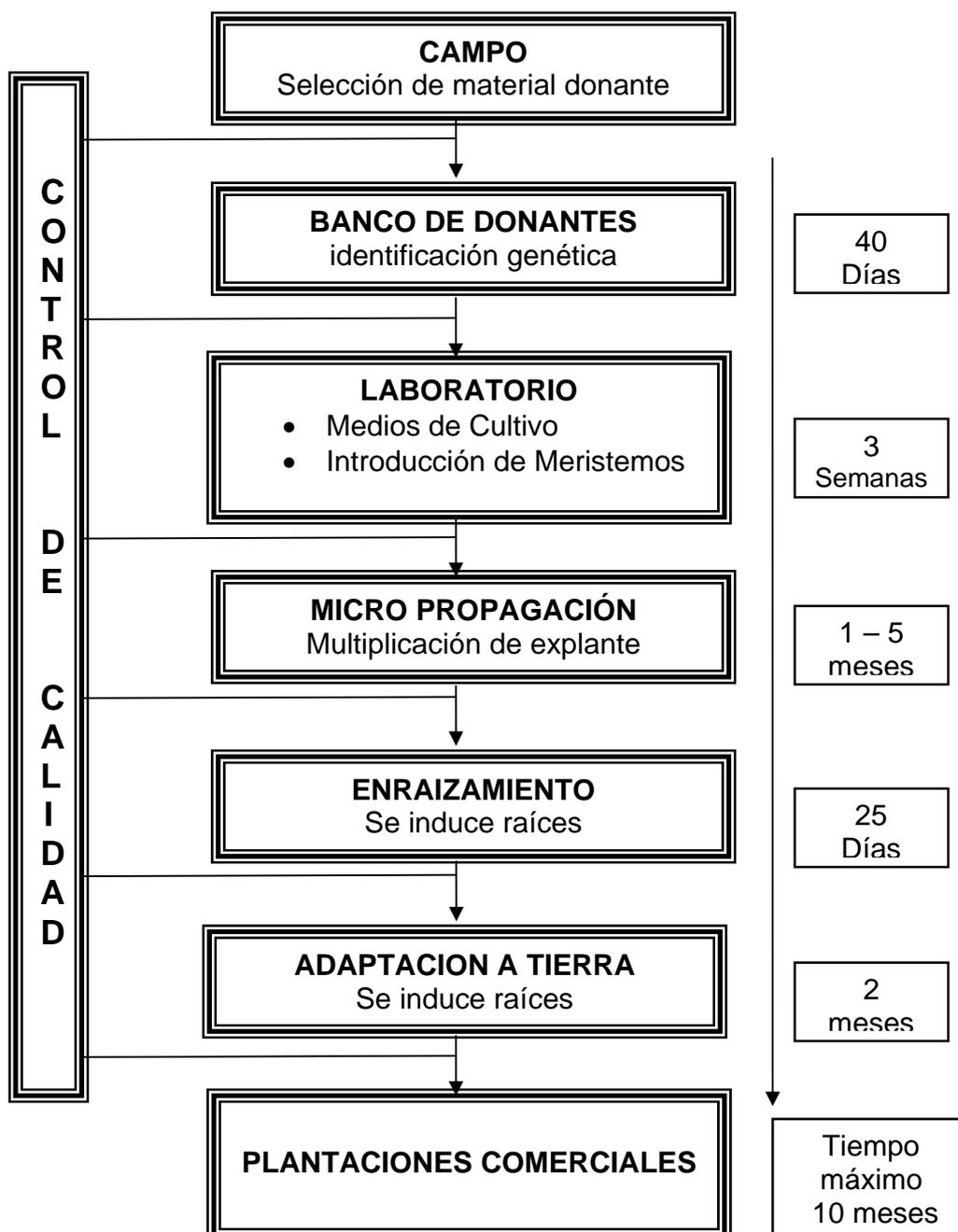
CAPITULO 4

4. Elaboración de un modelo óptimo de una Biofábrica de plantas

La utilización de la semilla de alta calidad en la práctica universal de la agricultura de alto rendimiento es un requisito indispensable, estimándose como un factor que puede llegar a representar el 1/3 de los rendimientos.

Para los cultivos como el banano, que se propagan sucesivamente de año en año, con estacas o hijos, este factor cobra aún mayor importancia, pues se pueden propagar también enfermedades y se acumulan aberraciones genéticas que conducen a la declinación productiva.

4.1 Flujo de producción en una Biofábrica.



4.1.1 Selección en Campo de plantas donantes

La Selección de plantas con mayores rendimientos y de menor afectación por enfermedades garantiza la calidad genética y fitosanitaria de las plántulas micro propagadas.

Para garantizar la pureza de la variedad y evitar confusiones se caracteriza las plantas donantes mediante marcadores moleculares (Iso – enzimas y RFLP de ADN). Las plantas son controladas de la presencia de enfermedades mayores mediante diagnóstico inmunoquímico o molecular.

En vista de la importancia que encierra esta primera etapa se diseñó un cuadro que sirve de guía para el técnico que realizará la recolección del material vegetal, y de esa forma quedará la constancia por escrito de haber ingresado a cuarentena un colino apto.

4.1.2 Banco de Donantes (Cuarentena)

Para garantizar que el meristemo apical se siembra in vitro y es sano se utilizan varios tratamientos tales como termoterapia, quimioterapia y el corte mínimo del explante.

Se establecen líneas clonales de propagación de las cuales se selecciona las más vigorosas y se reidentifica genéticamente para controlar su estabilidad.

4.1.3 Laboratorio

4.1.3.1 Medios de Cultivo

No existe un medio de cultivo único para cultivar distintas partes de plantas in vitro. En dependencia del objetivo trazado y resultados a obtener se utilizan medios de cultivos que se diferencian entre si en cuanto a la cantidad de sales minerales, hormonas, vitaminas, etc., de la selección correcta y del desarrollo del medio de cultivo depende el éxito del cultivo de tejidos ejecutado.

En la preparación de los medios de cultivo, un 80% se debe a la calidad de agua destilada, limpieza de cristalería y la calidad de los reactivos utilizados. Una calidad de agua de parámetros insatisfactorios, debido a la presencia de las huellas de sales minerales, metales o de materia orgánica, pueden afectar el crecimiento de las plantas in vitro. A este fenómeno puede sumarse el lavado defectuoso de la cristalería a donde se envasan los medios de cultivo.

Otras operaciones tales como: las pesadas de los reactivos en las balanzas, el ajuste del pH, la esterilización del medio de cultivo, todas estas operaciones tienen la misma importancia y deben ser realizadas con mucho rigor.

Los Medios de Cultivo se deben preparar con anticipación, porque para conocer si existe contaminación en el medio, se debe realizar un test biológico, el cual consiste en sembrar en condiciones estériles algunas plántulas del cultivo en propagación, además se examina si hay alguna alteración en la composición nutritiva de los medios, lo cual se refleja en el explante después de 10 días de sembrado y de presentarse alteraciones fisiológicas en las plántulas se eliminara el lote de medio realizado.

4.1.3.2 Introducción de Meristemas

El meristemo es un tejido vegetal que se coloca en un medio de cultivo para su futuro procedimiento. La selección del explante adecuado para la introducción del cultivo se puede considerar como parte mayoritaria del éxito del trabajo.

Para seleccionar un explante hay que tener en cuenta los siguientes factores:

- ✚ Estado fisiológico de la planta
- ✚ La temporada en la cual se selecciona el explante
- ✚ Tamaño del explante

Las plantas al igual que los hombres están sujetas al ataque de microorganismos, los cuales poco a poco están induciendo a la disminución de los rendimientos. Por lo que es recomendable obtener en las condiciones controladas las plantas madres saneadas con anterioridad y a partir de estas hacer la selección de material vegetal para extraer el explante para su introducción in vitro.

4.1.4 Micro propagación

Una vez establecidos los cultivos de meristemas se subcultivan en un medio de cultivo que induce aun más al ahijamiento. El ahijamiento incrementa en los subcultivos sucesivos que son sometidos las plántulas, de tal forma que a partir de un meristemo inicial se puede lograr hasta 5.000 hijos en dependencia de la estabilidad genética del cultivo que se somete a ese método de propagación.

En esta etapa se realiza un nuevo diagnóstico y otra identificación genética de las plántulas. Es importante señalar que en esta etapa una sobre propagación puede conducir a mutaciones genéticas, es decir establecer plantas fuera de tipo o que no son idénticas a la planta madre.

Para regular la producción de las plántulas se establece un banco de Propágalos en estado de conservación in vitro mediante reducción de temperatura y nutrición, el cual permite reiniciar el ciclo de propagación con plántulas saneadas e identificadas en cualquier momento que lo requiera la producción. Además permite concentrar la producción en un intervalo de tiempo menor.

4.1.5 Enraizamiento

Las plantas micro propagadas se subcultivan una vez más pero esta vez en un medio de cultivo que induce el enraizamiento. En esta etapa se cuantifica el volumen de plántulas producidas y se analiza su morfología para ver la estabilidad genética que presenta al finalizar la micropropagación y de esta forma aceptarlas para que continúe a la etapa de lavado.

4.1.6 Adaptación a Tierra

Las plántulas enraizadas son extraídas de los frascos y transplantadas a un sustrato estéril y son cultivadas en un régimen de humedad, temperatura e iluminación controlada en un invernadero hasta alcanzar un estado fisiológico de “endurecimiento” de las plántulas.

4.1.7 Plantas Comerciales

Finalmente las plantas son vendidas y transplantadas en el campo donde se le brinda al cliente una asesoría para su cuidado y manejo adecuado.

El vigor y saneamiento de la planta va de acuerdo al número de propagaciones que se realizaron en el laboratorio, ya que es ahí donde se da origen a este proceso.

4.2 Parámetros para optimizar recursos.

A continuación se detalla una serie de pasos y observaciones que se debe de considerar dentro de una Biofábrica durante el proceso de la fabricación de las plantas.

4.2.1 Agua

En los laboratorios de cultivo de tejidos de plantas, el agua es uno de los productos más necesitados tanto en la preparación de los medios de cultivo como para el lavado de la cristalería.

Para la preparación de los medios de cultivo se utiliza agua bidestilada (2 veces destilada). La destilación, con el punto de ebullición mayor del agua (100° C.), remueve efectivamente la mayoría de las sales inorgánicas y todos los compuestos orgánicos incluyendo todas las bacterias y pyrogenes. Los gases y otros materiales orgánicos no se eliminan con la destilación, estos se quedan en el agua y pueden ser eliminados por otros métodos.

El agua que se utiliza en la elaboración de los medios de cultivo debe ser de alta calidad, la misma que se considera aceptable a partir de 0.2 micromos (200 000 ohm.). Normalmente se utiliza agua con resistencia de 1'000 000 ohm, también se utiliza agua desmineralizada, este método de purificación de agua permite obtener grandes volúmenes de agua pura.

Desmineralización o deionización es un proceso de purificación de agua mediante resinas de intercambio de iones. Las resinas de intercambio iónico

tienen afinidad para los cationes o aniones de las sales disueltas en el agua. La desventaja de este método de obtención de agua consiste en que puede tener bacterias vivas (destilada – muertas) y las resinas se saturan rápido y a menudo hay que regenerarlas.

Para la conservación y el almacenamiento de agua destilada y desmineralizada debemos de tener algunas consideraciones:

- ✚ Utilizar solo la cantidad necesaria.

- ✚ El agua destilada no debe almacenarse en pomos de cristal, por la desalación de las paredes. Es mejor guardarla en botellas de borosilicato o pomos plásticos de polietileno.

- ✚ Al reenvasar el agua solo se debe hacer en pomos que se encuentren lavados y enjuagados con la misma agua destilada o desmineralizada recién obtenida.

- ✚ Cada lote de agua que se obtiene debe ser medido su ph y la conductividad que posee.

- ✚ El agua obtenida no puede guardarse por mucho tiempo. En el caso de ser necesario conservar por más tiempo el agua, se debe tapar el pomo con un tapón de goma donde esté introducido un tubo de cloruro de calcio anhídrido recién calentado.

4.2.2 Lavado de Cristalería

La cristalería mal lavada puede contener restos de medios de cultivo y al ser nuevamente utilizada puede contaminar con hongos y bacterias a la sustancia que se almacene dentro.

Existen distintos métodos que pueden ser empleados: mecánicos, físicos y químicos. El modo del lavado depende del objetivo que se persigue.

- ✚ **Método mecánico**

Si en las paredes de la cristalería usada existe una nata, manchas, restos de algunas sales minerales o simplemente un precipitado, esta cristalería se lava primero con el agua de la llave o izopos, después se enjuaga con el agua destilada. Cuando se trabaja utilizando los izopos hay que tener cuidado para no romper el fondo de la cristalería lavada.

Este fenómeno se puede prever al colocar al ende del izopo un pedazo de goma.

Método Físico

Se emplea para el lavado automático de la cristalería en grandes Biofábricas, utilizando primero el lavado con el agua caliente o vapor para eliminar las sales precipitadas y después se enjuagan varias veces con agua destilada o desmineralizada.

Método Químico

La Cristalería que va a ser utilizada para la preparación de las soluciones madres o soluciones stock debe ser lavada con la mezcla sulfocrómica, pero como la base de esta mezcla es el ácido sulfúrico, que es muy caro, utilizarla para cualquier evento no es rentable, se utiliza la mezcla acetoalcohólica, que es más barata.

Tanto la mezcla sulfocrómica como la acetoalcohólica también se utilizan para lavar la cristalería que contenía medios de cultivo contaminados por los hongos y bacterias.

El personal que labora manipula las mezclas deberá de considerar lo siguiente:

- ✚ Usar delantal de material antiácido, lentes protectores y guantes antiácidos.

- ✚ Para las mezclas sulfocrómicas se debe utilizar una jarra de porcelana o un vaso plástico de teflón, resistente a la acción de los ácidos.

- ✚ Se deberá revisar la integridad de los guantes.

- ✚ Debido a lo resbalosa que puede estar la cristalería se recomienda sacar las mezclas que en el lavamanos se coloque goma para amortizar la caída de la cristalería

- ✚ En el lavado de cristalería el personal debe de usar botas de caucho, mandiles de plástico o impermeables.

4.2.3 Uso de Balanzas

- ✚ Las balanzas deben de permanecer siempre limpias, un reactivo caído en el plato de las balanzas debe ser recogido inmediatamente.

- ✚ No se puede colocar las balanzas cerca de los equipos de calentamiento y en el lugar donde hay corrientes de aire.

- ✚ Evitar que le den los rayos del sol a la balanza.

- ✚ Antes de colocar las muestras que serán pesadas se debe apagar y después encender cuando ya estén ubicadas en el plato.

- ✚ Periódicamente se debe realizar mantenimiento por personas especializadas.

- ✚ Las Balanzas sean técnicas o analíticas deben estar colocadas en un lugar bien horizontal de tal forma que cuando se enciende el punto 0 debe estar en su lugar.

- ✚ No es aconsejable que se las traslade continuamente de un lugar a otro.

- ✚ Los ácidos, pentóxidos de fósforo y otras sustancias volátiles no deben ser pesadas en la balanza, porque pueden afectar los materiales de los cuales está construida.

4.2.4 Medidas de seguridad y limpieza en el Laboratorio.

Antes de comenzar el trabajo se procede a limpiar las paredes del flujo con alcohol al 70%. Todos los objetos que entran en el flujo laminar deben ser limpiados con franela húmeda en alcohol.

Todo el personal que labore dentro del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, sin excepción:

- ✚ Usará bata limpia
- ✚ Usará calzado apropiado o botas de tela,
- ✚ No fumará, ni ingerirá alimentos o bebidas dentro del laboratorio.

Antes de ingresar al cuarto de siembra se debe de poner ropa estéril: mandiles, gorras, tapabocas. Los instrumentos de trabajo deben ser esterilizados.

No se puede trabajar si se tiene algún proceso inflamatorio como conjuntivitis, tos, etc.

Esta área debe mantenerse siempre limpia por lo que se debe realizar una revisión constante de sus paredes, evitar dejar desperdicios, y de encontrarse polvo en alguna superficie se debe proceder a baldear con una mezcla de agua y cloro.

Cuando se han terminado las labores del día se debe realizar por lo menos 1 vez a la semana una fumigación con permanganato de potasio y formol.

Antes y después de trabajar, el área y los equipos utilizados deben ser limpiados con un paño húmedo en alcohol. Se debe encender la luz ultravioleta por lo menos una hora antes de comenzar el trabajo.

4.2.5 Lavado de Vitro plantas

Una vez que las plantas han llegado del laboratorio al área de Lavado de plantas se procede a lo siguiente:

- ✚ Se selecciona por tamaños a las plantas, estos son: grande, mediana, pequeña, teniendo en cuenta que se debe chequear la presencia de una o más variaciones somaclonales y se deben eliminar del proceso.

- ✚ Se realiza la poda de raíces manualmente y se corta el cormo con bisturí, en caso de estar prominente, también se eliminan las hojas necrosadas.

- ✚ Se sumergen las plantas por espacio de 2 a 3 minutos en una solución con desinfectante, luego se enjuagan por otro espacio de 2 a 3 minutos.

4.2.6 Siembra de Vitro plantas

Después de haber sido lavadas son llevadas al área de Cultivo Protegido, también llamada Invernaderos donde el tiempo promedio de permanencia de las vitro plantas es de cinco semanas, al cabo de las cuales son transplantadas a las casas sombras.

El requerimiento de agua para las vitro plántulas varía según la edad, siendo más altos en los primeros estados de desarrollo de ellas y disminuyendo gradualmente a medida que crecen. Es importante cumplir con los siguientes pasos:

- ✚ Realizar orificios de siembra de 2 a 3 cm de profundidad.

- ✚ Establecer riegos periódicos y cortos para alcanzar el punto de rocío en las hojas de las vitro plantas recientemente sembradas.

- ✚ Revisar de forma rutinaria, tanto mañana y tarde con el fin de detectar a tiempo cualquier problema técnico o de orden fitosanitario que se presente.

4.2.7 Metodología para el transplante de Vitro plantas

Transcurridos cinco semanas de permanencia promedio de las Vitro plantas en las mesas se procede al transplante. Para lo cual se comienza con suspender el riego 24 horas antes del mismo, para facilitar el corte y la

extracción individual de cada planta, para evitar el trauma de la planta en el proceso. Muchas veces se hace necesario podar algunas raíces que sobresalen del bulbo.

4.2.8 Medidas de Seguridad en el área de Crecimiento in vivo

Las persona que realizan las actividades de campo, están expuestas a la manipulación de diferentes químicos. A continuación se detalla algunas indicaciones que se debe cumplir:

- ✚ Queda determinadamente prohibido comer, beber, o fumar durante la manipulación o aplicación del producto.

- ✚ Ninguna persona debe aplicar sin antes haberse practicado el análisis de colinesterasa y que los resultados de este demuestren que están aptos en sus niveles. Si el operador muestra síntomas de intoxicación (ojo con pupila dilatada, mareo, vómito, desmayo), hay que sacarlo inmediatamente del lugar, retirarle toda la ropa, lavarlo y llevarlo al médico junto con la etiqueta del producto químico utilizado.

- ✚ Es exigido el baño personal con agua y jabón después del transporte o aplicación de químicos a todos los involucrados directa o indirectamente en el trabajo.

- ✚ Se debe contar con archivos actualizados sobre las características de los productos que se utilizan, información toxicológica, ambiental, tratamiento en caso de intoxicación.

- ✚ Las personas que aplican productos químicos tienen que haber sido capacitados en el uso y manejo seguro de plaguicidas.

- ✚ El equipo de protección personal debe ser utilizado de manera tal que las mangas de la camisa del overol queden por fuera de los guantes y las bastas del pantalón por fuera de las botas. El mandil, espaldero debe quedar colocado entre la espalda del operador y el equipo aplicado.

CAPITULO 5

5. Auditoria de los Procesos de la Biofábrica

5.1 Alcance de la Auditoria

Observación y evaluación de los procesos que realiza una Biofábrica para poder entregar plantas meristemáticas de calidad a los clientes. Para esto se revisará cada etapa de la producción, los manuales de políticas y procedimientos y el producto final que brinda.

5.2 Objetivos de la Auditoria

- ✚ Determinar si los procesos empleados en las diferentes áreas de producción de la Biofábrica de plantas en la ciudad de Guayaquil son en realidad el reflejo de un correcto control de Calidad, siguiendo los parámetros descritos en el capítulo anterior.

- ✚ Presentar las sugerencias correspondientes que llevarán a la mejora continua de la Biofábrica analizada en el capítulo 3, en caso de encontrar deficiencias.

5.3 Hallazgos

5.3.1 Lavado de Cristalería

Condición

El área destinada para la actividad de lavado de cristalería es reducida, por lo que observa exceso de agua en el cuarto. Las bandejas en las que se depositan los frascos y accesorios que se utilizan en el proceso son mucho más grandes que los lavaderos, por lo que son ubicadas en bancos de madera para cumplir con el proceso.

Criterio

El área de lavado debe incluir por lo menos un lavadero grande con agua caliente y agua fría y una fuente de agua de alto grado de pureza, preferiblemente agua doblemente destilada; para el efecto se debe usar un destilador de vidrio o de material no tóxico y un desionizador de agua colocado entre el destilador y el lavadero.

Causa

El aumento de la producción en los últimos años ha motivado a que se incremente el personal en el área de lavado de cristalería y se observa que el espacio resulta poco óptimo para realizar las tareas diarias.

Efecto

El espacio muy reducido para el lavado de la cristalería origina un desperdicio de agua constante, por lo que puede existir la proliferación de hongos y bacterias. Los accesorios que utilizan para el lavado son manuales y la compra constante de fibras limpiadoras retrasa la limpieza.

5.3.2 Envases utilizados en Laboratorio**Condición**

Los envases que utilizan para el almacenamiento de medios de cultivo con las plántulas que resultan en cada proceso de la propagación son de vidrio y su tapa se confecciona a base de termoencogible, aluminio, papel kfrac y ligas.

Criterio

Se han diseñado tarrinas de plástico que poseen una estructura resistente a las autoclaves y el tiempo 4 veces mayor que el de los frascos de vidrio, además dentro de cada tarrina se pueden almacenar hasta un máximo de 20 plántulas.

Causa

La adquisición de frascos de vidrios es fácil de obtener en relación a la compra de tarrinas, al no encontrarse dentro del país, los trámites de importación retrasan la producción.

Efecto

La ruptura de la cristalería en la Biofábrica actualmente llega a 250 frascos semanales, ocasionando grandes costos que sumados a los insumos que complementan este proceso: termoencogible, ligas, papel kraft y aluminio, hacen que se convierta en un gasto operativo a largo plazo. Además se observa que se incrementa la mano de obra para optimizar el tiempo de almacenamiento de las plántulas en los respectivos frascos.

5.3.3 Introducción de material vegetal a Laboratorio

Condición

El material vegetal que se introduce a Laboratorio muchas veces ingresa directamente del campo, es decir una vez seleccionado en lugar de pasar por el proceso de Cuarentena.

Criterio

El proceso de Cuarentena permite analizar por un tiempo aproximado de 2 meses la calidad del material vegetal que fue seleccionado, y durante esta etapa se realizan exámenes para determinar algún posible virus que no puede ser detectado a simple vista y de esa forma asegurar la calidad de las muestras.

Causa

El ingreso del material vegetal al Laboratorio sin pasar por el proceso de Cuarentena se da para poder cumplir con el plan de producción. Ya que si se espera a que las muestras seleccionadas en campo estén en Cuarentena, esto retrasará el crecimiento de las plántulas y se verán obligados a demorarse en la entrega del producto final al cliente.

Efecto

Se puede ingresar material vegetal que aparenta estar sano, y que a simple vista es el óptimo, pero que si se hubiese analizado su permanencia en el área de Cuarentena habría surgido alguna irregularidad, evitando así contaminar al material que ya está en el laboratorio.

5.3.4 Proceso de Propagación de los explantes**Condición**

El proceso de propagación se realiza de forma parcial, es decir cada mes se toma un número de frascos de cada sub-cultivo, dejando en espera por más de un mes parte de los frascos que correspondían ser también propagados.

Criterio

La propagación de sub-cultivos debe de llevar un orden y disciplina absoluta, se debe de respetar los tiempos establecidos entre cada sub-cultivo, que oscila entre 20 y 30 días, asegurando un resultado óptimo y evitando el envejecimiento de la plántula.

Causa

Según las exigencias de la producción esperada, es decir se busca propagar de forma urgente solo los sub-cultivos que serán necesarios para cumplir con la demanda.

Efecto

Al no procesar todos los subcultivos dentro del periodo establecido, se está dando paso a un posible foco de contaminación, ya que el medio de cultivo tiene un tiempo óptimo de uso, luego del cual pierde sus propiedades nutritivas, degenerando la plántula y ocasionando pérdidas del material vegetal.

5.3.5 Manejo de plántulas contaminadas**Condición**

Las plántulas que se consideran “contaminadas irreversibles” son entregadas al área de lavado para que proceda a vaciarlas en tachos de basura muy cercanos al área de trabajo.

Criterio

Al considerar que un frasco posee plantas contaminadas, se asume que dentro de ese medio de cultivo se pueden desarrollar bacterias y hongos.

Causa

Las condiciones de trabajo que posee el personal dan apertura a que procedan a abrir los frascos contaminados y se deseche las plántulas en lugares cercanos.

Efecto

Al exponer un material contaminado en un ambiente cerrado, donde también se encuentra el material que va a continuar en el proceso de producción se está esparciendo en el ambiente micropartículas que pueden contaminar en menor grado, incluyendo al personal que manipula estos frascos si no toma las medidas de seguridad correspondientes.

5.3.6 Selección de plántulas para ser sembradas

Condición

Las plántulas que van a ser sembradas se las etiqueta observando dos características: una es el tamaño (grande, mediana, pequeña y muy pequeña) y la otra es el tipo del medio de cultivo del que fueron sacadas, porque pueden provenir de un medio de cultivo contaminado o de uno bueno, etiquetándolas como plántulas buenas o contaminadas.

Criterio

Para un resultado sustentando en la calidad de la plántula se debe de cumplir con las normas durante todos los procesos de producción, por lo que se debe mantener los parámetros más óptimos al momento de definir tamaños y procedencia del medio de cultivo.

Causa

Para cumplir con las plántulas solicitadas por el cliente, se da origen al término de “plantas contaminadas reversibles” lo cual significa que poseen un grado mínimo de contaminación y con las acciones correctivas pueden ser rescatadas y entregadas como producto final.

Efecto

Según los cuadros de producción se aprecia un alto índice de mortalidad en las plantas sembradas y el 50% de estas fueron plantas contaminadas, por lo que genera un costo muy alto el mantenerlas en los invernaderos.

5.3.7 Control de plantas fuera de tipo**Condición**

El Control de calidad se encarga de rechazar antes de los embarques las plantas que no cumplen las características que el cliente solicita, y las depositan en lugares aledaños a las instalaciones de los invernaderos o casas sombras.

Criterio

Las plántulas que por diferentes motivos fueron rechazadas durante el proceso, deben ser ubicadas en lugares lo más lejano posibles al área de trabajo y enterradas o incineradas.

Causa

El equipo de control de calidad es muy reducido y no se abastece a cumplir con los parámetros de higiene, por lo que deja las plantas en lugares

cercanos al invernadero, para que el coordinador del área realice la inspección respectiva.

Efecto

El tener plantas rechazadas fuera de los invernaderos hace que se origine un foco de contaminación y da mal aspecto al lugar si fuera visitado por los clientes que observan el proceso de producción de las plántulas.

5.3.8 Capacidad de los Invernaderos

Condición

Las plantas ubicadas en las casas sombras se encuentran en grandes cantidades que sobrepasan su capacidad, puesto que cuando están pequeñas (de 7 cm de altura) pueden estar agrupadas de 10 en 10, pero cuando van desarrollándose son separadas unas de otras.

Criterio

Cuando se realiza un plan de producción y se estima lo que será su producto final, hay que contemplar todos los aspectos que esto genera, entre ellos el espacio que se necesitará para lograr los objetivos.

Causa

Debido al aumento de la producción no se pueden separar a tiempo las plantas y se mantienen por periodos mayores hasta que alcancen su crecimiento idóneo.

Efecto

La sobrepoblación de plantas en las casas sombras ocasiona que no se puedan desarrollar las plantas en el tiempo acordado, porque al estar muy juntas entre sí, el crecimiento se retrasa, motivando a que se estresen y puedan ser foco de hongos y bacterias si no se las separa a tiempo

A manera de resumen a continuación se presenta por medio de una tabla los hallazgos encontrados en la auditoria realizada.

**TABLA VI
HALLAZGOS**

HALLAZGO (ubicación de la irregularidad)	CONDICION (actividad realizada en la Biofábrica auditada)	CRITERIO (Lo que indican los estándares)	CAUSA (motivo por el que se realizó la Condición)	EFEECTO (Consecuencia que se obtiene al no cumplir con el criterio)
Lavada de Cristalería	El área reducida, exceso de agua en el cuarto.	Debe tener un lavadero grande con agua pura caliente y fría.	El aumento de la producción.	Proliferación de hongos y bacterias.
Envases utilizados en Laboratorio	Los envases son de vidrio y se cubren con aluminio, papel y ligas.	Existe en el mercado tarrinas de plástico, 4 veces más resistente y con mayor capacidad.	Los trámites de importación son rigurosos y retrasan la producción.	Ruptura de frascos, aumento de los costos de operación y mano de obra.
Introducción de material vegetal	No todo el material ingresa pasando por el área de Cuarentena	El proceso de Cuarentena permite analizar la calidad del material vegetal.	El aumento de la producción.	Puede presentarse un virus o bacteria y contaminar el laboratorio.
Proceso de propagación de explantes	El proceso de propagación se realiza de forma parcial.	La propagación de sub-cultivos debe de respetar los tiempos establecidos.	El aumento de la producción.	Posible contaminación, ya que el medio de cultivo tiene un tiempo óptimo de uso.
Manejo de plántulas contaminadas	Las plántulas "contaminadas irreversibles" son manipuladas muy cerca de las plantas buenas.	Un frasco posee plantas contaminadas, desarrolla bacterias y hongos, debe ser autoclavado.	El espacio y la falta de preparación del personal.	El material contaminado, contiene micro partículas que afecta negativamente
Selección de plantas para ser sembradas	Las plántulas que van a ser sembradas se las etiqueta según sus características.	Se debe de cumplir con las normas y tratar de brindar solo calidad.	El aumento de la producción.	Existe un alto índice de mortalidad en las plantas sembradas que son contaminadas.
Control de plantas fuera de tipo	Las plantas rechazadas se las depositan en lugares aledaños a las instalaciones	Las plántulas que fueron rechazadas deben ser enterradas o incineradas.	El personal de calidad no se abastece a cumplir con los parámetros de higiene.	Se puede originar un foco de contaminación y da mal aspecto al lugar.
Capacidad de los invernaderos	Las plantas ubicadas en las casas sombras sobrepasan su capacidad.	Cuando se realiza un plan de producción hay que contemplar la capacidad con que se cuenta.	El aumento de la producción.	Al estar muy juntas entre sí, las plantas, se llenan de hongos y bacterias.

CAPITULO 6

6. Conclusiones y Recomendaciones

Luego de haber analizado los procesos de una Biofábrica que produce plantas meristemáticas y haber detallado los hallazgos, se obtienen las conclusiones y recomendaciones respectivas.

6.1 Conclusiones

- ✚ La propagación de plantas es una ocupación fundamental de la humanidad, sin embargo los métodos convencionales ya no son suficientes para satisfacer las necesidades, por lo que es urgente un plan de producción biotecnológico que permita obtener mejores resultados en menor tiempo.

- ✚ Buscando un mayor desarrollo en la economía del país, específicamente el agro ecuatoriano, la alternativa económica del uso de meristemas en el cultivo del banano demuestra ser promisorio, rentable y de considerable importancia para enfrentar los retos futuristas de alta productividad, eficiencia y calidad que el mercado moderno exige.

- ✚ La alta diversidad genética del país todavía no está suficientemente investigada y documentada, lo cual motiva a que se desarrollen proyectos que se dediquen a la de la identificación de la variabilidad genética en varios cultivos. Por el gran valor que puede tener dicha diversidad en el futuro, es sumamente importante no solo su investigación sino también su conservación por medio de bancos de germoplasma.

- ✚ Uno de los mayores problemas del sector agrícola en Ecuador es la falta de disponibilidad de semillas certificadas y variedades de alto rendimiento y con resistencia a enfermedades en casi todos los cultivos, sobretodo en aquellos que son potencial como producto para la exportación.

6.2 Recomendaciones

- ✚ Se debería remodelar el lugar de lavado de cristalería, ampliarlo para que exista menos desperdicio de agua, de ser posible comprar una secadora (Estufa para secar los pomos) también para eliminar toda contaminación de medios de cultivo y las plántulas contaminadas cuando se encuentran dentro de los frascos.

- ✚ El mantenimiento preventivo de las instalaciones y equipos para su óptimo funcionamiento es muy importante, para evitar los costosos paros en producción o reparaciones mayores.

- ✚ Se debe analizar si el trabajo del personal de Control de Calidad es eficiente, ya que según los resultados obtenidos durante el proceso de biofabricación se observa mucho rechazo de plantas en la etapa final. Considero necesario definir por escritos las funciones que ésta área debe cumplir y verificar su cumplimiento.

- ✚ Se recomienda adquirir lámparas ultravioletas para disminuir la contaminación en el área de laboratorio, así como también autoclaves de gran capacidad, como lo son las de doble puerta y una balanza de precisión con lecturas inferiores a los gramos.

- ✚ Se considera conveniente desarrollar o crear un área de investigación para determinar o realizar el estudio de todo el proceso productivo de la obtención de plantas. El Área de investigación de preferencia debe tener un lugar separado, y manejar de forma independiente el consumo de reactivos, equipos, cristalería, personal (grupo preparado y que no esté vinculado con la producción).

- ✚ Uno de los estándares para sistemas de administración de la calidad con mayor reconocimiento a nivel internacional es ISO 9000 (International Organization for Standardization ó Organización Internacional de Estandarización), la implementación tiene un impacto positivo en la calidad, productividad y reducción de costos, además que da reconocimiento y credibilidad, así como una ventaja competitiva, por lo que dejo a su consideración la implementación del mismo.

BIBLIOGRAFIA

- CARBONELL, W e INFANTE, D. , **Oportunidades y Desafíos de la Biotecnología para la agricultura y agroindustria de América Latina y el Caribe**, Publicación del Banco Interamericano de Desarrollo, 1996.
- FERNANDEZ, Oscar, **Fichas Técnicas para el manejo de Vitroplantas de Banano en Invernaderos**, Instructivo basado en las experiencias de manejo en Invernaderos y campo de Ecuador y Colombia, 1996.
- MONTES, Silvia, **Capacitación Técnica en Agricultura Moderna**, Publicación del Instituto Nacional de Ciencias Agropecuarias de La Habana Cuba, 1995.
- ORTIZ, R., LOPEZ, A., PONCHNER, S., y SEGURA, A., **El Cultivo del Banano**, Editorial Universidad Estatal a Distancia, 1999.
- ROCA, W., y MROGINSKI, L., **Cultivos de Tejidos en la Agricultura**, Publicación del Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991.

- ROVIRA, francisco, **Lecciones de Biología General**, Ediciones FRS, 1992.

GLOSARIO DE TERMINOS

Cepa: Nombre que se utiliza para describir una unidad de producción de banano, compuesta por la planta madre e hijos.

Clon: Conjunto de individuos procedentes de otro que es originario, creados por alguno de los procedimientos de multiplicación asexual o agámica (división, injerto, partenogénesis), sin reducción cromática.

Clorosis: Decoloración del tejido verde oscuro natural de la hoja producto de problemas causados por enfermedades o mala nutrición.

Compost: Compuesto preparado con base en residuos de cosecha de diferentes cultivos y otros ingredientes orgánicos, que se utiliza para mejorar el suelo.

Cormo: Morfológicamente, el cormo se define como un tallo que desarrolla hojas en la parte superior y raíces adventicias en la parte inferior.

Defoliación: Pérdida de las hojas de la planta.

Densidad de la población: Número de plantas por hectárea.

Emisión foliar: Salida de las hojas.

Enzima: Es una proteína que cataliza una reacción enzimática.

Explante: Es una parte del un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo.

Fertirrigación: Método de aplicación del fertilizante utilizando el sistema de riego.

Germoplasma: Toda la variabilidad genética de que puede estar formada una especie.

Incubación: Referido al régimen de luz, temperatura y humedad relativa fundamentales para el crecimiento de células, tejido y región.

Índice de Cosecha: Relación entre el racimo y el peso de las partes vegetativas.

Indexación: Evaluación de existencia de virus por medios moleculares, anticuerpos monoclonales o sondas de ADN.

Macro nutrientes: Son aquellos elementos que la planta necesita en grandes cantidades (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre).

Meristemo: Tejido caracterizado por una activa división celular, del cual se forman otros tejidos adultos y diferenciados.

Meristemo apical: Es el tejido formado por las células embrionarias que se localizan en el ápice de las partes de crecimiento de la planta.

Micro nutrientes: Son aquellos elementos que la planta necesita en pequeñas cantidades (hierro, cobre, zinc, manganeso y molibdeno).

Mutación: Cambio brusco en el genotipo o en elementos hereditarios del citoplasma transmitido hereditariamente.

Patógeno: ser vivo (hongos, bacterias y virus) que causa enfermedades en las plantas.

Plantas in vitro: Plantas provenientes del cultivo de tejidos. También conocidos en general, como meristemas cuando proceden de tejido meristemático.

Pecíolo: Porción de hojas que la conecta con el tallo.

Seudotallo: Se denomina así al tronco o vástago de la planta de banano, esta sección está formada por los pecíolos de las hojas.

Yemas: se refiere al meristemo, los primordios foliares y foliolos que lo protegen.