

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA
PROPAGACIÓN *in vitro* DE GUARANGO *Caesalpinia spinosa*
(*Molina*) Kuntze, A PARTIR DE PLÁNTULAS COMO
HERRAMIENTA PARA LA PRESERVACIÓN DE ESTA
ESPECIE**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

Ingeniera en Biotecnología

ELABORADO POR:

ZAYDA JACQUELINE LOZANO HARO

SANGOLQUÍ, 3 de Junio de 2011



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Zayda Jacqueline Lozano Haro

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Dr. Mario Lozada Paredes

Sangolquí, 3 de Junio de 2011



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Señorita **ZAYDA JACQUELINE LOZANO HARO** como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

Sangolquí, 3 de Junio de 2011

M.Sc. Tatiana Páez.

DIRECTORA

Ing. Marco Taipe.

CODIRECTOR

Zayda Jacqueline Lozano Haro

Declaro que:

El proyecto de grado denominado **Í Establecimiento de un protocolo para la propagación *in vitro* de Guarango *Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze*, a partir de plántulas como herramienta para la preservación de ésta especie**, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 3 de Junio de 2011

Zayda Jacqueline Lozano Haro



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

AUTORIZACIÓN

Yo, Zayda Jacqueline Lozano Haro

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **Í Establecimiento de un protocolo para la propagación *in vitro* de Guarango *Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze*, a partir de plántulas como herramienta para la preservación de ésta especie**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 3 de Junio de 2011.

Zayda Jacqueline Lozano Haro



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

DEDICATORIA

A mis padres por ser mi guía y la luz en mi camino, por demostrarme con su ejemplo que todos los obstáculos pueden superarse y todas las metas pueden cumplirse.

A mis hermanas Carolina y Mónica por creer en mí y brindarme siempre su apoyo durante toda mi carrera.

A mis angelitos Andrés y Alejandra por ser la alegría de mi corazón.

Zayda Lozano



AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional y su paciencia durante el tiempo que duró la realización de este proyecto.

A la Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas, y a todo el personal que labora en el Área de Producción Vegetal, en especial a Cristian Reyes y Fabián Díaz por aportar sus valiosos conocimientos y sugerencias al presente trabajo, pero sobre todo por su amistad.

A la Ing. Tatiana Páez y al Ing. Marco Taipe por su asesoría, su tiempo y sus valiosas observaciones.

A ECOPAR, en la persona del Ing. Kelvin Cueva, por su apertura y colaboración en la recopilación bibliográfica.

A los ingenieros: Pedro Romero, Segundo Aguilar y Rita Vinueza por sus sugerencias y su apoyo.

A Natalia y Patricia por acompañarme durante ésta etapa y a todos mis amigos por brindarme siempre esa palabra de aliento para seguir adelante.

Zayda Lozano Haro

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo para la propagación *in vitro* del guarango *Caesalpinia spinosa*, como una herramienta para la preservación de ésta especie. Para la fase de establecimiento del cultivo se utilizaron como explantes plántulas de cuatro meses de edad, la cuales fueron desinfectadas utilizando hipoclorito de sodio, la solución más efectiva fue aquella con una concentración de 1.5% de principio activo en un tiempo de inmersión de 15 minutos, alcanzando una sobrevivencia del 66.67%. Para controlar la oxidación fenólica se utilizaron tres estrategias: el carbón activado, la oscuridad durante los siete primeros días de incubación y una solución de cisteína, además de un grupo que actuó como testigo. El carbón activado y la oscuridad demostraron ser las estrategias más efectivas durante ésta etapa. El medio de cultivo durante el establecimiento fue medio Murashige y Skoog completo y a la mitad de su concentración adicionado con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina y aunque no se encontraron diferencias estadísticas significativas la tasa de multiplicación fue ligeramente superior para el medio Murashige y Skoog completo con 2 mg.L^{-1} de 6-bencilaminopurina. Durante la fase de multiplicación se utilizó los mismos medios basales ésta vez adicionados con 6-bencilaminopurina sola y combinada con kinetina. En éste caso la combinación de ambas citoquininas resultó ser muy poco eficiente debido posiblemente a un desbalance en el equilibrio tisular de auxinas-citoquininas. Finalmente para la etapa de enraizamiento se continuó con la utilización de los mismos medios basales, ahora enriquecidos con una combinación de auxinas alcanzando los mejores resultados en el medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración adicionado con 1 mg.L^{-1} de ácido indolbutírico y $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, con un enraizamiento de 40% y una longitud promedio de raíz principal de 1,73 cm.



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ABSTRACT

The aim of this study was to establish a protocol for *in vitro* propagation of guarango, *Caesalpinia spinosa*, as a tool for the preservation of this species. For the establishment phase were used as explants seedlings of four months, which were disinfected using sodium hypochlorite, the most effective solution was the one with a concentration of 1.5% of active ingredient in a soak time of 15 minutes , reaching a 66.67% survival. To control phenolic oxidation using three strategies: activated charcoal, darkness during the first seven days of incubation and a solution of cysteine together with a control group. The activated charcoal and darkness strategies proved most effective during this phase. For the establishment phase was tested on half-strength Murashige and Skoog and complete medium added with different concentrations of 6-benzylaminopurine and although there were no statistically significant differences in the multiplication rate was slightly higher for the Murashige and Skoog complete 2 mg.L⁻¹ of 6-benzylaminopurine. During the multiplication is used the same basal media this time added with 6-benzylaminopurine alone and in combination with kinetin, in this case the combination of both cytokinins proved to be very inefficient, possibly due to a hormonal imbalance in the tissues. Finally, to the rooting stage was continued using the same basal media, now fortified with a combination of auxin reaching the best results on half-strength Murashige and Skoog medium supplemented with 1 mg.L⁻¹ indole butyric acid and 0.5 mg.L⁻¹ naphthalene acetic acid , with a rooting of 40% and an average length of 1.73 cm taproot.

ÍNDICE

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	..ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	..vi
ÍNDICE DE CUADROS	...viii
ÍNDICE DE TABLAS	..ix
ÍNDICE DE FIGURAS	...xii
ÍNDICE DE ANEXOS	...xiv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	..xviii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema:	1
1.2 Justificación del problema:	2
1.3 Objetivos de la investigación:	5
1.4 Marco Teórico:	6
1.4.1 Descripción botánica y forestal de la especie	6
1.4.2 Situación actual de la especie en la Región Andina	8
1.4.3 Potencialidades del Guarango	13
1.5 Cultivo <i>in vitro</i>	17
1.5.1 Micropropagación	18
1.6 Hipótesis	23

MÉTODOS	24
2.1 Inoculación y enraizamiento	24
2.2 Localización del Estudio	25
2.3 Período de Tiempo:	25
2.4 Procedimientos:	26
2.4.1 Tratamiento pre-germinativo.....	26
2.4.2 Manejo y cuidado de plántulas	27
2.5 Preparación de medio.....	28
2.6. Desinfección de los explantes	29
2.7 Control de oxidación	31
2.8 Establecimiento del cultivo.....	33
2.9 Multiplicación	35
2.10 Enraizamiento.....	36
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	38
3.1 Fase de desinfección.....	38
3.2 Fase de control de oxidación	45
3.3 Establecimiento.....	48
3.4 Multiplicación	52
3.5 Enraizamiento	56
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	62
4.1 Etapa de desinfección.....	62
4.2 Etapa de control de oxidación.....	64
4.3 Etapa de establecimiento.....	66
4.4 Etapa de multiplicación	68
4.5 Etapa de enraizamiento	69
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO 5: RECOMENDACIONES	73
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA	75



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro1.1 Distribución geográfica del Guarango en el Ecuador.	10
Cuadro 2.5 Composición de las sales minerales y vitaminas del Medio Murashige y Skoog .Murashige y Skoog (1962).....	28

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Tratamientos de desinfección con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y con diferentes tiempos de inmersión.	30
Tabla 2.2 Tratamientos para el control de oxidación de los explantes. Quito, 2010.	32
Tabla 2.3 Niveles de oxidación considerados para la evaluación de los tratamientos. Quito, 2010.	33
Tabla 2.4 Tratamientos para el establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia spinosa</i> . Quito, 2010.	34
Tabla 2.5 Tratamientos para la etapa de multiplicación del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia spinosa</i> . Quito, 2010.	35
Tabla 2.6 Tratamientos para la etapa de enraizamiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia spinosa</i> Quito, 2010.	36
Tabla 3.1 Frecuencias y porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia para cada tratamiento en la etapa de desinfección. Quito, 2010.	38
Tabla 3.2 Prueba de Chi cuadrado para los diferentes tratamientos ensayados durante la fase de desinfección Quito, 2010.	39
Tabla 3.3 Frecuencias y porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia de los explantes según la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, 2010.	41
Tabla 3.4 Prueba de Chi Cuadrado para la contaminación, mortalidad y sobrevivencia de los explantes de <i>Caesalpinia spinosa</i> durante la etapa de desinfección. Quito, 2010.	42
Tabla 3.5 Frecuencias y porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia de los explantes según el tiempo de inmersión. Quito, 2010.	44

Cuadrado para la contaminación, mortalidad y tiempo de inmersión. Quito, 2010.	44
Tabla 3.7 Grado de oxidación de los explantes según los diferentes tratamientos antioxidantes utilizados. Quito, 2010.....	46
Tabla 3.8 Prueba Chi cuadrado para los diversos tratamientos antioxidantes. Quito, 2010.....	46
Tabla 3.9 Contaminación, mortalidad, sobrevivencia y tasa de multiplicación para los diferentes medios y hormonas. Quito, 2010.	49
Tabla 3.10 Análisis de varianza para los diferentes tratamientos durante la fase de establecimiento. Quito, 2010.....	49
Tabla 3.11 Medias de la tasa de multiplicación según la concentración de medio basal. Quito, 2010.	50
Tabla 3.12 Medias de la tasa de multiplicación según la concentración de bencilaminopurina en el medio. Quito, 2010.	50
Tabla 3.13 Medias de la tasa de multiplicación según los diferentes tratamientos ensayados durante la fase de establecimiento. Quito, 2010.	51
Tabla 3.14 Contaminación, mortalidad, sobrevivencia y tasa de multiplicación durante la fase de multiplicación. Quito, 2010.....	53
Tabla 3.15 Análisis de varianza para la tasa de multiplicación durante la fase de multiplicación. Quito, 2010.	53
Tabla 3.16 Prueba de Tukey para las diferentes concentraciones de medio basal. Quito, 2010.....	54
Tabla 3.17 Prueba de Tukey para las diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina.	54
Tabla 3.18 Prueba de Tukey para las diferentes concentraciones de kinetina. Quito, 2010.....	55
Tabla 3.19 Prueba de Tukey para los diferentes tratamientos utilizados durante la fase de multiplicación.....	55

variables medidas durante la fase de enraizamiento.	57
Tabla 3.21 Análisis de Varianza para la longitud del explante durante la fase de enraizamiento <i>Caesalpinia spinosa</i> . Quito, 2010.	57
Tabla 3.22 Prueba de Tukey para la longitud del explante según el tipo de medio basal durante la fase de enraizamiento. Quito, 2010.	58
Tabla 3.23 Análisis de varianza de la longitud de raíz para cada uno de los tratamientos aplicados durante la fase de enraizamiento. Quito, 2010.	60
Tabla 3.24 Prueba de Tukey para la longitud de raíz para cada uno de los tratamientos aplicados durante la fase de enraizamiento. Quito, 2010.	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Plántulas de <i>Caesalpinia spinosa</i> , a los 15 días de su siembra en sustrato. Quito, 2010.....	27
Figura 2.2 Fase de establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia spinosa</i> . Quito, 2010.....	34
Figura 3.1 Análisis de correspondencias múltiples de los diferentes tratamientos con respecto a las tres variables en estudio. Quito, 2010.....	40
Figura 3.2 Porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia de los explantes de <i>Caesalpinia spinosa</i> para los diferentes tratamientos de la etapa de desinfección. Quito, 2010.....	41
Figura 3.3 Porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia de los explantes de <i>Caesalpinia spinosa</i> según las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. Quito, 2010.....	43
Figura 3.4 Porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia según los diferentes tiempos de inmersión. Quito, 2010.....	45
Figura 3.5 Análisis de correspondencias de los niveles de oxidación respecto a los diferentes tratamientos de control de oxidación. Quito, 2010.	47
Figura 3.6 Niveles de oxidación respecto a los diferentes tratamientos de control de oxidación en los explantes de <i>Caesalpinia spinosa</i> . Quito, 2010.....	48
Figura 3.7 Tasa de multiplicación para los diferentes medios de establecimiento de <i>Caesalpinia spinosa</i> . Quito, 2010.....	51
Figura 3.8 Comportamiento de la tasa de multiplicación según las diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina para cada medio utilizado. Quito, 2010.....	52
Figura 3.10 Longitud del explante para los diferentes tratamientos de enraizamiento utilizados. Quito, 2010.	58

explante para los diferentes tratamientos de
, 2010. 59

Figura 3.12 Porcentaje de enraizamiento según las diferentes concentraciones de
medio basal para las diferentes combinaciones de hormonas. Quito, 2010. 59

Figura 3.13 Longitud promedio de la raíz principal para los diferentes tratamientos
probados durante la fase de enraizamiento. Quito, 2010..... 61

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A Tasa de multiplicación para los diferentes medios utilizados durante la fase de establecimiento de <i>Caesalpinia spinosa</i>	83
ANEXO B Tasa de multiplicación para los diferentes medios utilizados durante la fase de multiplicación de <i>Caesalpinia spinosa</i>	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO C Longitud del explante para los diferentes medios utilizados durante la fase de enraizamiento de <i>Caesalpinia spinosa</i>	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO D Formación de raíz para los diferentes medios utilizados durante la fase de enraizamiento de <i>Caesalpinia spinosa</i>	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO E Fotos del establecimiento de los explantes de <i>Caesalpinia spinosa</i> según los diferentes medios utilizados.....	88
ANEXO F Fotos de la etapa de multiplicación de los explantes de <i>Caesalpinia spinosa</i> según los diferentes medios utilizados.	91
ANEXO G Fotos de la etapa de enraizamiento de los explantes de <i>Caesalpinia spinosa</i> según los diferentes medios utilizados.	95

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema:

El Ecuador es reconocido internacionalmente como un país megadiverso. Sin embargo, esta riqueza ha disminuido notablemente en las últimas décadas como consecuencia de una descontrolada expansión agropecuaria impulsada por la apremiante necesidad de los sectores rurales de mejorar sus condiciones económicas (USAID, 1998).

Las consecuencias de la sobre explotación de recursos naturales han sido notorias. Por un lado los agricultores sustituyeron las especies nativas por el cultivo de plantas genéticamente mejoradas, con lo cual hubo una importante pérdida de biodiversidad. Las metodologías que se han implementado requieren también la utilización de enormes cantidades de agua para irrigación y, adicionalmente se ha dado énfasis al desarrollo y uso de plaguicidas y sustancias agroquímicas de gran impacto para el medio ambiente. (FAO, 2009)

Entre las especies desplazadas por la plantas exóticas, los árboles nativos, revisten una importancia especial, ya que no solo sufren las consecuencias de las actividades agropecuarias, sino también su sobre

tarios, ya sea para madera, carbón u otros usos y Ortiz, 2005_a).

Una de las especies endémicas que ha sido relegada sistemáticamente por el desconocimiento de sus bondades y la introducción de especies maderables exóticas es el guarango, *Caesalpinia spinosa*, conocido también como tara o vinillo en otros países de la región andina es una especie arbórea perenne perteneciente a las *Fabaceae* que se encuentra distribuida desde Venezuela hasta Chile y Bolivia (Mancero, 2008).

La tara o guarango es una especie de múltiples propósitos, tanto industriales como ambientales y actualmente es considerada como una especie prioritaria en programas de agroforestería y restauración del capital natural. (PROFORESTAL, 2009)

1.2 Justificación del problema:

La *Caesalpinia spinosa*, conocida en Ecuador como guarango, es una especie nativa de la región andina que crece en lugares áridos y semiáridos, la cual ha sido utilizada desde la época prehispánica para la elaboración de tintes, el curtido de pieles e incluso en la medicina folclórica popular (Mancero, 2008).

Los ancestrales de ésta especie, se ha descubierto en un candidato como mejorador de suelos, ya que posee la capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico en la tierra, y por tratarse de una especie perenne representa una gran alternativa para programas de agroforestación (Nieto, *et al.*, 2005_a).

Sin embargo su valor económico más relevante, está sustentado por el alto contenido de taninos que se obtienen de sus vainas, lo cual le confiere el privilegio de ser un producto de exportación a precios competitivos, que sin duda alguna, va a beneficiar significativamente en la economía campesina e indirectamente en la economía urbana. (Flores, Chávarry y Vega, 2005).

En años recientes el potencial del guarango como agente curtidor vegetal ha empezado a ser explotado en la industria textil con gran éxito debido a la tendencia creciente en la utilización de productos menos contaminantes, y a las nuevas legislaciones que limitan el uso de metales pesados en productos de consumo masivo.

Una de las principales ventajas de la utilización del guarango para la curtiembre es su escasa cantidad de colorante, lo cual lleva a obtener cuero muy claro y de gran resistencia a la luz, por lo que en la industria de cueros de lujo ésta especie se encuentra altamente valorada (SIPPO, 2010).

Además de las ventajas anteriormente mencionadas, esta especie posee la particularidad de contener taninos en sus frutos, volviéndola más rentable, frente a otras especies, como el castaño, *Castanea sativa*, la mimosa, *Acacia mollissima*, y el quebracho, *Schinopsis* spp, los cuales

la corteza de la planta, es decir que para poder
quiere de la destrucción del ejemplar, con lo cual el
proceso de producción se vuelve menos eficiente (Flores, 2005).

Otro producto de gran importancia comercial que se obtiene del
guarango, es la harina con alto contenido proteico, que se puede conseguir a
partir de las semillas, de las cuales también se obtienen gomas y aceites muy
útiles como espesantes en la industria alimenticia (Nieto *et al.*, 2005_a).

Sin embargo, la importancia del guarango no se limita únicamente a su
valor comercial, puesto que, ésta especie es de gran interés ambiental, al igual
que la gran mayoría de las especies que pertenecen al género *Fabaceae*, el
guarango tiene la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico en sus nódulos
radicales y, a través del metabolismo, almacenarlo en su componente forrajero
(hojas, peciolos, tallos tiernos y frutos) en forma de proteína cruda , lo cual lo
convierte en una especie idónea para la recuperación de suelos degradados
(Botero, 1998).

Adicionalmente como señalan Nieto y Barona (2005), el guarango tiene
un importante potencial paisajístico, por tratarse de una especie poco exigente
en cuanto a sus condiciones edafo climáticas, es una especie ideal para los
programas de restauración del capital natural y de plantaciones de importancia
comercial.

A pesar del enorme potencial industrial y ambiental que posee el
guarango, ésta especie se ha visto desplazada por cultivos como el maíz,

esto ha conllevado a una importante pérdida de especie. Aunque en la Sierra Central aún pueden encontrarse con cierta facilidad ejemplares de guarango, éstos no poseen las características fenotípicas ideales, por el contrario son muy escasos aquellos individuos que presentan una altura adecuada, gran producción de flores y copa simétrica por nombrar solo unas pocas características importantes.

En este contexto se vuelve imperativo rescatar la diversidad genética de estos árboles para utilizarlos en programas de restauración del capital natural. Es así que mediante el presente trabajo se busca la propagación *in vitro* de *Caesalpinia spinosa*, a partir de plántulas que permita fortalecer la presencia de esta especie endémica y de enorme importancia económica y ambiental.

1.3 Objetivos de la investigación:

1.3.1 Objetivo General:

Establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de *Caesalpinia spinosa*, a partir de plántulas, como herramienta para la producción a gran escala de esta especie.

1.3.2 Objetivos específicos:

- Establecer el protocolo de desinfección apto para el establecimiento del cultivo *in vitro* de las plántulas de *Caesalpinia spinosa*.

el tratamiento antioxidante más adecuado para el
cuidado de los explantes.

- Establecer la composición adecuada de sales orgánicas e inorgánicas y reguladores de crecimiento para el establecimiento del cultivo *in vitro*.
- Determinar el medio de cultivo más adecuado y la concentración óptima de reguladores de crecimiento para la fase multiplicación de la micropropagación de *Caesalpinia spinosa*.
- Determinar el medio de cultivo más adecuado para el enraizamiento de los explantes de *Caesalpinia spinosa*.

1.4 Marco Teórico:

1.4.1 Descripción botánica y forestal de la especie

El guarango, cuyo nombre botánico es *Caesalpinia spinosa* (Molina) *Kuntze*¹, conocido en Perú como *Guarango* o *Guaranga*, o bajo el nombre de *Guarango* en Colombia, es una especie perteneciente al género de los *Caesalpineas* de

1

El nombre de esta especie fue dado en honor al naturista italiano Andrea Caesalpinio (1594-1663). Inicialmente el botánico Molina ubicó a esta especie dentro del género *Ponciana*, pero en 1898 otro botánico, Kuntze, lo cambió a *Caesalpinia*, y es el género más aceptado en la actualidad.

, la cual a su vez se incluye dentro de la orden 5a).

En el aspecto morfológico se trata de un árbol pequeño, de 2 a 5 metros de alto, que se caracteriza por tener un fuste recto y corto, el cual está recubierto por una corteza gris y agrietada que culmina con una copa generalmente irregular de forma aparasolada formada por ramas cortas y ascendentes las cuales se encuentran cubiertas de espinas cónicas (Flores, *et al.*, 2005).

Sus hojas son compuestas y bipinnadas, con 2-3 (4) pares de pinas articuladas al raquis, posee entre 5 y 8 pares de foliolos coriáceos y oblongos ubicados de forma oblicua a la base. Las flores, que son hermafroditas, poseen una coloración que varía entre rojizo y amarillo, se encuentran dispuestas en forma de racimos densos de entre 8 y 12 cm de longitud con eje pubescente, el cáliz de tubo corto infundibuliforme, 5 sépalos de 7 mm, de los cuales el inferior es más grande, cóncavo, pectinado-dentado y proyectado hacia afuera. (Orwa, *et al.* 2009)

Las frutos son vainas rojizas indehiscentes tienen una longitud de entre 8 y 10 cm por 1.5 a 2.5cm de ancho, las mismas que contienen entre 8 y 10 semillas, de forma redondeada las cuales se tornan de color pardo oscuro al llegar a la madurez. El mesocarpio se caracteriza por su consistencia blanda y transparente con altas concentraciones de metionina y triptófano, además de otras proteínas y grasas (Flores, *et al.*, 2005).

La cosecha comienza generalmente en septiembre y llega hasta enero, dependiendo del lugar donde se encuentre. De la misma forma la cosecha se comienza en enero y puede extenderse hasta agosto (Orwa *et al.*, 2005).

Su madurez comercial inicia entre los 4 y 6 años dependiendo de las condiciones de riego y alcanza su mayor producción a los 15 años, comienza a declinar desde los 65 años volviéndose improductivo a los 85 años (Mancero, 2008).

1.4.2 Situación actual de la especie en la Región Andina

El guarango o tara es una especie perenne distribuida ampliamente a través de toda la región andina y con una presencia preponderante en Perú (Ureña, Pombo y Cifuentes, 2007).

Se encuentra fundamentalmente en ecosistemas como el de Matorral Seco Montano, Montano Bajo y Bosque Seco Montano en altitudes que varían desde los 1500 a los 3200 m.s.n.m (Narváez, *et al.*, 2009).

Se le considera una especie *híbrida*, y de gran plasticidad por cuanto tolera bien las sequías y se adapta fácilmente a diversos tipos de suelo. Sin embargo, cabe señalar que el guarango es sensible a los fríos extremos, así

humedad relativa superior al 80% (Nieto y Barona,

A pesar de su gran adaptabilidad el guarango se establece mejor bajo ciertas características edafo climáticas, éstas son: un suelo con pH de entre 6.8 y 7.5, temperaturas de entre 14 y 28°C además de una precipitación anual que fluctúe entre 660 y 1730 mm (Orwa *et al.*, 2009).

El guarango tiene amplia distribución en la Región Andina, pudiéndose encontrar entre 4°N en Venezuela hasta los 32° Sur en las zonas australes de Chile (Narváez, *et al.*, 2009). Sin embargo, es Perú el país que posee la mayor área de bosques naturales de ésta especie, encontrándose disperso por la Costa y Sierra norte en los departamentos de Cajamarca y La Libertad, hasta el sur de dicho país en los departamentos de Huánuco, Junín, Ayacucho, Arequipa, y Cuzco entre otros (Flores *et al.*, 2005).

En el Ecuador el guarango se distribuye en los valles bajos de la Sierra, en zonas semiáridas, con baja precipitación y humedad relativas. Se lo encuentra generalmente en estado silvestre y como plantas aisladas formando parte de linderos o cercas vivas (Nieto y Barona, 2005_b).

presenta la distribución geográfica del guarango en

Cuadro1.1.- Distribución geográfica del Guarango en el Ecuador.

Provincia	Sitios de dispersión
Carchi	Bolívar, Mira, Valle del Chota.
Imbabura	Pimampiro, Urcuquí, Ibarra, Atuntaqui, Chaltura, Ambuquí, Chugá, Angochahua, San Roque.
Pichincha	Guayllabamba, San Antonio de Pichincha, Quinche, Pomasqui, San José de Minas, Perucho, Tumbaco.
Cotopaxi	Salcedo.
Tungurahua	Ambato, Patate, Panzaleo.
Chimborazo	Riobamba, Guano, Penipe, Alausí, Chunchi, Guasuntos.
Bolívar	Guaranda, Chimbo
Cañar	Azoguez, Gualleturo, Loyola, Solano, Biblián.
Azuay	Llacao, Solano, Girón, Oña, Santa Isabel, La Dolorosa.
Loja	Saraguro, Gonzamaná, Catamayo, Celica.

Fuente: Acosta-Solís (1961), Hernández (2002), Barona y Ortiz (2006).

A pesar del potencial industrial del guarango en el mercado mundial y de su amplia distribución en los países de la región Andina, tres países: Ecuador, Perú y Bolivia cuentan con una presencia importante de ésta especie en estado natural.

El Perú es el mayor productor de guarango en el mundo, con el 80% de la producción mundial. La producción es básicamente de bosques naturales y, en algunas zonas, de parcelas agroforestales. En este sentido Perú es el país andino

bosques de guarango, seguido muy de lejos por (1995).

En Perú, desde finales del siglo pasado la producción de guarango se convirtió en una actividad rentable, y sus plantaciones extensivas se han concentrado principalmente en cuatro regiones: Cajamarca, Ayacucho, La Libertad y Huánuco, contribuyendo con la economía de más de 40000 familias rurales. En la actualidad se calcula que la producción de Perú supera las 24000 TM, las cuales se destinan enteramente a productos de exportación (Mancero, 2008).

En Bolivia por otra parte, la cadena productiva es aún incipiente y la mayor producción proviene de plantas silvestres, las que no son manejadas adecuadamente con lo cual la producción de las mismas se ve seriamente comprometida. En sectores más alejados el guarango silvestre es sub-explotado, debido a la falta de las vías de comunicación, por lo que no resulta atractivo para el agricultor acopiar, transportar y comercializar dicho producto, el que finalmente es consumido por ganado, principalmente caprino, o permanece en las parcelas hasta su degradación. (ECOBONA, 2005).

En el caso del Ecuador, hasta hace poco tiempo, el guarango había sido desplazado sistemáticamente por especies maderables exóticas, como es el caso, del pino y el eucalipto, quedando únicamente, como señala Narváez (2009) unos pocos ejemplares silvestres destinados como cercas vivas, fuente de leña, y para producción de carbón vegetal.

Actualmente, con la difusión de las propiedades de los subproductos del guarango, se ha dado un gran impulso a su producción en nuestro país, llamando

...ismos gubernamentales y privados. El Estado
...nas de agro forestación a través de la Unidad de
Promoción y Desarrollo Forestal del Ecuador, PROFORESTAL; como de
organizaciones privadas, tal es el caso de CONAPROG, Consorcio de
Productores, de Guarango, que agrupa a productores de los valles bajos de la
sierra, y se ha propuesto como meta ~~pl~~ plantar al menos cinco mil hectáreas en
sistemas diversos y agrupar a los plantadores en un emprendimiento para acopiar,
procesar, y exportar productos y subproductos de guarango, principalmente
taninos y gomas, que tienen una demanda mundial insatisfecha muy grande+
(Desde El Surco, 2008).

Según datos de Mancero (2008), en Ecuador se comercializan alrededor de
84 TM de vaina de guarango, de los cuales el 75% se transforma en polvo de
guarango para exportación, mientras que el 25% es destinado para cubrir la
demanda doméstica de curtidores naturales, cuyos principales demandantes son
negocios artesanales de Ambato, Salcedo, Imbabura y Cotacachi.

Cada uno de éstos sistemas posee características propias, que van más
allá del manejo silvicultural e incluyen un conocimiento profundo de la planta y de
sus potenciales beneficios. (Narváez, et al 2009)



1.4.3 Potencialidades del Guarango

1.4.3.1 Valor Ecológico y Proteccionista del Guarango

Debido a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en el suelo, el guarango es una especie idónea para la recuperación de suelos desgastados. (Botero, 1998)

Como se trata de una especie perenne, es la opción ideal para programas de agroforestería y de cobertura de suelos propensos a la erosión (Nieto, *et al.*, 2005).

Además de lo anteriormente señalado, esta especie tiene otros usos ambientales entre los cuales Orwa (2009) señala al guarango como un componente importante dentro de programas de captura de carbono y la protección de cuencas hidrográficas además de su potencial paisajístico, en cercas vivas e incluso como barrera rompe vientos.

El guarango se caracteriza por ser una especie nativa con gran cantidad de usos no maderables. En la actualidad existen tres subproductos que se obtienen de ésta especie que poseen gran importancia industrial, éstos son:

- Producción de alto contenido de taninos de sus vainas, por lo cual es de gran importancia en la industria de la curtiembre.
- Semillas, con un alto valor proteico, por lo que la harina que se obtiene de las mismas posee un alto valor nutricional.
- El mucílago que se obtiene de sus semillas es de gran importancia como espesante en la industria alimentaria.

1.4.3.2.1 El guarango como agente curtidor.

El valor económico más relevante del guarango, es su valor en el mercado mundial como agente curtidor natural. El alto contenido de taninos que se obtienen de sus vainas, le confiere el privilegio de ser un producto de exportación a precios competitivos, lo cual sin duda alguna representa una enorme ventaja en la economía de sus productores. (Flores *et al.*, 2005).

Uno de los pilares fundamentales que ha permitido el despegue del polvo de guarango como producto de exportación es la prohibición de la Unión Europea

pesados para el curtido de pieles de automóviles,

Además de tratarse de un producto más amigable para el medio ambiente, al tratarse de un producto libre de colorantes permite obtener pieles de colores claros de excelente calidad, y gran resistencia, lo cual implica que sea altamente valorado en el mercado de pieles de lujo (Niето y Barona, 2007).

En Perú, se ha constatado que el guarango proveniente de Ayacucho tiene un contenido de taninos de entre 60 a 62%, mientras que aquel que proviene de Cajamarca contiene un 48 a 52% y aquél que proviene del sur posee un 48% de taninos.

Los taninos provenientes de la tara son estables a la oxidación, por consiguiente, ofrece excelente fotorresistencia haciéndola también muy útil en los procesos de recurtido (SIPPO, 2010).

En Ecuador, se ha llevado a cabo una caracterización molecular de las poblaciones naturales de guarango, con el fin de conocer la variabilidad genética de los mismos y su relación con la concentración de taninos. Este estudio, producto de un trabajo conjunto entre ECOBONA y la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, ha concluido que la variación en la concentración de taninos, ~~es~~ es el resultado de la interacción entre genotipos individuales y el medio ambiente, puesto que no se pudieron determinar ecotipos para la producción de taninos+ (Narváez, et al. 2009)



La goma de guarango o de tara, es un polisacárido soluble en agua, que se obtiene a partir de la molienda del endospermo de las semillas de ésta especie, luego de su separación de la cáscara y el germen (ALNICOLSA, 2002).

La goma de tara es un polvo blanco e insípido que forma un gel viscoso cuando se mezcla con agua. La viscosidad de la solución depende de la longitud de la cadena de galactomanano que contiene. La hidrólisis con ácidos fuertes puede llegar a reducir o abolir la viscosidad de la goma. No obstante, experimentos *in vitro* e *in vivo* sugieren que, aunque la viscosidad puede ser reducida en parte por su paso a través del estómago, la conserva en el intestino delgado mejor que otros tipos de gomas. (ALNICOLSA, 2002)

La goma de tara se usa especialmente para espesar soluciones acuosas y para controlar la movilidad de materiales disueltos y dispersos, posee la ventaja de ser incolora, insípida, muy estable y altamente resistente a la descomposición (Rojas y Ávalos, 2009). Adicionalmente esta goma trabaja bien en bajas concentraciones, menores al 1%, y posee efectos sinérgicos con otras gomas lo que la vuelve más rentable (SIPPO, 2010).

Además de sus aplicaciones en la industria alimenticia la goma de tara también se utiliza en cremas y lociones debido a sus propiedades emulsificantes y adhesivas (SIPPO, 2010).

1.4.3.2.3 El guarango como fuente de ácido gálico

Los taninos concentrados en las vainas del guarango, no solo tienen su aplicación inmediata como agentes curtidores, sino que también son una fuente de ácido gálico, el cual tiene muchas aplicaciones en la industria química.

Del polvo de guarango obtenido a partir de la molienda del fruto de éste árbol, puede obtenerse el extracto tánico mediante un proceso de purificación y posterior secado y luego mediante hidrólisis obtener el ácido gálico. (Mancero, 2008)

El ácido gálico, que es utilizado como antioxidante en la industria del aceite, en la industria cervecera como un elemento blanqueante o decolorante, en fotografía, tintes, como agente curtiembre, manufactura del papel, en productos de farmacia y otros relacionados al grabado y litografía. (ALNICOLSA, 2002)

1.5 Cultivo *in vitro*

En términos generales se puede definir el cultivo *in vitro* como un amplio grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal) se cultiva asépticamente en un medio de composición determinada y bajo condiciones controladas. (Roca, 1993)

La utilización de las técnicas de cultivo *in vitro* puede perseguir una gran variedad de objetivos, entre los más comunes, se utiliza para: a) estudios básicos

ica y ciencias afines; b) bioconversión y producción
control de la variabilidad genética; d) obtención de
plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; f) conservación e
intercambio de germoplasma (Roca, 1993).

1.5.1 Micropropagación

La micropropagación consiste en cultivar asépticamente varias partes de la planta en un medio de cultivo y en virtud de la interacción (sinergismo y antagonismo) de los reguladores de crecimiento, estimular la formación y el desarrollo de brotes axilares o adventicios. La posterior diferenciación de los brotes en plantas completas y su transplante a condiciones de invernadero son los dos pasos finales de este método (Jiménez, 1990).

En el caso de las especies arbóreas las técnicas de micropropagación han demostrado ser una importante alternativa para solucionar problemas de multiplicación y clonación como son:

- Reducción en el tiempo de multiplicación (Villalobos y Thorpe, 1984)
- Producción de grandes cantidades de plantas en superficies reducidas y a bajo costo (George y Sherrington, 1984)
- Mayor control sanitario (Roca, 1993)

Sin embargo, para que la técnica de micropropagación tenga éxito, es indispensable trabajar con el explante adecuado, y conseguir las condiciones de asepsia que aseguren el éxito del procedimiento.

1.5.1.1 El explante

La obtención del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento del cultivo, dicha elección dependerá del objetivo final de la investigación, así como de la especie con la que se esté trabajando. (Roca, 1993)

La propagación *in vitro* de la mayoría de plantas leñosas requiere la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles (Bonga, 1980; Dodds, 1983)

El tamaño del explante es otro factor a tener en cuenta, mientras más grandes sea mayores son las posibilidades de tener éxito, aunque también se incrementan las posibilidades de contaminación.

Existen otros factores importante que se deben tomar en cuenta al momento de la selección de un explante, en especial cuando las plantas madre no se encuentran bajo condiciones controladas, tal es el caso de la época del año en que se realizan los cultivos, y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes.

Es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular y, en forma importante, su balance hormonal. Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven, en una alta proporción, a la



PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ada, y que luego responde eficientemente a las
(Villalobos y Thorpe, 1984)

1.5.1.2 Asepsia

Una vez seleccionado el explante apropiado se requiere desinfectarlo superficialmente, esto debido a la gran cantidad de virus, bacterias y otros patógenos que crecen en la superficie de las plantas y que encuentran en el medio de cultivo un ambiente óptimo para proliferar. (Villalobos y Thorpe, 1984)

Es necesario, sin embargo, señalar que la obtención de un cultivo completamente aséptico, es muy difícil de conseguir, puesto que pueden existir virus que resistan a los procesos de desinfección y persistan en los cultivos. (Roca, 1993)

Existe una amplia gama de compuestos químicos que se pueden utilizar para la desinfección, sin embargo, en la actualidad las soluciones de hipoclorito de calcio, hipoclorito de sodio, y el etanol son los que tienen mayor uso.

Generalmente es conveniente agregar algún agente tenso activo, como el Tween 20, para potenciar el proceso de desinfección, sin embargo en el caso de la utilización del etanol es innecesario hacerlo. (Roca, 1993).

ción debe culminar con un enjuague abundante con cámara, que permita eliminar cualquier resto de los

agentes desinfectantes.

1.5.1.3 Medio de Cultivo

Una vez definido el objetivo del cultivo, es necesario elegir el medio de cultivo más adecuado para nuestros fines.

En la actualidad existe gran variedad de formulaciones, y a pesar de su gran variedad, todas poseen en su composición los siguientes elementos.

- a) Fuente de Carbono
- b) Nutrientes minerales
- c) Vitaminas
- d) Agente gelificante
- e) Reguladores de crecimiento
- f) Otros

a) Fuente de Carbono.- Se puede utilizar gran cantidad de azúcares, pero las más efectivas son la sacarosa o la glucosa. Agregar mioinositol al medio ha demostrado ser de gran utilidad para la formación de callo y suspensiones celulares.

b) Nutrientes minerales.- incluyen básicamente los mismos macro y micronutrientes que se requieren para el crecimiento de plantas enteras. Se pueden realizar variaciones según los requerimientos.

En adicionarse gran cantidad de vitaminas, la de uso
a, seguida de otras vitaminas del grupo B.

d) Agente gelificante.- generalmente agar. Es de especial importancia el grado de pureza del mismo.

e) Reguladores de crecimiento.- de acuerdo a la definición de Bidwell (1979), un regulador de crecimiento es aquel compuesto orgánico distinto de los nutrientes, que en pequeña cantidad estimula, inhibe o modifica de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

Actualmente se reconocen cinco tipos básicos de reguladores del crecimiento divididos en tres grupos principales:

- a) Promotores del crecimiento: auxinas, citoquininas y giberelinas.
- b) Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
- c) Etileno: maduración de frutos, abscisión prematura de las hojas, y otros fenómenos como inducción de floración.

Auxinas: Las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales, incluyendo la regulación de las proporciones del crecimiento diferencial y la regulación de fenómenos de diferenciación, los cuales son estimulados o inhibidos según la concentración auxínica presente en la célula o estructura vegetal. (Hurtado y Merino, 1987)

Las auxinas estimulan el crecimiento de las plantas, e inhiben el desarrollo de las yemas laterales. El representante de éstas hormonas es el ácido indol acético, el cual se deriva del triptófano (Saavedra, 2008).

Citoquininas: Son sustancias químicas que promueven la división celular y organización de callos (Jiménez, 1990).

Desde el descubrimiento de la primera citoquinina, la kinetina, por Skoog el número de citoquininas conocidas se ha incrementado considerablemente tanto aquellas de origen natural como las sintéticas (Mok y Mok, 2001).

La utilización de citoquininas en el cultivo de tejidos es para superar la dominancia apical permitiéndose así la proliferación de yemas axilares (Belen; Georges y Sherrington, 1984).

En la actualidad se reconocen dos tipos de citoquininas, aquellas derivadas de la fenilurea, y las derivadas de la adenina (Mok y Mok, 2001).

Giberelinas: Son hormonas que estimulan el crecimiento de la planta, actuando sinérgicamente con las auxinas. El ácido giberélico es la hormona más conocida de esta clase de compuestos (Saavedra, 2008).

1.6 Hipótesis

Las diferentes concentraciones de sales orgánicas e inorgánicas junto con los reguladores de crecimiento afectan el proceso de establecimiento y multiplicación y enraizamiento del cultivo *in vitro* de *Caesalpinia spinosa*

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Institución Participante

El presente proyecto fue financiado por la Gerencia de Espacio Público de la Empresa Pública de Movilidad y Obras Públicas en el área del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

El desarrollo de la investigación contó con la participación técnica y científica de las personas nombradas a continuación:

2.1.1 Científicos participantes:

Escuela Politécnica del Ejército

- Director del Proyecto: Ing. Tatiana Páez, M. Sc. Docente de la Carrera Ingeniería en Biotecnología.
- Codirector del Proyecto: Ing. Marco Taipe, Docente de la Carrera Ingeniería en Biotecnología.
- Biometrista: Ing. Marco Taipe, Docente de la Carrera Ingeniería en Biotecnología.

- Jefe de Laboratorio: Ing. Cristian Reyes Portilla.
- Jefe de Producción: Ing. Fabián Díaz.

2.2 Localización del Estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Empresa Pública de Movilidad y Obras Públicas del Distrito Metropolitano de Quito, EMMOP, cuya ubicación se detalla a continuación:

Provincia: Pichincha

Cantón: Quito

Parroquia: Tumbaco

Latitud: 0°20'15+S

Longitud: 78°30'24+W

Altitud: 2 200 m.s.n.m.

2.3 Período de Tiempo:

El proyecto se inició el 1 de Septiembre de 2009 y culminó el 15 de Noviembre de 2010.

El desarrollo del presente proyecto incluyó dos etapas, una de invernadero que incluye la germinación y el cuidado de las plántulas, y la otra de laboratorio en la que se desarrolló la micropropagación.

2.4.1 Tratamiento pre-germinativo

Se tomaron semillas de *Caesalpinia spinosa*, procedentes del Banco de Semillas del Vivero Municipal de Cununyacu, las cuales fueron recolectadas en la parroquia de Puéllaro durante el mes de enero de 2009 y se conservaron en frascos herméticamente cerrados a temperaturas de entre -3 y -4 °C en completa oscuridad.

Con el objetivo de aumentar la tasa de germinación, se procedió a la ruptura de tegumentos de las semillas y su posterior inmersión en agua durante cinco días como tratamiento pre-germinativo según recomienda Black (2005).

Una vez escarificadas, las semillas fueron sembradas en bandejas plásticas negras, utilizando como sustrato un preparado comercial que contiene variedad de arcillas, nutrientes y agentes humidificantes. La siembra de la semilla se realizó a una profundidad de 2 a 3 cm.

lo de plántulas

Las bandejas sembradas con las semillas fueron sometidas a riego pasando un día, hasta la aparición del segundo par de hojas, cuando el régimen de riego se amplió de dos a tres días, según los requerimientos climáticos.



Figura 2.1 Plántulas de *Caesalpinia spinosa*, a los 15 días de su siembra en sustrato. Quito, 2010.

El régimen de fertilizaciones y fumigaciones se llevó a cabo según el esquema establecido previamente para todas las plantas del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la EPMMOP.

Los productos utilizados para la fumigación tenían como ingredientes activos el Epoxiconazol y Carbendazin. La fumigación se llevó a cabo de manera semanal y para el efecto se utilizó guantes, mascarilla y gafas protectoras por el riesgo que estos ingredientes representan para la salud.

En vasos de precipitación, se colocó agua destilada a la que se le adicionó medio basal Murashige & Skoog, cuya composición se detalla en el Cuadro 2.1, en concentración de 4.4 g/L, se adicionó sucrosa a una concentración de 30 g/L, los cuales fueron mezclados con ayuda de un agitador magnético. Posteriormente se adicionó agar a concentración de 6 g/L, los reguladores de crecimiento en las cantidades requeridas, así como el carbón activado a una concentración de 0,5 g/L, y se aforó la mezcla al volumen deseado. Para homogenizar la mezcla se utilizó un agitador magnético y calor hasta una temperatura cercana al punto de ebullición.

Cuadro 2.5 Composición de las sales minerales y vitaminas del Medio Murashige y Skoog .Murashige y Skoog (1962).

Sales Macronutrientes(mg·L ⁻¹)		Sales micronutrientes(mg·L ⁻¹)		Vitaminas(mg·L ⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	1650	KI	0.83	Ácido nicotínico	5
KNO ₃	1900	H ₃ BO ₃	6.2	Tiamina HCl	5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	PiridoxinaHCl	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	Inositol	100
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	Sacarosa	3%
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025		
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025		
		Na ₂ ·EDTA	37.3		
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8		

Una vez incorporados todos los componentes requeridos se ajustó el pH a 5.8 +/- 0.2, utilizando soluciones de NaOH 1M y 0.1 M, así como soluciones de HCl 1M y 0.1 M y posteriormente se procedió a dispensar el medio en los tubos de ensayo, 10 ml por cada tubo, y se taparon con papel aluminio.

ron en un autoclave a una presión de 1.05 Kg cm^{-2}

2.6. Desinfección de los explantes

Una vez que las plántulas alcanzaron los cuatro meses de edad y tenían un tamaño aproximado de entre 3.5 y 4.5 cm, se procedió a cortarlas utilizando una navaja empapada en alcohol y colocándolas posteriormente en un recipiente con agua para evitar su deshidratación.

En el laboratorio, los explantes fueron lavados tres veces con agua corriente para eliminar los restos de tierra y otras impurezas. Una vez aclarados se procedió a cortar las hojas dejando únicamente un tallo de 1,5 cm con yemas axilares.

Después de realizar varias pruebas preliminares utilizando hipoclorito de sodio y etanol en distintas concentraciones se observó que las mejores respuestas de daban en los explantes con hipoclorito de sodio y se procedió a diseñar el ensayo con tres concentraciones de este dicho desinfectante: 1%, 1,5% y 2%, en tiempos de: 10, 15 y 20 minutos, como se observa a continuación.

de desinfección con diferentes concentraciones de diferentes tiempos de inmersión.

NaOCl (%)	1.0	1.5	2.0
Tiempo (min)			
10	T ₁ C ₁	T ₁ C ₂	T ₁ C ₃
15	T ₂ C ₁	T ₂ C ₂	T ₂ C ₃
20	T ₃ C ₁	T ₃ C ₂	T ₃ C ₃

Se probaron treinta explantes para cada tratamiento siguiendo un diseño completamente al azar ordenado en un arreglo factorial.

Una vez en la cámara de flujo laminar los explantes fueron enjuagados con agua destilada estéril y luego inoculados en tubos de ensayo que contenían 10 ml de medio Murashige y Skoog (MS). La manipulación se efectuó con pinzas y bisturíes estériles.

Los tubos inoculados con los explantes fueron colocados en la Sala de Incubación con un fotoperiodo de 14 horas a una intensidad de 1600 lux y con una temperatura de 24°C +/- 0-5 °C.

fueron evaluadas las siguientes variables: (%), y sobrevivencia (%).

La primera evaluación se realizó después de cinco días de la siembra y posteriormente se realizaron cuatro evaluaciones más, con intervalos de una semana entre cada una de ellas.

2.7 Control de oxidación

La oxidación de los explantes durante las etapas iniciales del cultivo *in vitro*, representa un limitante importante en el éxito de la micropropagación a gran escala. Para disminuir las consecuencias producidas por los exudados fenólicos de los explantes existen numerosas estrategias, entre las que se incluyen: el control de las condiciones ambientales, la utilización de carbón activado o la inmersión en soluciones antioxidantes (Azofeifa, 2009).

En lo que respecta a la modificación de las condiciones ambientales, la luz es el factor que con mayor frecuencia se manipula tanto en su duración, intensidad, calidad y duración ya sea en el lugar donde crecen las plantas donadoras como en la sala donde se incuban los explantes luego de su siembra (Azofeifa, 2009).

Dado que las plantas donadoras no se encuentran en un invernadero y por lo tanto no es factible controlar su entorno se optó por someter a oscuridad los explantes durante los siete primeros días de incubación.

En cuanto a la utilización de carbón activado, ésta es una medida utilizada con frecuencia desde hace varias décadas en diversas especies y ha demostrado ser exitosa para disminuir los efectos del estrés producido durante el proceso de oxidación (Seneviratne y Wikesejara, 1996).

Se adicionó 0.5 g/L de carbón activado al medio Murashige y Skoog (MS) y una vez inoculados los explantes se les sometió a las condiciones habituales de incubación, esto es un fotoperíodo de 14 horas a una intensidad de 1600 lux y con una temperatura de 24°C +/- 0-5 °C.

Finalmente para llevar a cabo el último tratamiento se sumergió a los explantes en una solución de cisteína 100 mg/L, durante cinco minutos, luego de lo cual se procedió a la inmersión de los mismos en la solución desinfectante y su posterior enjuague. Los explantes fueron incubados bajo las condiciones ambientales anteriormente descritas.

Tabla 2.2 Tratamientos para el control de oxidación de los explantes. Quito, 2010.

Tratamiento	Código
Testigo	T ₁
Oscuridad	T ₂
Carbón activado	T ₃
Cisteína	T ₄

se probaron 20 tubos, siguiendo un Diseño

Para la evaluación se realizó una tabla de contingencia, basándose en el grado de oxidación que presentaba cada tratamiento, se consideraron tres grados de oxidación los cuales se describen en la Tabla 2.3

Tabla 2.3 Niveles de oxidación considerados para la evaluación de los tratamientos. Quito, 2010.

Grado de oxidación	
Leve	0-25%
Moderado	25-50-%
Fuerte	50-75%

2.8 Establecimiento del cultivo

Para el establecimiento del cultivo se probó el medio Murashige y Skoog (1962) completo y reducido a la mitad de su concentración adicionado con diferentes concentraciones de 6-benzilaminopurina (BAP), siguiendo un arreglo factorial como se muestra en la Tabla 2.4

Tabla 2.4 Tratamientos para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Caesalpinia spinosa*. Quito, 2010.

BAP (mg.L ⁻¹)	Medio	
	MS	MS/2
0	M ₁ H ₁	M ₂ H ₁
1	M ₁ H ₂	M ₂ H ₂
2	M ₁ H ₃	M ₂ H ₃

Se trabajó con 30 tubos para cada tratamiento, dando un total de 180 tubos, y siguiendo un Diseño Completamente al Azar.

Durante esta fase la variable estudiada fue la tasa de multiplicación, la misma que viene dada como el número de brotes por explante.

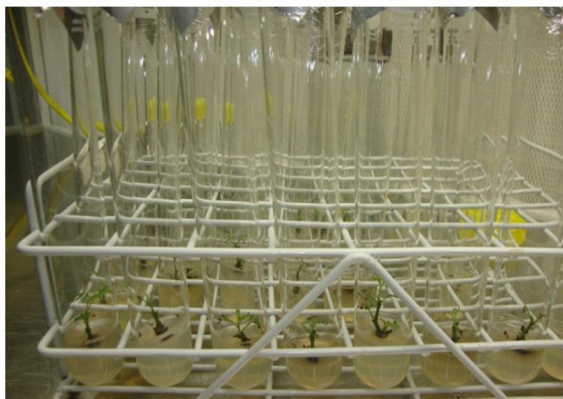


Figura 2.2 Fase de establecimiento del cultivo *in vitro* de *Caesalpinia spinosa*. Quito, 2010.

2.9 Multiplicación

Durante esta fase se trabajó con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina sola y combinada con kinetina, se utilizó el medio Murashige y Skoog (1962) completo y a la mitad de su concentración en un arreglo factorial tal como se muestra en la Tabla 2.5

Tabla 2.5 Tratamientos para la etapa de multiplicación del cultivo *in vitro* de *Caesalpinia spinosa*. Quito, 2010.

Medio Hormonas (mg.L ⁻¹)	MS	MS/2
1 BAP	M ₁ H ₁	M ₂ H ₁
1 BAP+0.5 Kin	M ₁ H ₂	M ₂ H ₂
0.5 BAP	M ₁ H ₃	M ₂ H ₃
0.5 BAP+0.5 Kin	M ₁ H ₄	M ₂ H ₄

Se realizaron 30 repeticiones para cada tratamiento siguiendo un Diseño Completamente al Azar. Para la transferencia al nuevo medio se seleccionaron

ntaban mayor vigor y se descartaron aquellos que

La variable a medir durante esta etapa fue la tasa de multiplicación, y se realizaron cuatro evaluaciones a intervalos de una semana cada una.

2.10 Enraizamiento

En la fase de enraizamiento se utilizaron tres combinaciones diferentes de auxinas, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético en medio Murashige y Skoog (1962) completo y a la mitad de su concentración, como se muestra en la Tabla 2.6

Tabla 2.6 Tratamientos para la etapa de enraizamiento del cultivo *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* Quito, 2010.

Hormonas (mg.L ⁻¹)	Medio	
	MS	MS/2
1 IBA + 0.5 ANA	M ₁ H ₁	M ₂ H ₁
0.5 IBA + 0.25 ANA	M ₁ H ₂	M ₂ H ₂
0.25 IBA + 0.13 ANA	M ₁ H ₃	M ₂ H ₃

Se realizaron 20 repeticiones y se evaluaron cuatro variables: longitud del explante, en centímetros, formación de raíz, longitud de la raíz principal y número de raíces por explante. Se llevaron a cabo cinco evaluaciones, una por semana.

2.11 Análisis de Datos

Los datos correspondientes a la fase de desinfección se analizaron utilizando de tablas de frecuencia y tablas de contingencia, se realizaron además pruebas de Chi Cuadrado.

Para la fase de control de oxidación además de la prueba de Chi Cuadrado y el análisis de frecuencias se llevó a cabo un análisis de correspondencias múltiples.

Finalmente para los resultados de las etapas de establecimiento, multiplicación y enraizamiento se realizó primero la estadística descriptiva con sus respectivas gráficas, y adicionalmente se realizaron Análisis de Varianza y Pruebas de Tukey al 95% de confianza.

Los resultados se analizaron utilizando el Paquete Informático Infostat versión 2010.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Fase de desinfección

Durante la fase de desinfección se trabajó con dos factores: concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión de los explantes. Los resultados para cada uno de los tratamientos llevados a cabo, se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Frecuencias y porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia para cada tratamiento en la etapa de desinfección. Quito, 2010.

NaOCl (%)	Tiempo (min)	Contaminac.		Mortalidad		Sobrevivencia	
		Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
1,0	10	15	50,00	3	10,00	12	40,00
	15	12	40,00	4	13,33	14	46,67
	20	10	33,33	5	16,67	15	50,00
1,5	10	12	40,00	4	13,33	14	46,67
	15	6	20,00	4	13,33	20	66,67
	20	6	20,00	7	23,33	17	56,67
2,0	10	6	20,00	10	33,33	14	46,67
	15	5	16,67	12	40,00	13	43,33
	20	3	10,00	15	50,00	12	40,00

mediante la Prueba Chi Cuadrado se muestra en la Tabla 3.2 que los valores-p no muestran significancia estadística, lo que sugiere que no existen diferencias entre los distintos tratamientos y los resultados de las tres variables en estudio.

Tabla 3.2 Prueba de Chi cuadrado para los diferentes tratamientos ensayados durante la fase de desinfección Quito, 2010

Valor	Contaminación	Mortalidad	Sobrevivencia
Chi Cuadrado de Pearson	0,83	0,24	1
P	0,9339	0,9931	0,9077

Un análisis de correspondencias múltiples, que se muestra en la Figura 3.1 pone en evidencia la relación de cada variable con los tratamientos utilizados, en ella se observa que los tratamientos que utilizan solución de 1% de NaOCl se encuentran más estrechamente relacionados con la contaminación, los tratamientos que incluyen solución de 1.5% de principio activo están mayormente relacionadas con la sobrevivencia, y las soluciones de 2% de NaOCl se encuentran en una relación más cercana con la mortalidad.

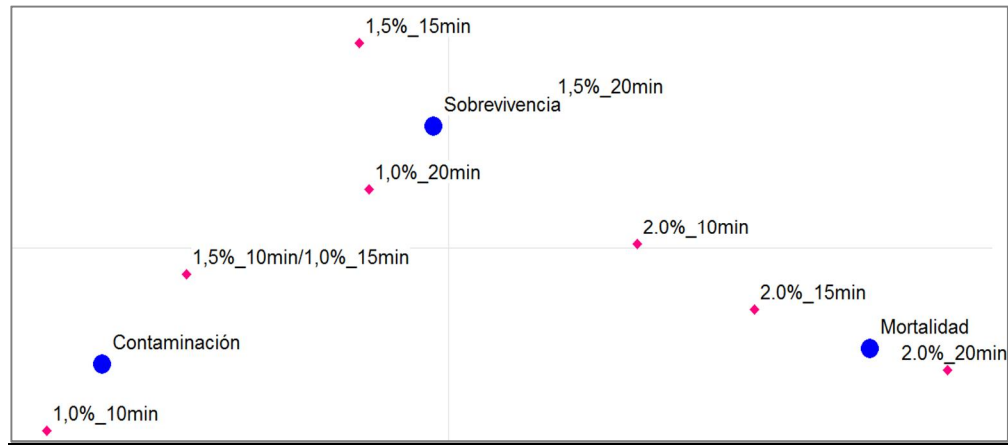


Figura 3.1 Análisis de correspondencias múltiples de los diferentes tratamientos con respecto a las tres variables en estudio. Quito, 2010.

En la Figura 3.2 se muestra el comportamiento de las tres variables en estudio para cada uno de los tratamientos aplicados, la contaminación más elevada se presenta en el tratamiento que incluye 1% de NaOCl y 10 minutos de inmersión con un 50%; la menor contaminación, de 10%, se obtiene al aplicar la solución de 2% de NaOCl durante 20 minutos. La mortalidad más baja se registra con el tratamiento de 1% y 10 minutos, con un 10%, la más elevada corresponde al tratamiento de 2% durante 20 minutos alcanzando un 50%. Respecto a la sobrevivencia, los menores porcentajes, 40%, se obtuvieron con los tratamientos de 1% y 10 minutos de inmersión y 2% y 20 minutos de inmersión y la sobrevivencia más alta corresponde al tratamiento de 1,5% durante 15 minutos alcanzando un 66.67%

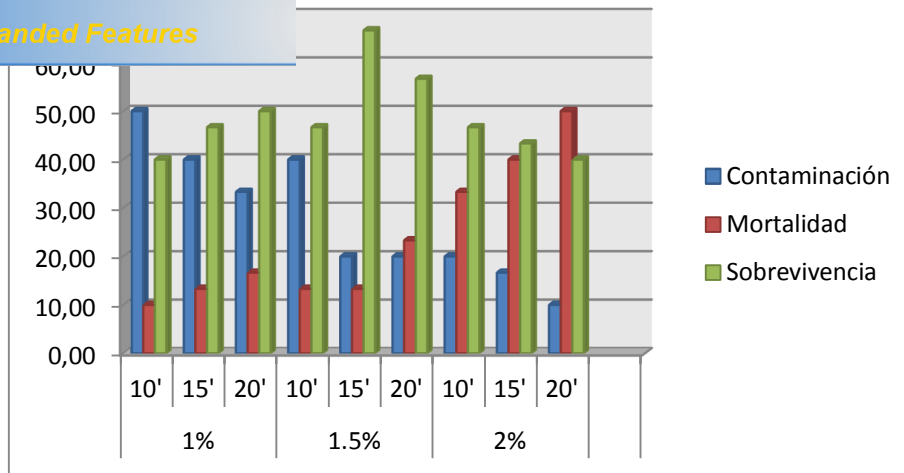


Figura 3.2 Porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia de los explantes de *Caesalpinia spinosa* para los diferentes tratamientos de la etapa de desinfección. Quito, 2010.

Los resultados que se presentan en la Tabla 3.3 corresponden a las frecuencias de contaminación, mortalidad y sobrevivencia con sus respectivos porcentajes únicamente en función de la concentración de hipoclorito de sodio.

Tabla 3.3 Frecuencias y porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia de los explantes según la concentración de hipoclorito de sodio. Quito, 2010.

NaOCl (%)	Contaminación		Mortalidad		Sobrevivencia	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
1,00	37	41,11	12	13,33	41	45,56
1,50	24	26,67	15	16,67	50	55,56
2,00	14	15,56	37	41,11	39	43,33

Prueba de Chi Cuadrado para cada una de las tres variables de contaminación, mortalidad y sobrevivencia, se muestran

en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Prueba de Chi Cuadrado para la contaminación, mortalidad y sobrevivencia de los explantes de *Caesalpinia spinosa* durante la etapa de desinfección. Quito, 2010.

Valor	Contaminación	Mortalidad	Sobrevivencia
Chi Cuadrado de Pearson	10,64	5,35	1,89
P	0,0049	0,0609	0,3881

La tabla muestra que únicamente para la variable contaminación se obtiene una diferencia estadística significativa entre las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio ensayadas.

A pesar de que la Prueba de Chi Cuadrado solo encontró diferencias significativas para la variable de contaminación en la Figura 3.4, podemos observar tendencias en el comportamiento de cada una de las variables para las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio.

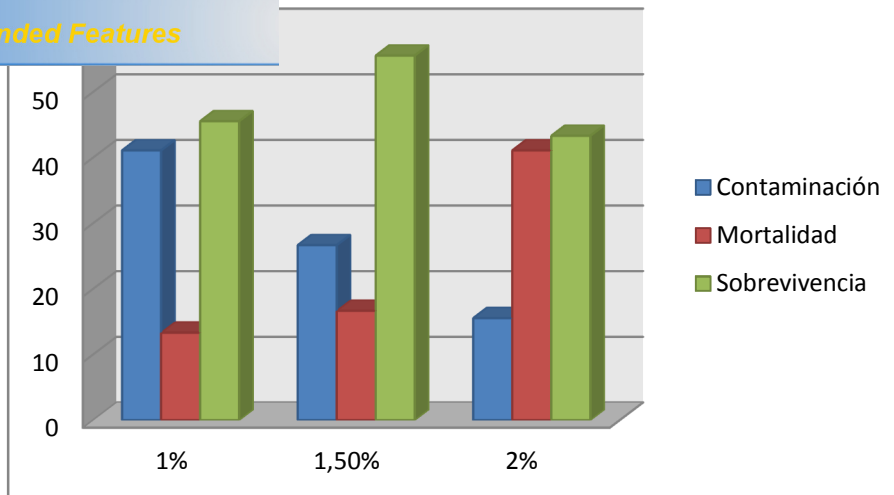


Figura 3.3 Porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia de los explantes de *Caesalpinia spinosa* según las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. Quito, 2010.

La tasa de contaminación es más elevada para la solución de 1% de hipoclorito de sodio alcanzando un 41,11%, y es más baja para la solución de mayor concentración de principio activo con un 15.56%. La mortalidad más baja es de 13.33% y se observa con la menor concentración de hipoclorito de sodio, y la más alta, 41,11% se obtiene al utilizar una solución de 2% de hipoclorito de sodio.

Para el caso de la sobrevivencia, se puede apreciar que la mayor tasa se obtiene al utilizar la concentración intermedia de hipoclorito de sodio, alcanzando un 55.56% de éxito.

En la Tabla 3.5 se muestra un resumen de los resultados de contaminación, mortalidad y sobrevivencia según el tiempo de inmersión.

Tabla 3.5 Frecuencias y porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia de los explantes según el tiempo de inmersión. Quito, 2010.

Tiempo (min)	Contaminación		Mortalidad		Sobrevivencia	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
10	33	36,67	17	18,89	20,33	22,59
15	23	25,56	20	22,22	41,44	46,05
20	19	21,11	27	30,00	49,89	55,43

La prueba de Chi Cuadrado, Tabla 3.6, para cada una de las variables revela que no existen diferencias significativas entre los tiempos de inmersión y la contaminación, mortalidad y sobrevivencia de los explantes.

Tabla 3.6 Prueba de Chi Cuadrado para la contaminación, mortalidad y sobrevivencia en función del tiempo de inmersión. Quito, 2010.

Valor	Contaminación	Mortalidad	Sobrevivencia
Chi Cuadrado de Pearson	4,16	2,47	0,56
P	0,1249	0,2983	0,7539

de cada una de las variables se evidencia en la observa que los mayores porcentajes de sobrevivencia se obtienen con el mayor tiempo de inmersión.

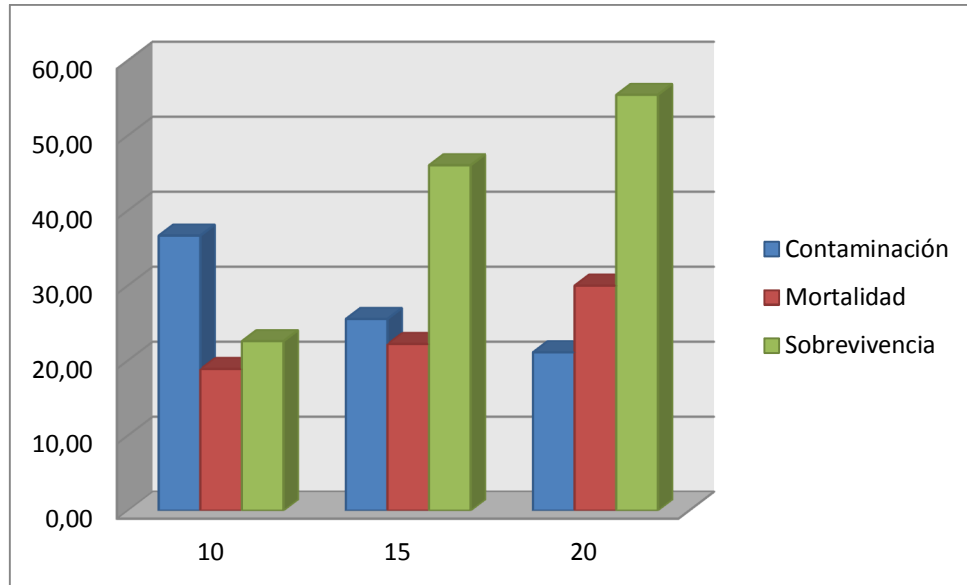


Figura 3.4 Porcentajes de contaminación, mortalidad y sobrevivencia según los diferentes tiempos de inmersión. Quito, 2010.

3.2 Fase de control de oxidación

Los resultados de los diferentes tratamientos utilizados para controlar la oxidación de los explantes, se muestran en la Tabla 3.7

oxidación de los explantes según los diferentes
zados. Quito, 2010.

Tratamientos	Oxidación leve (%)	Oxidación moderada (%)	Oxidación fuerte (%)
Testigo	30,00	40,00	30,00
Oscuridad	31,82	45,45	22,73
Carbón activado	33,33	42,86	23,81
Cisteína	22,73	40,91	36,36

Para la prueba de Chi cuadrado los tratamientos de control de oxidación mostraron significancia estadística, como se puede apreciar en la Tabla 3.8, lo que implica que existe una relación entre los tratamientos utilizados y el nivel de oxidación de los explantes.

Tabla 3.8 Prueba Chi cuadrado para los diversos tratamientos antioxidantes. Quito, 2010.

Estadístico	Valor	Gl	p
Chi cuadrado Pearson	17,98	6	0,0063
Chi cuadrado MV-G2	18,38	6	0,0053
Coef. Contin. Cramer	0,25		
Coef. Contin. Pearson	0,4		

El análisis de correspondencias múltiples, Figura 3.5, sugiere que la utilización de carbón activado en el medio de cultivo se encuentra más estrechamente relacionado con un nivel de oxidación leve, la oscuridad por su parte se relaciona con un nivel de oxidación moderado mientras que, el uso de

una oxidación fuerte, finalmente el testigo muestra los tres niveles de oxidación estudiados.

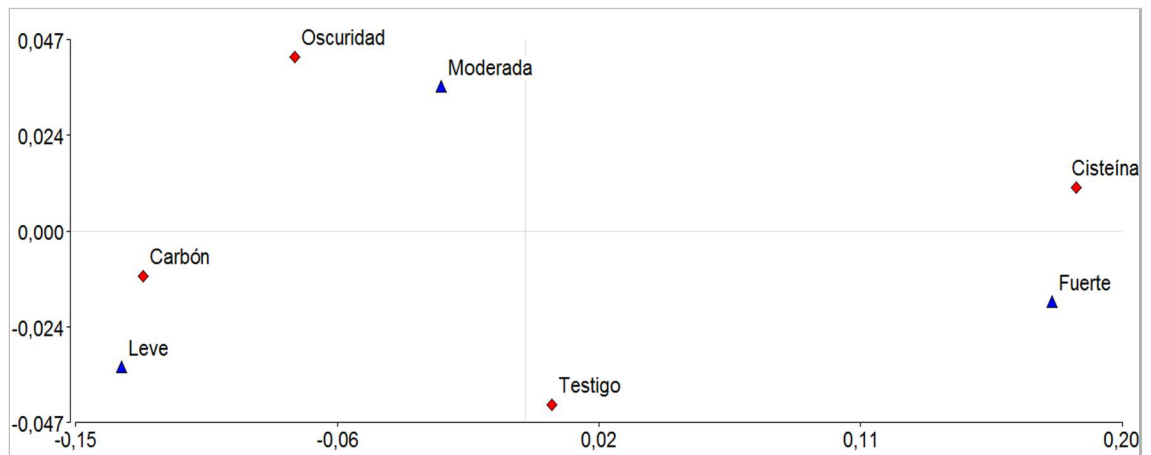


Figura 3.5 Análisis de correspondencias de los niveles de oxidación respecto a los diferentes tratamientos de control de oxidación. Quito, 2010.

Los resultados de los tratamientos de oxidación también se observan en la gráfica de barras Figura 3.6, en donde se puede constatar que las oxidación fuerte tiene mayor presencia en aquellos tratamientos que fueron sometidos al enjuague con cisteína, alcanzando un 36.36%; el tratamiento en base a oscuridad registra los menores niveles de oxidación fuerte, apenas un 22.73%.

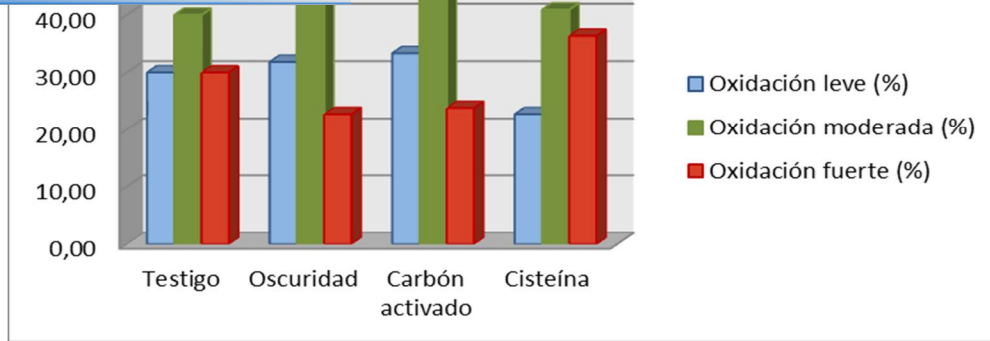


Figura 3.6 Niveles de oxidación respecto a los diferentes tratamientos de control de oxidación en los explantes de *Caesalpinia spinosa*. Quito, 2010.

3.3 Establecimiento

Una vez concluidas las etapas preliminares de desinfección y control de oxidación se realizaron los ensayos de establecimiento en los que se probó el medio Murashige y Skoog (1962) completo y a la mitad de su concentración adicionado con distintas concentraciones de 6-benzilaminopurina.

En la Tabla 3.9 se presenta los resultados resumidos de contaminación, mortalidad, sobrevivencia y tasa de multiplicación de la fase de establecimiento.

on, mortalidad, sobrevivencia y tasa de multiplicación
ormonas. Quito, 2010.

Medio	BAP (mg·L ⁻¹)	Contaminación (%)	Mortalidad (%)	Sobrevivencia (%)	Tasa de multiplicación
MS	0	20,00	10,00	70,00	1,19
	1	30,00	6,67	63,33	1,29
	2	26,67	10,00	63,33	1,42
MS/2	0	20,00	16,67	63,33	1,05
	1	23,33	16,67	60,00	1,17
	2	23,33	10,00	66,67	1,30

En la Tabla 3.10 se encuentra el Análisis de Varianza para los diferentes medios aplicados durante la fase de establecimiento, en la cual se muestra que no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos ensayados y la tasa de multiplicación.

Tabla 3.10 Análisis de varianza para los diferentes tratamientos durante la fase de establecimiento. Quito, 2010.

F. de V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamiento	25,36	117			
Medio	0,50	1	0,50	2,34	0,1287
BAP	1,01	2	0,50	2,37	0,0986
Medio*BAP	0,01	2	4,2E-03	0,02	0,9803
Error	23,89	112	0,21		

A continuación se presentan las tablas de medias según los distintos componentes del medio.

Tabla 3.11 Medias de la tasa de multiplicación según la concentración de medio basal. Quito, 2010.

Medio	Medias
MS	1,30
MS/2	1,17

Tabla 3.12 Medias de la tasa de multiplicación según la concentración de bencilaminopurina en el medio. Quito, 2010.

BAP (mg.L ⁻¹)	Medias	N
2	1,36	60
1	1,21	67
0	1,13	53

de la tasa de multiplicación según los diferentes medios durante la fase de establecimiento. Quito, 2010.

Medio	BAP(mg.L ⁻¹)	Medias	N
MS	2	1,42	30
MS/2	2	1,30	30
MS	1	1,29	30
MS	0	1,19	30
MS/2	1	1,13	37
MS/2	0	1,07	23

En la Figura 3.7 se puede apreciar el comportamiento de la tasa de multiplicación según la composición de los diferentes medios. La mayor tasa de multiplicación, de 1,42, se registra al utilizar el medio MS completo adicionado con 2 (mg·L⁻¹) de bencilaminopurina, y la menor tasa de multiplicación, de 1,07, se observa en el medio MS a la mitad de su concentración libre de hormonas

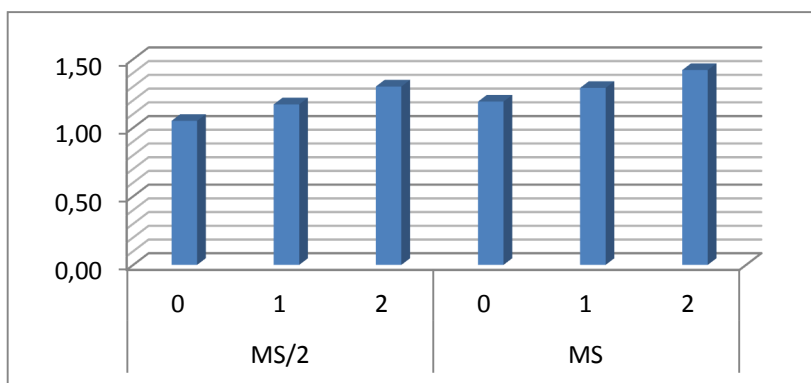


Figura 3.7 Tasa de multiplicación para los diferentes medios de establecimiento de *Caesalpinia spinosa*. Quito, 2010.

En la Figura 3.8 se puede observar el incremento de la tasa de multiplicación según la concentración de 6-benzilaminopurina, tanto para el medio MS completo y MS/2 se observa que existe una relación lineal entre la tasa de multiplicación y el nivel de hormonas, y adicionalmente el medio basal completo es ligeramente superior al medio a la mitad de su concentración.

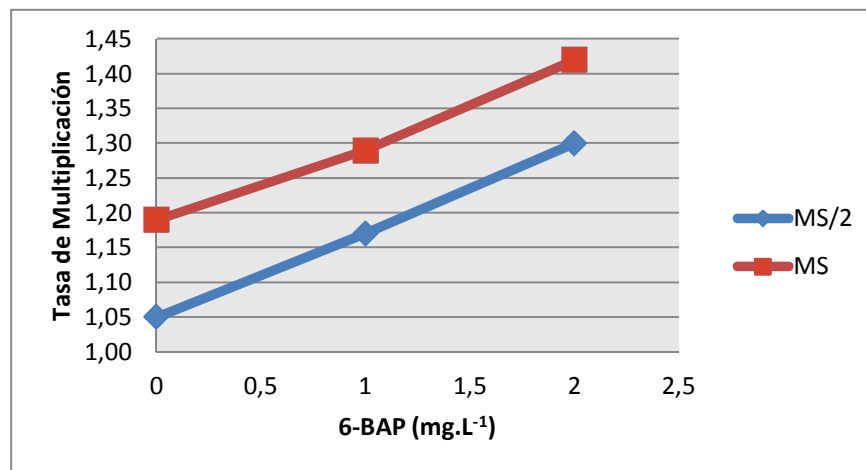


Figura 3.8 Comportamiento de la tasa de multiplicación según las diferentes concentraciones de 6-benzilaminopurina para cada medio utilizado. Quito, 2010.

3.4 Multiplicación

Los resultados de la fase de multiplicación se presentan en la Tabla 3.14, en donde se muestra la contaminación, mortalidad, sobrevivencia y la tasa de multiplicación de los explantes.

nación, mortalidad, sobrevivencia y tasa de multiplicación durante la fase de multiplicación. Quito, 2010.

Medio	Reguladores (mg·L ⁻¹)	Contaminación (%)	Mortalidad (%)	Sobrevivencia (%)	Tasa de multiplicación
MS	0,5 BAP	3,33	0,00	96,67	1,25
	0,5 BAP + 0,5 Kin	3,33	10,00	86,67	1,07
	1 BAP	10,00	3,33	86,67	1,72
	1 BAP + 0,5 BAP	6,67	10,00	83,33	1,38
MS/2	0,5 BAP	0,00	6,67	93,33	1,28
	0,5 BAP + 0,5 Kin	3,33	10,00	86,67	1,24
	1 BAP	0,00	3,33	96,67	2,26
	1 BAP + 0,5 BAP	6,67	10,00	83,33	1,53

En la Tabla 3.15 se presenta el Análisis de Varianza, en el que se puede apreciar que existen diferencias significativas para los distintos medios y concentraciones de hormonas.

Tabla 3.15 Análisis de varianza para la tasa de multiplicación durante la fase de multiplicación. Quito, 2010.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamiento	57,49	133			
Medio	1,61	1	1,61	5,08	0,0259
BAP	8,69	1	8,69	27,47	<0,0001
Kin	3,48	1	3,48	10,99	0,0012
Medio*BAP	0,54	1	0,54	1,70,	0,1953
Medio*Kin	0,14	1	0,14	0,43,	0,5140
BAP*Kin	1,55	1	1,55	4,90,	0,0287
Medio*BAP*Kin	0,55	1	0,55	1,75	0,1885
Error	39,87	126	0,32		

presencia de grupos significativos se realizó una prueba de Tukey para los dos medios de cultivo probados cuyos resultados se presentan en la Tabla 3.16

Tabla 3.16 Prueba de Tukey para las diferentes concentraciones de medio basal. Quito, 2010.

Medio	Medias	n	E.E.		
1	1,58	80	0,07	A	
0,5	1,34	80	0,07		B

La prueba de Tukey para los diferentes niveles de 6-bencilaminopurina revela que los mejores resultados se obtienen al utilizar la mayor concentración, es decir, 1 mg/L de BAP, Tabla 3.17

Tabla 3.17 Prueba de Tukey para las diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina.

BAP (mg·L ⁻¹)	Medias	n	E.E.		
1,0	1,73	80	0,07	A	
0,5	1,19	80	0,07		B

En la Tabla 3.18 se muestran los resultados de la Prueba de Tukey para la concentración de kinetina, en ésta se puede apreciar, que contrario a lo ocurrido con la 6-benzilaminopurina, la presencia de kinetina resulta en menores tasa de multiplicación.

e Tukey para las diferentes concentraciones de kinetina. Quito, 2010.

Kin (mg·L ⁻¹)	Medias	n	E.E.		
0,0	1,63	80	0,07	A	
0,5	1,29	80	0,07		B

Finalmente en la Tabla 3.19, la prueba de Tukey para todos los tratamientos utilizados durante la etapa de multiplicación muestra que los tratamientos que mostraron mayor tasa de multiplicación fueron aquellos que utilizaron la mayor concentración de 6-bencilaminopurina, 1mg/L, mientras que los resultados más pobres correspondieron a los medios que contenían kinetina en combinación con el BAP.

Tabla 3.19 Prueba de Tukey para los diferentes tratamientos utilizados durante la fase de multiplicación. Quito, 2010.

Medio	BAP (mg·L ⁻¹)	Kin (mg·L ⁻¹)	Medias	n	E.E.			
MS	1,0	0,0	2,09	20	0,11	A		
MS/2	1,0	0,0	1,71	20	0,11	A	B	
MS	1,0	0,5	1,60	20	0,11	A	B	
MS/2	1,0	0,5	1,52	20	0,11		B	
MS	0,5	0,0	1,41	20	0,11		B	
MS/2	0,5	0,0	1,32	20	0,11		B	C
MS	0,5	0,5	1,22	20	0,11		B	C
MS/2	0,5	0,5	0,83	20	0,12			C

En la Figura 3.9 se puede apreciar, como la tasa de multiplicación más elevada se obtiene aplicando el medio MS completo adicionado con 6-benzilaminopurina, y la menor tasa de multiplicación ocurre al utilizar el medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración adicionado con 0.5 mg/L de 6-bencilaminopurina y 0,5 mg/L de kinetina.

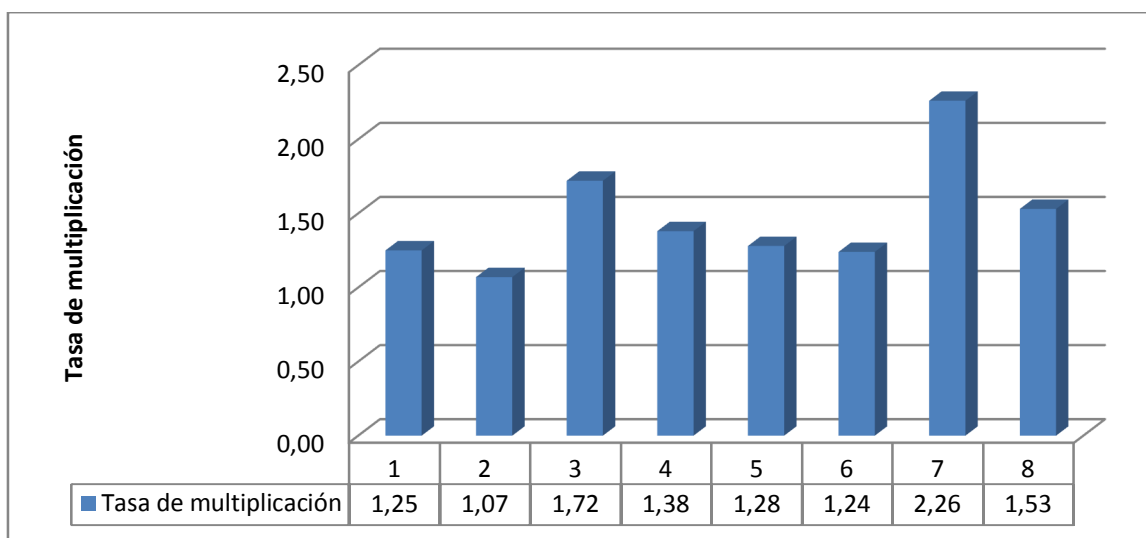


Figura 3.9 Tasa de multiplicación en función del medio utilizado durante la fase de multiplicación. Quito, 2010.

3.5 Enraizamiento

En la Tabla 3.20 se presentan los resultados de longitud promedio del explante, porcentaje de enraizamiento y longitud promedio de la raíz principal para cada uno de los tratamientos durante la fase de enraizamiento.

de las variables medidas durante la fase de

Medio	Reguladores (mg·L ⁻¹)	Longitud del explante (cm)	Enraizamiento (%)	Long. raíz principal (cm)
MS	1 IBA+0,5 ANA	1,65	10,53	0,70
	0,5 IBA + 0,25 ANA	1,44	6,25	0,60
	0,25 IBA + 0,13 ANA	1,37	0,00	-
MS/2	1 IBA+0,5 ANA	1,51	40,00	1,73
	0,5 IBA + 0,25 ANA	1,11	25,00	1,30
	0,25 IBA + 0,13 ANA	1,29	16,67	1,27

La Tabla 3.21 muestra el Análisis de Varianza para la longitud del explante en cada uno de los tratamientos llevados a cabo, allí se observa que los valores-p son estadísticamente significativos tanto para el tipo de medio como para la combinación de hormonas lo que sugiere que ambos factores intervienen en la longitud del explante.

Tabla 3.21 Análisis de Varianza para la longitud del explante durante la fase de enraizamiento *Caesalpinia spinosa*. Quito, 2010.

F de V	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamiento	10	102			
Medio	0,88	1	0,88	10,70	0,0015
Combinación Hormonas	1,77	2	0,88	10,76	0,0001
Medio*Combinación	0,27	2	0,13	1,64	0,1998
Error	7,96	97	0,08		
Total	10	102			

La prueba de Tukey para este caso, Tabla 3.22 revela la presencia de diferencias significativas para el tipo de medio utilizado en esta fase teniendo una media mayor el medio Murashige y Skoog (1962) completo.

Tabla 3.22 Prueba de Tukey para la longitud del explante según el tipo de medio basal durante la fase de enraizamiento. Quito, 2010.

Medio	Medias	n	E.E.		
MS	1,49	53	0,04	A	
MS/2	1,30	50	0,04		B

Los resultados de la longitud del explante se pueden observar más claramente en las Figura 3.10 y 3.11 en la que se aprecia que el medio Murashige y Skoog (1962) completo es el que presenta mayores longitudes.

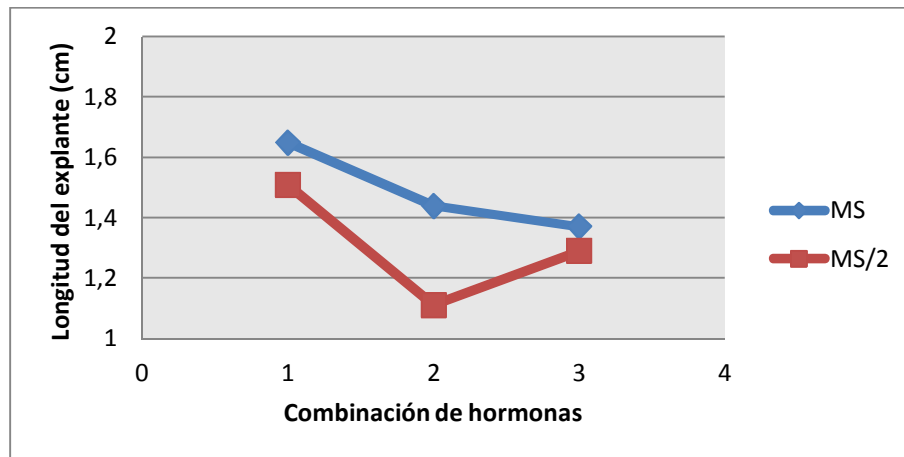


Figura 3.10 Longitud del explante para los diferentes tratamientos de enraizamiento utilizados. Quito, 2010.

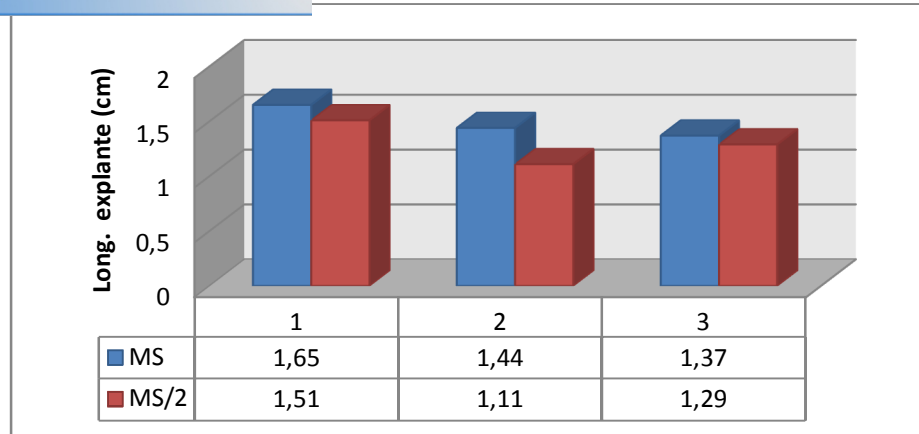


Figura 3.11 Longitud del explante para los diferentes tratamientos de enraizamiento utilizados. Quito, 2010.

Respecto al porcentaje de enraizamiento en la Figura 3.12 se puede apreciar como el medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración con la mayor concentración de hormonas es considerablemente más efectivo con respecto al medio completo.

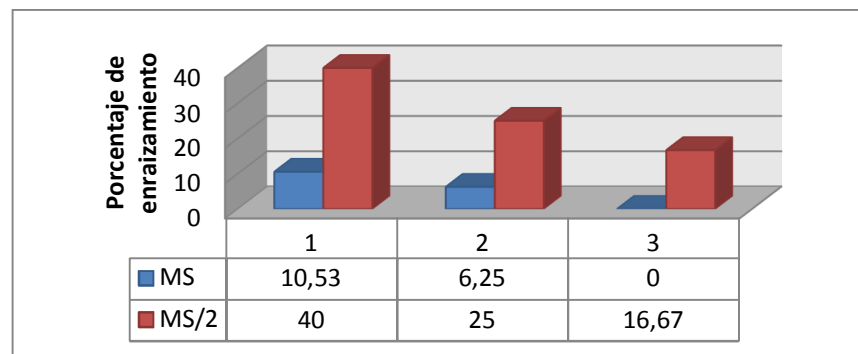


Figura 3.12 Porcentaje de enraizamiento según las diferentes concentraciones de medio basal para las diferentes combinaciones de hormonas. Quito, 2010.

Finalmente el Análisis de Varianza de la tercera variable analizada durante esta etapa, la longitud promedio de la raíz principal, se presenta en la Tabla 3.23 en la cual se observa que existe significancia estadística entre los diferentes tratamientos.

Tabla 3.23 Análisis de varianza de la longitud de raíz para cada uno de los tratamientos aplicados durante la fase de enraizamiento. Quito, 2010.

F de V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Comb. hormonas	0,69	2	0,35	27,22	0,0001
Medio	2,77	1	2,77	217,58	<0,0001
Hormonas*Medio	0,14	11	0,01	4,99	0,0287
Error	0	14	11		
Total	4,14	16			

La Prueba de Tukey, que se presenta en la Tabla 3.24, muestra la presencia de cuatro grupos de significancia, siendo el más destacado el tratamiento que incluye medio Murashige y Skoog (1962) a la mitad de su concentración y con la concentración más alta de hormonas, es decir, 1 mg/L de ácido indolbutírico y 0,5 mg/L de ácido naftalenacético.

clave para la longitud de raíz para cada uno de los tratamientos durante la fase de enraizamiento. Quito, 2010.

Medio	Combinación	Medias	n	E.E.				
MS/2	1IBA+0,5ANA	1,73	6	0,05	A			
MS/2	0,5IBA+0,25ANA	1,30	4	0,06		B		
MS/2	0,25ANA+0,13ANA	1,27	3	0,07		B		
MS	1IBA+0,5ANA	0,70	2	0,08			C	
MS	0,5IBA+0,25ANA	0,60	1	0,11			C	
MS	0,25ANA+0,13ANA	0,00	1	0,11				D

Estos resultados se observan de mejor manera en la gráfica que barras que se muestra en la Figura 3.13

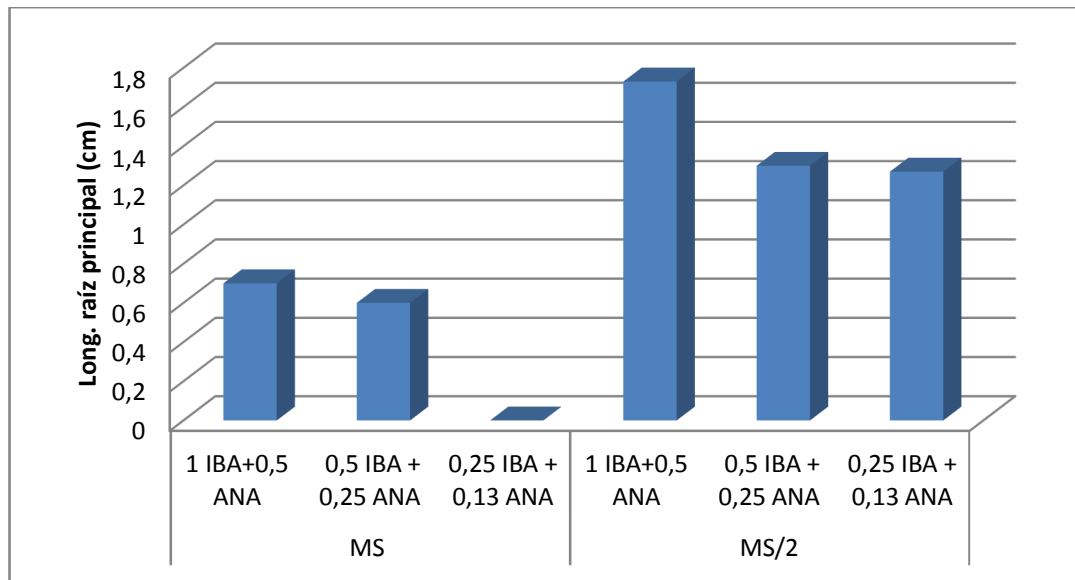


Figura 3.13 Longitud promedio de la raíz principal para los diferentes tratamientos probados durante la fase de enraizamiento. Quito, 2010.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Etapa de desinfección

El establecimiento aséptico de los cultivos representa una de las etapas más delicadas en el proceso de propagación *in vitro*, más aún cuando se trabaja con especies forestales, puesto que éstas presentan una alta incidencia de hongos, bacterias, virus y viroides (Esquivel, et al. 2009). Como caso particular en ésta investigación, no se contó con un invernadero para las plantas donantes, volviendo el proceso de desinfección y de tratamiento previo de las plántulas más laborioso, requiriendo una supervisión constante desde el momento de la siembra de las semillas hasta la obtención de plántulas.

El agente desinfectante utilizado durante ésta etapa, hipoclorito de sodio, fue seleccionado debido a su efectividad ampliamente probada en el establecimiento de cultivos *in vitro* así como también por su disponibilidad y bajo costo, lo que permite que el proceso sea más eficiente.

Los resultados obtenidos muestran que a pesar de no encontrarse diferencia estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos y las variables analizadas: contaminación, mortalidad y sobrevivencia, existe una

disminución de la contaminación a medida que los
progresivos, como se puede apreciar en la Tabla 3.1 y
las Figuras 3.1 y 3.2, es así que la menor tasa de contaminación se consigue al
utilizar una concentración de NaOCl de 2% durante 20 minutos, sin embargo, de la
mano con la disminución en la contaminación se observa un incremento
considerable de la tasa de mortalidad.

A pesar de los beneficios del hipoclorito de sodio, la alta mortalidad de los
explantos en los tratamientos a concentraciones más elevadas, se explica debido
a la toxicidad de éste compuesto, la misma que se debe principalmente a sus
propiedades corrosivas (Dolberg, 2006), las cuales al entrar en contacto con las
heridas abiertas de los explantes derivan en una necrosis del tejido circundante
con la subsecuente muerte del mismo.

Es por ello que se debe tener en cuenta que un menor porcentaje de
contaminación no representa por sí solo un tratamiento desinfectante más
efectivo, por el contrario se debe considerar la tasa de mortalidad para escoger un
procedimiento de desinfección adecuado, esto implica que el mejor tratamiento
será aquel que muestre un mayor porcentaje de sobrevivencia, es decir menor
contaminación y menor mortalidad.

Los porcentajes de sobrevivencia se muestran en la Tabla 3.1, y en ella se
puede apreciar que el tratamiento que incluye una concentración de NaOCl de
1.5% y un tiempo de inmersión de 15 minutos es el de mayor efectividad
alcanzando un porcentaje de sobrevivencia de 66.7%.

4.2 Etapa de control de oxidación

Los radicales libres, responsables de los procesos de oxidación, se producen de manera natural en los tejidos vegetales, como señala Mittler (2002), la mayoría de éstos se producen a partir del metabolismo del oxígeno y se les conoce como especies de oxígeno reactivo o intermediarios de oxígeno reactivo (ROS), éstos se originan de las múltiples reacciones redox que se producen en la planta, tales como la respiración, la fotosíntesis, la oxidación de ácidos grasos y otras muchas reacciones comunes en los vegetales.

En el caso particular del cultivo de tejidos, el estrés es producto de los cortes realizados al explante, el efecto abrasivo del agente desinfectante, y los componentes del medio de cultivo. Aunque la presencia de ROS en los tejidos se ha considerado tradicionalmente como tóxica, hoy se conoce que éstas especies químicas actúan como señalizadores de diferentes vías y proceso metabólicos, además de constituir un sistema de defensa contra patógenos (Bray et al. 2000).

Debido a lo anteriormente expuesto, es comprensible señalar que la erradicación completa de la oxidación durante el cultivo *in vitro* no es factible, por el contrario las estrategias empleadas están enfocadas en disminuir este proceso y a evitar que la oxidación termine lesionando a los tejidos de tal manera que se afecte el proceso de propagación, por lo tanto lo que se busca es disminuir el proceso de oxidación, llegando a la etapa señalada como leve y moderada.

De esta manera los resultados que se muestran en la Tabla 3.7 indican que los mayores porcentajes de oxidación fuerte se obtuvieron en el tratamiento con cisteína, alcanzando un 36.36%, mientras que, aquellos explantes que fueron sometidos a oscuridad presentan una tasa de 20%.

Estos resultados que se expresan de manera gráfica en las Figuras 3.5 y 3.6 demuestran claramente que dos estrategias fueron exitosas: el uso de carbón activado, y la oscuridad durante los siete primeros días, obteniendo ambas respuestas muy similares.

La efectividad del carbón activado como agente antioxidante se atribuye a su capacidad para remover sustancias inhibitorias propias del medio, como el 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (HMF), el cual es un compuesto inhibitorio que se forma por hidrólisis de la sacarosa durante el autoclavado y aquellas producidas por el mismo explante como es el caso de las quinonas. (Ebert et al, 1993).

Las concentraciones de carbón activado suelen variar entre 0,5 g/L hasta 10 g/L, dependiendo de las diferentes especies cultivadas. En esta investigación se optó por la utilización de 0,5 g/L, para evitar que el carbón adsorbiera otros compuestos de interés en el medio, como hormonas o vitaminas, lo cual podría interferir en los resultados.

Otro mecanismo para controlar la oxidación fue la oscuridad durante los siete primeros días de cultivo, estrategia que tiene un amplio uso en el cultivo de tejidos *in vitro*, debido a su efectividad y accesibilidad económica, se ha reportado buenos resultados obtenidos mediante esta estrategia por gran número de

s y Arias en caña de azúcar (1987), Seneviratne y *brasiliensis*, así como Sudripta *et al.* (1996) y Jha Das (2004) en *Anacardium occidentale*. (Citado por Azofeifa, 2009).

Finalmente la utilización directa de sustancias antioxidantes, en éste caso cisteína, no mostró ningún resultado favorable y por el contrario se pudo observar un ligero incremento de oxidación en los explantes. Esto podría explicarse debido al poco tiempo de acción de la cisteína sobre los explantes, apenas cinco minutos, frente a la hora de inmersión que utilizaron D´Silva y D´Souza (1993) para *Anacardium occidentale*, e incluso varias horas de inmersión en soluciones de mezclas de antioxidantes como sugieren Bonga y Durzan (1982).

Pero el efecto adverso de soluciones antioxidantes también ha sido reportado por otros autores como Seneviratney Wijesekara (1996) en *Hevea brasiliensis*, quienes encontraron una mayor oxidación en los explantes que habían sido sumergidos previamente en una solución de ácido cítrico y ácido ascórbico.

4.3 Etapa de establecimiento

El medio Murashige y Skoog es el más utilizado en cultivo de tejidos vegetales, incluyendo especies forestales. En micropropagación del género *Caesalpinia*, este medio ha sido utilizado con éxito en *Caesalpinia pulcherima* por Rahman *et al.* (1992), así como más recientemente por Ayisire *et al.* (2008) en la propagación de *Pilliothigma thonninghi*.

establecimiento, a pesar de que el análisis de varianza, no muestra diferencias significativas entre el medio Murashige y Skoog (MS) completo y el medio a la mitad de su concentración, en la Figura 3.7 se observa una ligera propensión a obtener una mayor tasa de multiplicación en el medio MS completo, lo cual se puede explicar porque el explante tiene una mayor concentración de nutrientes disponibles.

Por otro lado las diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina, demostraron ser determinantes al momento de evaluar la tasa de multiplicación de los explantes durante esta fase, el mejor resultado se obtuvo con la adición de 2mg/L de dicha hormona.

Por otro lado en cuanto a la efectividad de la 6-bencilaminopurina como promotor de la multiplicación, en las Tablas 3.12 y 3.13 se puede apreciar como a medida que aumenta la concentración de la hormona se incrementa la tasa de multiplicación alcanzando un valor de 1,42. Esta concordancia entre concentración de hormona y tasa de multiplicación se puede observar gráficamente en la Figura 3.8, en donde se muestra una relación lineal entre ambas variables.

A pesar de su efectividad para promover la división celular la 6-bencilaminopurina presenta algunos inconvenientes durante el cultivo *in vitro* entre los que se incluyen, problemas durante el proceso de aclimatación, heterogeneidad en el crecimiento así como también inhibición en la formación de raíces (Dolezal et al. 2005), es por ello que es necesario controlar cuidadosamente la concentración de ésta hormona en el medio.

4.4 Etapa de multiplicación

Durante la fase de multiplicación la tasa de contaminación, para todos los tratamientos bajo considerablemente, ubicándose entre 0% y 10%. Esto se explica debido a la presencia de contaminantes endógenos que resisten el proceso de desinfección y permanecen de forma latente en el interior de los tejidos, tal como señalan Hurtado y Merino (1987) (citado por Jiménez, 1990).

En cuanto a la mortalidad, aunque disminuye de forma notable en comparación con la etapa de establecimiento, puesto que los explantes ya no se encuentran sometidos al estrés de la desinfección, aún existe una pequeña tasa de pérdida lo cual puede explicarse como consecuencia de los cortes que se realizan para eliminar los tejidos necrosados de la etapa anterior, e incluso puede ser una respuesta a la concentración de hormonas en el medio.

El análisis de varianza mostrado en la Tabla 3.15 señala que tanto la composición del medio como la concentración de 6-bencilaminopurina y kinetina son significativas para la tasa de multiplicación de los explantes. La prueba de Tukey indica que los medios que presentan una mejor respuesta son aquellos que contienen /L de 6-benzilaminopurina y carecen de kinetina.

La presencia de kinetina no fue efectiva y resultó ser contraproducente en el proceso de multiplicación, pues un exceso de citoquininas pudo generar un desbalance hormonal en el tejido vegetal, y su consecuente desmejoramiento.

El funcionamiento de las citoquininas depende en gran medida en equilibrio con las auxinas, en caso de que éste no exista los resultados no serán los esperados (García, 2008).

4.5 Etapa de enraizamiento

Los resultados obtenidos durante la presente investigación muestran un mayor porcentaje de enraizamiento en el medio Murashige y Skoog (MS) a la mitad de su concentración enriquecido con 1 mg/L de ácido indolbutírico y 0,5 mg/L de ácido naftalenacético obteniendo un porcentaje de 40% de enraizamiento, mientras que el medio Murashige y Skoog completo adicionado con la menor concentración de hormonas, 0.25 mg/L de ácido indolbutírico y 0,13 mg/L de ácido naftalenacético, mostraron resultados nulos durante esta etapa. Esto es concordante con los otros resultados reportados para especies de la misma orden y muestra una inhibición de la rizogénesis en medio MS completo.

A pesar de haber conseguido el enraizamiento *in vitro*, las cifras obtenidas son bajas y precisan ser mejoradas para optimizar el proceso, se debe tomar en cuenta que la inducción del enraizamiento en las plantas provenientes de la micropropagación resulta complicada debido a las altas concentraciones de citoquininas (en especial 6-bencilaminopurina) que se adicionan con el fin de favorecer la multiplicación (Roca et al. 1987).

Además del balance hormonal que se requiere conseguir existen otros factores que intervienen durante esta etapa como los factores nutricionales la edad del individuo, el tipo de explante e incluso del genotipo (Francllet et al.1987),

Por otro lado los resultados del análisis de longitud de raíz, que se presentan en la Tabla 3.23, y la prueba de Tukey presentada en la Tabla 3.24, muestran nuevamente el medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración y adicionado con la concentración de hormonas más alta es el que presenta mejores resultados.

El ácido indolbutírico y el ácido naftalenacético han demostrado ser de gran utilidad para la rizogénesis en especies de la familia *Caesalpinia* no solo durante el cultivo *in vitro*, sino también en la propagación vegetativa de algunas especies, como es el caso de *Parkinsonia acuelata* reportada por Abenini (2005), quien utilizó esta combinación de hormonas obteniendo resultados favorables.

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

- El tratamiento de desinfección más eficiente fue aquél que utilizó hipoclorito de sodio al 1.5% y un tiempo de inmersión de 15 minutos, obteniendo un porcentaje de establecimiento de 67%.
- Las estrategias de control de oxidación que demostraron ser efectivas fueron el uso de carbón activado en el medio, 0.5 g/L, y la incubación en oscuridad durante los siete primeros días.
- La mejor tasa de multiplicación durante la etapa de establecimiento se obtuvo utilizando el medio Murashige y Skoog (MS) completo y enriquecido con 2 mg/L de 6-bencilaminopurina.
- Durante la fase de multiplicación, se obtuvo una mejor respuesta utilizando el medio Murashige y Skoog (MS) completo adicionado con 1 mg/L de 6-benzilaminopurina.

quininas, 6-bencilaminopurina y kinetina, durante la
demostró una baja eficiencia en la multiplicación de

los explantes.

- El mejor medio para enraizamiento fue el medio Murashige y Skoog (MS) a la mitad de su concentración adicionando con 1mg/L de ácido indolbutírico y 0,5 mg/L de ácido naftalenacético, obteniendo el mayor porcentaje de formación de raíz, 40%, y la mayor longitud de raíz, con un promedio de 1,73 cm.

CAPÍTULO 5: RECOMENDACIONES

- Para disminuir la incidencia de la contaminación durante la etapa de establecimiento, se recomienda mantener las plántulas donadoras en un invernadero.
- Como estrategia alternativa para el control de oxidación de los explantes se sugiere probar menores intensidades de luz durante la etapa de incubación, así como también probar mezclas de soluciones antioxidantes en las plantas donadoras.
- Con el objetivo de conseguir explantes de mayor tamaño, se sugiere probar medios de establecimiento que contengan una combinación de auxinas y citoquininas, puesto que, al utilizar únicamente citoquininas el tamaño de los explantes fue muy pequeño lo cual vuelve más laborioso el proceso de multiplicación e incrementa la mortalidad de los mismo.
- Realizar la aclimatación de las plantas obtenidas en un invernadero apropiado que permita controlar las condiciones ambientales, en especial, la humedad, puesto que éste es un factor determinante al momento de la aparición de enfermedades en las plantas cultivadas *in vitro*.



PDF
Complete

Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

cia social y económica del guarango se sugiere
de investigación, como la clonación *in vitro* de
ejemplares élite y la embriogénesis somática.,

PÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

Abedini, W. (2005) Propagación vegetativa de *Parkinsonia acuminata* L. por estaquillado. Quebracho N°12: 23-33.

ALNICOLSA. (2009). Estudio Botánico de la Tara. Extraído el 31 de agosto, 2009, de <http://taninos.tripod.com/etara.htm>.

Ayisire, B. E., Akinro, L. A., & Amoo, S. O. (2008). Seed germination and *in vitro* propagation of *Piliostigma thonningii*. an important medicinal plant. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (3), pp. 401-404.

Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía mesoamericana 20(1), 153-175.

Bonga, J., Durzan, D. (1982). Tissue culture in forestry. Nighoff/Junk Publishers. London. England. 420 p.

Botero, R., y Russo, R. (1998). Utilización de árboles y arbustos fijadores de nitrógeno en sistemas sostenibles de producción animal en suelos ácidos tropicales. Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica.

...,J., Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic
B; Grissem, W, Jones, R. eds. Biochemistry and
molecular biology of plant. American Society of Plant
Physiologists.Maryland, USA.p.1158-1203.

Carrere, R. (2005). Pinos y eucaliptos en Ecuador: símbolos de un modelo
destrutivo. Movimiento Mundial por los Bosques.

Coca, M. (2009). Enfermedades de la Tara (Caesalpiniaspinosa).
Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Fitotecnia de la
Universidad de San Simón. Vol. 3 (2).

Covelo, X. (2009). Drástica caída del precio del pino y del eucalipto para
sierra y astillado en Galicia. Revista O'Monde.Año XXII N°51 1º Trimestre
2009.

D'Silva,I., D'Souza., L. (1993). Controlling contamination and browning of
in vitro cultures of cashew. Journal of plantationCrops 21: 22-29.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, R.,
Robledo, C. W. Infostat versión 2010. FCA, Universidad de Córdoba,
Argentina.

Administrativo Distrital del Medio Ambiente. Guías
de Sodio. Guía 4.18. Extraído el 20 de enero, 2011,
de <http://www.dadma.gov.co/paginas/guias%20ambientales/guias2.php>

Dolezal, K., Popa, I., Kryztof, V., Spíchal, L., Fojtíková, M., Holub, J., Lenobel, R., Schmülling, T., Strnad, M. (2006). Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14 875-884.

Ebert, A., Taylor, F., Blake, J. (1993). Changes of 6-benzylaminopurine and 2, 4-dichlorophenoxyacetid acid concentrations in plant tissue culture media in presence of active charcoal. Plant cell, Tissue and Organ Culture 33: 157-162.

Esquivel, E., Flores, A., Pérez, J., Jiménez, J., Aguilar, M. A. (2009). Mejoramiento genético y conservación de cultivos agrícolas y especies forestales. CATIE.

Flores, F., Chávarry, L. (2005). Edad óptima del patrón, época oportuna de injertado y producción masiva de injertos de *Caesalpiniaspinosa* (Molina) Kuntze-Para+. Cajamarca: Asociación Civil para la Investigación y el Desarrollo Forestal - ADEFOR- y Programa Andino de Fomento de Semillas Forestales . FOSEFOR-.

ur, A. (1999). Micropropagación de melina
(). Agronomía costarricense 23(1): 69-76.

García, F. Reguladores de crecimiento: Las citoquininas. Departamento de Botánica. Unidad Politécnica de Valencia.

Henao, S.C., Riveros, .C. R., Gaitán, J.A. Actividad bactericida del ácido hipocloroso. Revista Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia 51(3), 136-142.

Hernández, J. A., Carballo, A. Almacenamiento y conservación de granos y semillas. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. México.

Hurtado, D. V., Merino, E. M. (1987). Cultivo de tejidos vegetales. México, D.F. 231p.

Jha, S., Das, S. (2004). Tissue culture of cashewnut In: Plant biotechnology and molecular markers. Srivastava, P., Narula, A., Srivastava, P. Anamaya, Publishers. New Delhi, India. p. 244-260.

Lallana, V.H y Lallana M.C. (2001). Manual de prácticas de fisiología vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNER.

Hauenstein, E. (2008). Inducción de enraizamiento de *Opsiscorallina* con ácido indolbutírico. Bosque 29(3): 227-230.

Luna, C. V., Tarrago, J. R., Sansberro, P. A., Mroginski, L. A. (2004). Comunicaciones científicas y tecnológicas A015-016.

Mancero, L. (2008). La Tara (*Caesalpiniaspinosa*) en Perú, Bolivia y Ecuador: Análisis de la Cadena Productiva en la región. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPERATION, Quito.

Marinucci, L., Ruscitti, M., &Abenini, W. (2004). Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la república de Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 105 (2), 27-36.

Mejía, R. (1994). Propagación comercial de 312 especies de plantas por Cultivo *in vitro*. 334-335.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7:405-410.

Mok, D., Mok, M. (2001). Cytokinin metabolism and action. PlantPhysiol. PlantMol.Biol.2001.52, 89-118.

Nieto, C., Barona, N. (2007). El Guarango: Una opción agroindustrial y de exportación para %Conservación Productiva+. Quito.

Nieto, C., Barona, N., & Ortiz, S. (2005). Cadenas Agroproductivas para la conservación de la cuenca media del río Pita. Compartiendo Experiencias N°5. Fondo para la Protección del Agua. Quito-Ecuador.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2009). La Revolución Verde. Extraído el 31 de agosto, 2009, de <http://www.fao.org/kids/es/revolution.html>.

Orwa, C., Mutua, A., Jamnadass, R., Simons, A. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>).

Prakash, E., ShaValli Khan, P. S., Vivek, T., Sing, E. (2006). Micropropagation of red sanders (*Pterocarpussantalinus* L.) using mature nodal explants. Japanese Forest Society and Springer 11, 329-335.

Prehn, D., Serrano, C., Cerrios, C.G., & Arce-Johnson, P. (2003). Micropropagación de Quillaja saponaria Mol. a partir de semillas. Bosque Valdivia, Vol. 24 N° 2, pp. 3-12

Sain, M., Biswas, B. K., Islam, J., Islam, R.
of *Caesalpinia pulcherrima* through nodal but culture
of mature tree. *Plant cell, tissue and organ culture* 32: 363-365.

Retamales, J. (2007). *Hormonas vegetales y reguladores de crecimiento: Aspectos básicos y modos de acción*. ValentBioSciences. Universidad de Chile.

Roca, W., Mroginski, L. (1987). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Rodríguez, Marlene (2008). Influencia de la temperatura en la germinación de semillas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze «taya» de cuatro localidades del Departamento La Libertad, Perú. *Arnaldoa* 15(1): 87-100.

Rossini, S., Valdéz, B., Andrés, M., Márquez, F., & Bueso, M. (2006). Germinación de las Semillas en algunas especies americanas de Fabaceae y Bignonaceae cultivadas en Sevilla (SO de España). *Lagascalia* 26: 119-129.

Rout, G. R. (2005). Micropropagation of *Clitoria ternatea* an important medicinal plant. *In vitro Cell* 41, 516-519.

Sneviratne, P., y Wijesekara G. (1996). The problema of fenolicexudades in *in vitro* culture of mature *Heverabrasiliensis*. Journal of plantation Crop 24: 54-62.

Sudripta, D., Timir, B., Sumita, T. (1996). *In vitro* propagation of cashenut. Plant Cell Reports 15: 615-619.

United States Agency for International Development.(1998). Distorsiones en el Mercado forestal en el Ecuador. Quito: Autor.

Vater, G. L., Arena, M. E.,Mazzoni, A., Masco, M., &Kofalt, R. (1996). Laboratorio de Recursos Agronómicos. Centro Austral de Investigaciones Científicas (CONICET).

Villalobos, I., Arias, O. (1987). Inducción y multiplicación de callos *in vitro* en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum*spp). Agronomía costarricense 11: 39-44.

Villalobos, V. M., Thorpe, T. A. Conceptos de Micropropagación. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). México.

ANEXO A

Tasa de multiplicación para los diferentes medios utilizados durante la fase de establecimiento de *Caesalpinia spinosa*.

# Caso	Medio	BAP (mg.L ⁻¹)	Tasa de Multiplicación
1	MS/2	0	1
2	MS/2	0	
3	MS/2	0	1
4	MS/2	0	1
5	MS/2	0	1
6	MS/2	0	1
7	MS/2	0	
8	MS/2	0	
9	MS/2	0	1
10	MS/2	0	1
11	MS/2	0	
12	MS/2	0	
13	MS/2	0	
14	MS/2	0	1
15	MS/2	0	1
16	MS/2	0	
17	MS/2	0	1
18	MS/2	0	1
19	MS/2	0	1
20	MS/2	0	
21	MS/2	0	1
22	MS/2	0	
23	MS/2	0	1
24	MS/2	0	1
25	MS/2	0	
26	MS/2	0	1
27	MS/2	0	2
28	MS/2	0	1
29	MS/2	0	
30	MS/2	0	1
31	MS/2	1	1
32	MS/2	1	1
33	MS/2	1	2
34	MS/2	1	1

	MS/2	1	
	Medio	BAP (mg.L ⁻¹)	Tasa de Multiplicación
36	MS/2	1	1
37	MS/2	1	1
38	MS/2	1	1
39	MS/2	1	1
40	MS/2	1	
41	MS/2	1	
42	MS/2	1	
43	MS/2	1	1
44	MS/2	1	1
45	MS/2	1	1
46	MS/2	1	2
47	MS/2	1	
48	MS/2	1	
49	MS/2	1	
50	MS/2	1	
51	MS/2	1	1
52	MS/2	1	1
53	MS/2	1	1
54	MS/2	1	
55	MS/2	1	2
56	MS/2	1	1
57	MS/2	1	1
58	MS/2	1	
59	MS/2	1	
60	MS/2	1	
61	MS/2	2	
62	MS/2	2	
63	MS/2	2	
64	MS/2	2	1
65	MS/2	2	2
66	MS/2	2	1
67	MS/2	2	1
68	MS/2	2	
69	MS/2	2	
70	MS/2	2	1
71	MS/2	2	1
72	MS/2	2	1
73	MS/2	2	2
74	MS/2	2	
75	MS/2	2	1

	Medio	BAP (mg.L ⁻¹)	Tasa de Multiplicación
	MS/2	2	2
77	MS/2	2	1
78	MS/2	2	1
79	MS/2	2	2
80	MS/2	2	
81	MS/2	2	
82	MS/2	2	1
83	MS/2	2	2
84	MS/2	2	1
85	MS/2	2	2
86	MS/2	2	1
87	MS/2	2	1
88	MS/2	2	
89	MS/2	2	
90	MS/2	2	1
91	MS	0	1
92	MS	0	1
93	MS	0	1
94	MS	0	1
95	MS	0	1
96	MS	0	
97	MS	0	
98	MS	0	
99	MS	0	
100	MS	0	1
101	MS	0	
102	MS	0	1
103	MS	0	1
104	MS	0	1
105	MS	0	1
106	MS	0	1
107	MS	0	1
108	MS	0	
109	MS	0	1
110	MS	0	1
111	MS	0	
112	MS	0	2
113	MS	0	
114	MS	0	
115	MS	0	1

	Medio	BAP (mg.L ⁻¹)	Tasa de Multiplicación
	MS	0	2
117	MS	0	1
118	MS	0	2
119	MS	0	1
120	MS	0	2
121	MS	1	
122	MS	1	
123	MS	1	3
124	MS	1	2
125	MS	1	1
126	MS	1	
127	MS	1	
128	MS	1	2
129	MS	1	
130	MS	1	1
131	MS	1	
132	MS	1	1
133	MS	1	1
134	MS	1	1
135	MS	1	1
136	MS	1	1
137	MS	1	1
138	MS	1	1
139	MS	1	1
140	MS	1	1
141	MS	1	2
142	MS	1	
143	MS	1	1
144	MS	1	1
145	MS	1	2
146	MS	1	1
147	MS	1	1
148	MS	1	
149	MS	1	1
150	MS	1	
151	MS	2	
152	MS	2	1
153	MS	2	
154	MS	2	
155	MS	2	1
156	MS	2	
157	MS	2	2

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

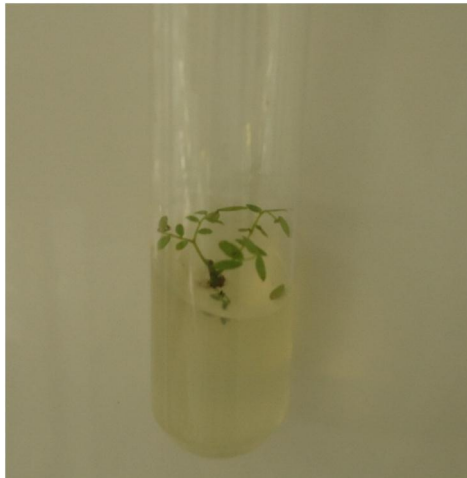
	Medio	BAP (mg.L-1)	Tasa de Multiplicación
	MS	2	3
159	MS	2	
160	MS	2	1
161	MS	2	
162	MS	2	2
163	MS	2	
164	MS	2	2
165	MS	2	1
166	MS	2	1
167	MS	2	1
168	MS	2	
169	MS	2	1
170	MS	2	1
171	MS	2	2
172	MS	2	
173	MS	2	1
174	MS	2	
175	MS	2	
176	MS	2	2
177	MS	2	1
178	MS	2	1
179	MS	2	1
180	MS	2	2

ANEXO E

Fotos del establecimiento de los explantes de *Caesalpinia spinosa* según los diferentes medios utilizados.



E.1 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración y libre de hormonas. Quito, 2010.



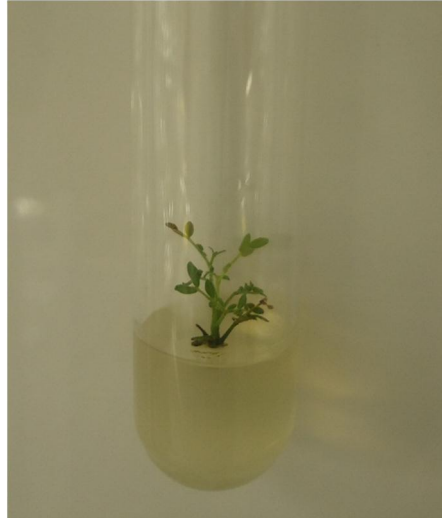
E.2 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración con 1 mg.L^{-1} de BAP. Quito, 2010.



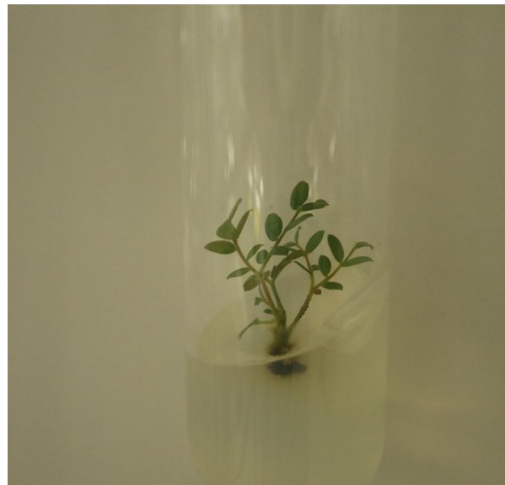
E.3 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración con 2 mg.L^{-1} de BAP. Quito, 2010.



E.4 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog completo con libre de hormonas. Quito, 2010.



E.5 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog completo con 1 mg.L⁻¹ de BAP. Quito, 2010.



E.6 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog completo con 2 mg.L⁻¹ de BAP. Quito, 2010.

ANEXO F

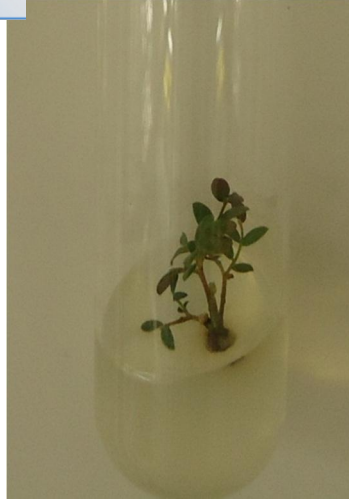
Fotos de la etapa de multiplicación de los explantes de *Caesalpinia spinosa* según los diferentes medios utilizados.



F.1 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog completo adicionado con 1 mg.L⁻¹ de BAP. Quito, 2010.



F.2 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog completo adicionado con 1 mg.L⁻¹ de BAP Y 0,5 mg.L⁻¹ de Kin. Quito, 2010.



F.3 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog completo con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Quito, 2010.



F.4 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP Y $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Kin..Quito, 2010.



F.5 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración con 1 mg.L^{-1} de BAP.. Quito, 2010.



F.6 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración adicionado con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP y $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Kin. Quito, 2010.



F.7 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog completo con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Quito, 2010.



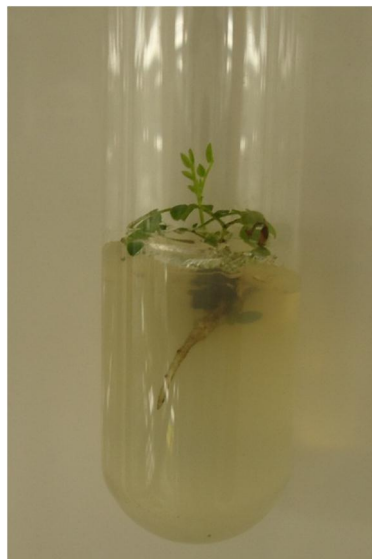
F.8 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración. Quito, 2010.

ANEXO G

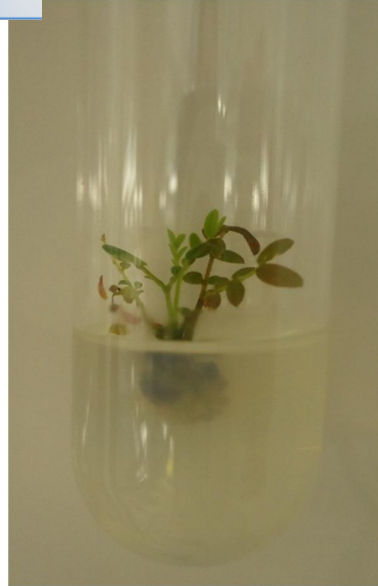
Fotos de la etapa de enraizamiento de los explantes de *Caesalpinia spinosa* según los diferentes medios utilizados.



G.1 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog completo adicionado con 1 mg.L^{-1} de IBA y $0,5 \text{ de mg.L}^{-1}$ de ANA. Quito, 2010.



G.2 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog completo adicionado con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de IBA y $0,25 \text{ de mg.L}^{-1}$ de ANA. Quito, 2010.



G.3 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog completo adicionado con $0,25\text{mg.L}^{-1}$ de IBA y $0,13$ de mg.L^{-1} de ANA. Quito, 2010.



G.4 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración adicionado con 1 mg.L^{-1} de IBA y $0,5$ de mg.L^{-1} de ANA. Quito, 2010.



G.5 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración adicionado con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de IBA y $0,25 \text{ de mg.L}^{-1}$ de ANA. Quito, 2010.



G.6 Explante de *Caesalpinia spinosa* a los 45 días de su siembra en medio Murashige y Skoog a la mitad de su concentración adicionado con $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de IBA y $0,13 \text{ de mg.L}^{-1}$ de ANA. Quito, 2010.