

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ÁCIDO α -
NAFTALENACÉTICO (ANA), 6- BENCILAMINOPURINA
(BAP) Y ÁCIDO GIBERÉLICO (GA₃) EN LAS FASES DE
INDUCCIÓN, MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO *in*
vitro A PARTIR DE YEMAS APICALES DE *Valeriana*
scandens

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MARIA JOSE BASANTES MANTILLA

SANGOLQUÍ, NOVIEMBRE DE 2011

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

María José Basantes Mantilla

COORDINADOR DE CARRERA

Ing. Tatiana Páez

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Mario Lozada

Sangolquí, noviembre de 2011

CERTIFICACIÓN

M. Sc. Mónica Jadán

Ing. Pedro Romero

Certifican:

Que el trabajo titulado: “Evaluación del efecto de ácido α naftalenacético (ANA), 6- bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA_3) en las fases de inducción, multiplicación y enraizamiento *in vitro* a partir de yemas apicales de *Valeriana scandens*”, realizado por la Srta. MARIA JOSE BASANTES MANTILLA como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas estatutarias establecidas por la Escuela Politécnica del Ejército, en el Reglamento de Estudiantes.

Debido a la relevancia científica, expuesta en el presente trabajo, se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo, consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a María José Basantes Mantilla que lo entregue a la Ing. Tatiana Páez, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, noviembre de 2011

M. Sc. Mónica Jadán
DIRECTOR

Ing. Pedro Romero
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

María José Basantes Mantilla

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “**Evaluación del efecto de ácido α naftalenacético (ANA), 6- bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA₃) en las fases de inducción, multiplicación y enraizamiento *in vitro* a partir de yemas apicales de *Valeriana scandens*”**, 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 mi autoría.

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

Sangolquí, noviembre de 2011

María José Basantes Mantilla

AUTORIZACIÓN

Yo, María José Basantes Mantilla

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército, la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“Evaluación del efecto de ácido α naftalenacético (ANA), 6- bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA_3) en las fases de inducción, multiplicación y enraizamiento *in vitro* a partir de yemas apicales de *Valeriana scandens*”**, cuyo contenido y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, noviembre de 2011

María José Basantes Mantilla

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, por cada día llenarme de bendiciones, por cuidarme y haberme escogido desde que estaba en el vientre de mi madre.

A mi familia por día a día entregarme su amor, por confiar en mí, por apoyarme y por siempre enseñarme a luchar para alcanzar mis sueños.

Filipenses 4:13

Todo lo puedo en Cristo que me fortalece

María José Basantes Mantilla

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios por darme sabiduría para culminar este trabajo, por llenarme de fuerzas y ganas día a día, por su amor incondicional, gracias por ser mi roca y mi torre fuerte.

Gracias a mis padres por su infinito amor, entrega y apoyo; gracias a mi madre por ser un ejemplo de mujer, por sus cuidados y sus mimos, por ser mi amiga, por aconsejarme, por estar siempre para mí cuando más la necesito; gracias a mi padre por día a día esforzarse para darme lo mejor, por enseñarme que hay que luchar por los sueños y alcanzarlos, por ser un gran ejemplo de perseverancia y sobretodo agradezco a ambos por demostrarme que a pesar de que la vida nos ha hecho estar separados, en el corazón no existen distancias, los amo con todo mi corazón.

A mi hermano Santiago por ser mi compañero, por cuidarme, por aconsejarme, por estar a mi lado compartiendo tantos buenos y malos momentos, gracias porque sé que siempre puedo contar contigo, te amo mucho.

A mi Directora de tesis, Master Mónica Jadán por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por guiarlo con sus conocimientos, gracias por brindarme su amistad, por haber confiado en mí y por haberme ayudado a crecer, e impulsar en mí el deseo de seguir alcanzando logros en la vida, gracias por darme la seguridad de que estoy lista para salir a enfrentar el mundo laboral.

A mi Codirector, Ingeniero Pedrito Romero por ayudarme con la parte más difícil de este proyecto, la estadística, gracias por siempre estar dispuesto a compartir su conocimiento.

A mis amigas Salito, Majo, Gaby y Andy por ser mis cómplices, por acompañarme en todos estos años de universidad siempre con la mejor onda

del mundo, cada una ha sabido ganarse un lugar especial en mi corazón, hemos compartido tantas cosas que no nos alcanzarían los dedos para contarlas, pero si nos alcanza el corazón para guardarlas, gracias por su preocupación y ayuda, son unas grandes amigas, les quiero mucho.

A mis compañeros del Laboratorio por convertirse en mi segunda familia, gracias por la amistad tan linda que hemos formado, por cada risa, por cada locura, por cada travesura, gracias por ayudarme en mis momentos de stress, por sentarse a escuchar mis problemas, gracias por ser unos buenos amigos.

A Maggy, Mary y a los pasantes que de una u otra manera me brindaron su ayuda en este proyecto, muchas gracias de verdad, un gran Dios se los pague.

A mi ñaña Cristina y a su familia por darme su amor y cariño, gracias amiga por ser mi confidente, por demostrarme que uno no necesita llevar el mismo apellido para poder considerar a otro parte de su familia, gracias por abrirme las puertas de tu hogar, por todos los momentos vividos desde que nos conocimos, por ser mi mejor amiga y estar dispuesta a ayudarme en todo lo que necesito, gracias por estos 10 años de complicidad, te quiero mucho.

Finalmente a todos esos semilleros de conocimiento que me han acompañado durante todos estos años, a mis maestros, gracias por sus enseñanzas y ayuda.

María José Basantes Mantilla

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Parte introductoria

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO	i
HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iv
AUTORIZACIÓN	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	ix
LISTADO DE TABLAS	xiii
LISTADO DE CUADROS.....	xv
LISTADO DE FIGURAS.....	xvi
LISTADO DE ANEXOS.....	xxi
LISTADO DE ABREVIATURAS	xxix
RESUMEN	xxx
ABSTRACT	xxxí

Cuerpo de la tesis

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación	3
1.3.1Objetivo General.....	3
1.3.2 Objetivos Específicos	4
1.4 Marco Teórico	4
1.4.1 Características Generales de la Especie.....	4
1.4.1.1 Taxonomía.....	4
1.4.1.2 Descripción botánica	5
1.4.1.3 Distribución Geográfica de la especie	7
1.4.1.4 Usos y propiedades	7
1.4.2 Cultivo <i>in vitro</i>	9

1.4.2.1 Etapa 0: Selección del material vegetal	10
1.4.2.2 Etapa 1: Fase de desinfección.....	11
1.4.2.3 Etapa 2: Fase de inducción	11
1.4.2.4 Etapa 3: Fase de multiplicación	12
1.4.2.5 Etapa 4: Fase de enraizamiento	12
1.4.2.6 Aclimatación de los explantes enraizados	12
1.4.3 Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	13
1.4.3.1 Material Vegetal.....	13
1.4.3.2 Medio de cultivo	14
1.4.3.3 Reguladores de crecimiento	16
1.4.4 Factores físicos.....	26
1.5 Sistema de hipótesis.....	26
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1 Ubicación geográfica de la investigación	27
2.2 Selección, colecta y transporte del material vegetal	27
2.3 Fase de establecimiento	28
2.3.1 Desinfección de las muestras.....	28
2.4 Inducción de brotes.....	31
2.4.1 Medios de cultivo para la inducción de brotes	31
2.5 Fase de multiplicación	35
2.5.1 Medios de cultivo para la multiplicación.....	35
2.6 Fase de Enraizamiento	39
2.6.1 Primer subproceso.....	39
2.6.2 Segundo subproceso.....	40
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	45
3.1 Etapa de desinfección.....	45
3.1.1 Contaminación.....	45
3.1.2 Necrosis.....	53
3.1.3 Muerte.....	58
3.2 Etapa de inducción de brotes.....	65
3.2.1 Presencia o ausencia de brotes.....	65
3.2.2 Longitud de los brotes	69
3.2.3 Número de entrenudos	71
3.2.4 Formación de Callo.....	74

3.3 Etapa de multiplicación de brotes	76
3.3.1 Primer Subcultivo.....	76
3.3.1.1 Presencia o Ausencia de brote	76
3.3.1.2 Número de entrenudos.....	80
3.3.1.3 Longitud de los brotes.....	82
3.3.1.4 Vigorosidad de los brotes.....	84
3.3.2 Segundo Subcultivo	86
3.3.2.1 Presencia o Ausencia de brote	86
3.3.2.2. Número de entrenudos.....	89
3.3.2.3 Longitud de los brotes.....	91
3.3.2.4 Vigorosidad de los brotes.....	93
3.3.3 Tercer Subcultivo	94
3.3.3.1 Presencia o Ausencia de brote.....	94
3.3.3.2 Número de entrenudos	97
3.3.3.3 Longitud de los brotes.....	99
3.3.3.4 Vigorosidad de los brotes.....	101
3.4 Etapa de enraizamiento	102
3.4.1 Alargamiento de brotes usando ácido giberélico (GA ₃)	102
3.4.2 Enraizamiento en medio de cultivo Murashige y Skoog (M&S)	102
3.4.2.1 Longitud de brotes.....	102
3.4.2.2 Nivel de enraizamiento	104
3.4.2.3 Tiempo de enraizamiento.....	105
3.4.3 Enraizamiento en medio de cultivo B5.....	105
3.4.3.1 Longitud de brotes.....	106
3.4.3.2 Nivel de enraizamiento	107
3.4.3.3 Tiempo de enraizamiento.....	108
3.4.4 Enraizamiento con carbón activado.....	109
3.4.4.1 Longitud de brotes.....	109
3.4.4.2 Nivel de enraizamiento	110
3.4.4.3 Tiempo de enraizamiento.....	111
3.4.5 Enraizamiento en medio líquido.....	111
3.4.5.1 Longitud de brotes.....	112
3.4.5.2 Nivel de enraizamiento	113
3.4.5.3 Tiempo de enraizamiento.....	114

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	115
4.1 Etapa de desinfección.....	115
4.1.1 Contaminación.....	115
4.1.2 Necrosis.....	116
4.1.3 Muerte.....	117
4.2 Etapa de inducción de brotes.....	117
4.2.1 Presencia o ausencia de brotes.....	117
4.2.2 Longitud de brotes y número de entrenudos	118
4.2.3 Formación de callo	119
4.3 Etapa de multiplicación de brotes	120
4.3.1 Presencia o ausencia de brotes.....	120
4.3.2 Número de entrenudos y longitud de los brotes	120
4.3.3 Vigorosidad.....	121
4.4 Etapa de enraizamiento	121
4.4.1 Alargamiento de brotes usando ácido giberélico (GA ₃)	121
4.4.2 Longitud de brotes	122
4.4.3 Nivel de enraizamiento y tiempo de enraizamiento	122
4.4.4 Utilización de carbón activado	124
4.4.5 Utilización de medio líquido	124
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	125
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	127
CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA	128
ANEXO DE RESULTADOS	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO ESTADISTICO.....	¡Error! Marcador no definido.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Tratamientos aplicados para la desinfección de yemas apicales.....	29
Tabla 2.2 Tratamientos para inducción de brotes	32
Tabla 2.3. Niveles que determina la formación de callo.....	33
Tabla 2.4 Niveles que determina la vigorosidad de los nuevos brotes.....	36
Figura 2.7 Niveles de vigorosidad (A) Brote débil (B) Brote resistente (C) Brote firme (D) Brote vigoroso.	37
Tabla 2.5 Tratamientos para alargamiento de brotes.....	39
Tabla 2.6 Tratamientos para el establecimiento de la etapa de enraizamiento. ...	41
Tabla 2.7 Niveles de enraizamiento	42
Tabla 3.1 Prueba chi cuadrado para la contaminación con respecto a la concentración de NaClO	50
Tabla 3.2 Prueba chi cuadrado para la contaminación con respecto al tiempo de inmersión.....	51
Tabla 3.3 Intervalos de confianza para la variable contaminación con el 95% de confianza.....	52
Tabla 3.4 Intervalos de confianza para la variable contaminación con el 90% de confianza.....	52
Tabla 3.5 Prueba de Kruskal Wallis para la variable contaminación	52
Tabla 3.6 Prueba chi cuadrado para la necrosis con respecto a la concentración de NaClO	57
Tabla 3.7 Prueba chi cuadrado para la necrosis con respecto al tiempo de inmersión.....	57
Tabla 3.8 Prueba de Kruskal Wallis para la variable necrosis.....	58
Tabla 3.9 Prueba chi cuadrado para la muerte con respecto a la concentración de NaClO	63
Tabla 3.10 Prueba chi cuadrado para la muerte con respecto al tiempo de inmersión	63
Tabla 3.11 Prueba de Kruskal Wallis para la variable muerte.....	64
Tabla 3.12 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de BAP.	68

Tabla 3.13 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de ANA.	69
Tabla 3. 14 Medios de cultivo aplicados en la etapa de multiplicación	76
Tabla 3.15 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de BAP.	79
Tabla 3.16 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de ANA.	79
Tabla 3.17 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de BAP.	88
Tabla 3.18 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de ANA.	88
Figura 3.36 Gráfico de la presencia / ausencia de brotes con respecto a la concentración de BAP.....	94
Tabla 3.19 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de BAP.	96
Tabla 3.20 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de ANA.	96
Tabla 3.21 Intervalos de confianza para la variable longitud de brotes con el 95% de confianza.....	110
Tabla 3.22 Intervalos de confianza para la variable longitud de brotes con el 95% de confianza.....	113

LISTADO DE CUADROS

Cuadro1.1 Concentración de macro y microelementos en un medio de cultivo.... 16

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura morfológica de <i>Valeriana scandens</i> (A) Hojas trifoliadas (B) Flores	6
Figura 1.2 Ruta biosintética para la formación de AIA	18
Figura 1.3 Ruta biosintética de una auxina natural	18
Figura 1.4 Auxinas sintéticas	19
Figura 1.5 Estructura molecular del 6- bencilaminopurina	21
Figura 1.6 Estructura molecular del ácido giberélico.....	24
Figura 2.1 Proceso de desinfección (A) Yemas apicales, (B) Lavado con detergente (C) Lavado con agua estéril (D) Lavado con fungicida (E) Inmersión en alcohol (F) Inmersión en hipoclorito de sodio.....	29
Figura 2.2 (A) Explante viable (B) Explante con contaminación fúngica (C) Explante con contaminación bacteriana.....	30
Figura 2. 3 Representación gráfica de las condiciones de necrosis y muerte del tejido (A) Explante muerto (B) Explante necrosado	31
Figura 2.4 (A) Explante sin brote (B) Explante con presencia de brote.....	33
Figura 2.5 (A) Ausencia de callo (B) Poca formación de callo (C) Mediana formación de callo (D) Abundante formación de callo.....	34
Figura 2.6 Numero de entrenudos (A) Brote con 3 entrenudos (B) Brote con 4 entrenudos.....	36
Figura 2.7 Niveles de vigorosidad (A) Brote débil (B) Brote resistente (C) Brote firme (D) Brote vigoroso.	37
Figura 2. 8 Longitud de la planta tomada en centímetros	38
Figura 2. 9 (A) Entrenudos obtenido después del primer subcultivo (B) y (C) Nuevos brotes generados en los subcultivos subsiguientes	38
Figura 2.10 Elaboración de medios de cultivo con GA ₃	40
Figura 2.11 (A) Medio líquido con membrana para soportar el explante (B) Explantes dispuestos en la membrana in vitro.....	42
Figura 2.11 Niveles de enraizamiento (A) Sin raíz (B) Raíz desarrollada al 25% (C) Raíz desarrollada al 50% (D) Raíz desarrollada al 75% (D) Raíz desarrollada al 100%.	43
Figura 2. 12 Longitud de la planta tomada en centímetros.	44

Figura 3.1 Gráfico de explantes contaminados y no contaminados encontrados después de la aplicación de diferentes concentraciones NaClO.....	46
Figura 3.2 Gráfica de frecuencias de explantes no contaminados con respecto a la concentración de NaClO.	47
Figura 3.3 Gráfico de explantes contaminados y no contaminados encontrados después de diferentes tiempos de inmersión en NaClO.	48
Figura 3.4 Gráfica de frecuencia de explantes no contaminados con respecto al tiempo de inmersión en NaClO	48
Figura 3.5 Gráfica de porcentaje de explantes no contaminados con respecto a la interacción concentración de NaClO - tiempo de inmersión.....	49
Figura 3.6 Gráfica del análisis de correspondencia entre la concentración de NaClO y la contaminación.....	50
Figura 3.7 Gráfico de explantes necrosados y no necrosados encontrados después de la aplicación de diferentes concentraciones de NaClO.....	53
Figura 3.8 Gráfica de frecuencias de explantes no necrosados con respecto a la concentración de NaClO aplicada	54
Figura 3.9 Gráfico de explantes necrosados y no necrosados encontrados después de la inmersión en NaClO en dos diferentes tiempos.....	55
Figura 3.10 Gráfica de frecuencias de explantes no necrosados con respecto al tiempo de inmersión en NaClO.	55
Figura 3.11 Gráfica de porcentajes de explantes no necrosados con respecto a la interacción concentración de NaClO - Tiempo de inmersión.....	56
Figura 3.12 Gráfico de explantes vivos y muertos encontrados después de la aplicación de diferentes concentraciones de NaClO.....	59
Figura 3.13 Gráfica de frecuencias de explantes vivos con respecto a la concentración de NaClO.	60
Figura 3.14 Gráfico de explantes vivos y muertos encontrados después de la aplicación de diferentes tiempos de inmersión en NaClO.....	61
Figura 3.15 Gráfica de frecuencia de explantes vivos con respecto al tiempo de inmersión en NaClO.....	62
Figura 3.16 Gráfica de porcentaje de explantes vivos con respecto a la interacción concentración de NaClO - tiempo de inmersión	62
Figura 3.17 Gráfico de tratamientos de desinfección vs porcentaje de explantes contaminados, necrosados y muertos.....	65

Figura 3.18 Gráfico de presencia/ausencia de brotes encontrados al usar BAP en el medio de cultivo.	66
Figura 3.19 Gráfico de presencia/ausencia de brotes encontrados al usar ANA en el medio de cultivo.	67
Figura 3.20 Gráfico de presencia/ausencia de brotes encontrados al usar la interacción ANA y BAP en el medio de cultivo.	68
Figura 3.21 Gráfico de longitud de los brotes con respecto a la interacción de las hormonas ANA y BAP.	70
Figura 3.22 Gráfico del número de entrenudos con respecto a la interacción de hormonas ANA y BAP.	72
Figura 3.23 Gráfico de la formación de callo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	74
Figura 3.24 Gráfico de presencia/ausencia de brotes encontrados al usar BAP en el medio de cultivo	77
Figura 3.25 Gráfico de presencia/ausencia de brotes con respecto a la concentración de ANA.	78
Figura 3.26 Gráfico de presencia/ausencia de brotes con respecto a la interacción de ANA y BAP.	78
Figura 3.27 Gráfico del número de entrenudos con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	80
Figura 3.28 Gráfico de la longitud de brotes con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	82
Figura 3.29 Gráfico de la variable vigorosidad con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	84
Figura 3.30 Gráfico de la presencia / ausencia de brotes con respecto a la concentración de BAP.	86
Figura 3.31 Gráfico de la presencia / ausencia de brotes con respecto a la concentración de ANA.	87
Figura 3.32 Gráfico de presencia/ausencia de brotes con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	87
Figura 3.33 Gráfico del número de entrenudos con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	89
Figura 3.34 Gráfico de la longitud de brotes con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	91

Figura 3.35 Gráfico de la vigorosidad con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.....	93
Figura 3.36 Gráfico de la presencia / ausencia de brotes con respecto a la concentración de BAP.....	94
Figura 3.37 Gráfico de la presencia / ausencia de brotes con respecto a la concentración de ANA.	95
Figura 3.38 Gráfico de la presencia/ausencia de brotes con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.....	95
Figura 3.39 Gráfico del número de entrenudos con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.....	97
Figura 3.40 Gráfico de la longitud de brotes con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.....	99
Figura 3.41 Gráfico de la vigorosidad con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.....	101
Figura 3.42 Gráfico de longitud de brotes con respecto a la concentración de ANA en medio M&S	103
Figura 3.43 Gráfico del nivel de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA en el medio M&S.	104
Figura 3.44 Gráfica del tiempo de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA aplicada en el medio M&S.....	105
Figura 3.45 Gráfico de longitud de brotes con respecto a la concentración de ANA en medio B5.....	106
Figura 3.46 Gráfico del nivel de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA en el medio B5.....	107
Figura 3.47 Gráfica del tiempo de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA aplicada en el medio B5.	108
Figura 3.48 Gráfica de la longitud de brotes con respecto al uso de carbón activado en el medio de cultivo M&S	109
Figura 3.49 Gráfica del nivel de enraizamiento con respecto al uso de carbón activado en el medio de cultivo M&S	110
Figura 3.50 Gráfica del tiempo de enraizamiento con respecto al uso de carbón activado en el medio de cultivo M&S	111
Figura 3.51 Gráfica de la longitud de brotes con respecto al uso de medio M&S líquido.	112

Figura 3.52 Gráfica del nivel de enraizamiento con respecto al uso de medio M&S líquido.....	113
Figura 3.53 Gráfica del tiempo de enraizamiento con respecto al uso de medio M&S líquido.....	114

LISTADO DE ANEXOS

Anexo de resultados

ANEXO A.....	¡Error! Marcador no definido.
A.1 Tablas de contingencia para las variables evaluadas en la etapa de desinfección con respecto a los factores aplicados;	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.1 Tabla de contingencia para la contaminación con respecto a la concentración de NaClO.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.2 Porcentaje de explantes no contaminados con respecto a la concentración de NaClO.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.3 Tabla de contingencia para la contaminación con respecto al tiempo de inmersión.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.4 Porcentaje de explantes no contaminados con respecto al tiempo de inmersión	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.5 Porcentaje de explantes no contaminados con respecto a la interacción concentración de NaClO - tiempo de inmersión;	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.6 Tabla de contingencia para la necrosis con respecto a la concentración de NaClO.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.7 Porcentaje de explantes no necrosados con respecto a la concentración de NaClO	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.8 Tabla de contingencia para la necrosis con respecto al tiempo de inmersión	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.9 Porcentaje de explantes no necrosados con respecto al tiempo de inmersión en NaClO.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.10 Porcentaje de explantes no necrosados con respecto a la interacción concentración de NaClO -Tiempo de inmersión.;	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.12 Porcentaje de explantes vivos con respecto a la concentración de NaClO	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.13 Tabla de contingencia para la muerte de los explantes con respecto al tiempo de inmersión.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A.1.14 Porcentaje de explantes vivos con respecto al tiempo de inmersión.....	¡Error! Marcador no definido.

Tabla A.1.15 Porcentaje de explantes vivos con respecto a la interacción concentración de NaClO - tiempo de inmersión	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO B	¡Error! Marcador no definido.
B.1 Tablas de contingencia y ADEVA para las variables evaluadas en la etapa de inducción de brotes con respecto a los factores aplicados	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.2 Tabla de contingencia para la presencia/ausencia de brotes con respecto a la concentración de ANA.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.3 Tabla de contingencia para la presencia/ausencia de brotes con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.4 Tabla de contingencia para la longitud de los brotes con respecto a la interacción hormonal ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.5 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud de brotes con respecto a la concentración de BAP	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.6 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud de brotes con respecto a la concentración de ANA.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.7 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la longitud de brotes con respecto a la interacción de las hormonas ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.8 Tabla de contingencia para la variable número de entrenudos con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.9 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable número de entrenudos con respecto a la concentración de BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.10 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable número de entrenudos con respecto a la concentración de ANA.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.11 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable número de entrenudos con respecto a la interacción de las hormonas ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.12 Tabla de contingencia para la formación de callo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.13 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable formación de callo con respecto a la concentración de BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla B.1.14 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable formación de callo con respecto a la concentración de ANA.	¡Error! Marcador no definido.

Tabla B.1.15 Análisis de la varianza para la variable formación de callo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO C	¡Error! Marcador no definido.
C.1 Tablas de contingencia y ADEVA para las variables evaluadas en la etapa de multiplicación de brotes con respecto a los factores aplicados	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.1 Tabla de contingencia para la presencia/ausencia de brotes del primer subcultivo con respecto a la concentración de BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.2 Tabla de contingencia para la presencia/ausencia de brotes del primer subcultivo con respecto a la concentración de ANA.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.3 Tabla de contingencia para la presencia/ausencia de brotes del primer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.4 Tabla de contingencia para la variable número de entrenudos del primer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.5 Análisis de varianza para la variable número de entrenudos del primer subcultivo con respecto a la concentración de BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.6 Análisis de varianza para la variable número de entrenudos del primer subcultivo con respecto a la concentración de ANA.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.7 Análisis de varianza para la variable número de entrenudos del primer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.8 Tabla de contingencia para la variable longitud de brotes del primer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.9 Análisis de la varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud de brotes del primer subcultivo con respecto a la concentración de BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.10 Análisis de la varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud de brotes del primer subcultivo con respecto a la concentración de ANA.	¡Error! Marcador no definido.

Tabla C.1.11 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud de brotes del primer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.12 Tabla de contingencia para la variable vigorosidad del primer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.13 Análisis de la varianza y prueba LSD Fisher para la variable vigorosidad del primer subcultivo con respecto a la concentración de BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.14 Análisis de la varianza y prueba LSD Fisher para la variable vigorosidad del primer subcultivo con respecto a la concentración de ANA..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.15 Análisis de la varianza y prueba LSD Fisher para la variable vigorosidad del primer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.16 Tabla de contingencia para la presencia / ausencia de brotes del segundo subcultivo con respecto a la concentración de BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.17 Tabla de contingencia para la presencia / ausencia de brotes del segundo subcultivo con respecto a la concentración de ANA..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.18 Tabla de contingencia para la presencia/ausencia de brotes del segundo subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.19 Tabla de contingencia para la variable número de entrenudos del segundo subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.20 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para variable número de entrenudos del segundo subcultivo con respecto a la concentración de BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.21 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para variable número de entrenudos del segundo subcultivo con respecto a la concentración de ANA..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.22 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para variable número de entrenudos del segundo subcultivo con respecto a la concentración de ANA..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.23 Tabla de contingencia para la variable longitud de brotes del segundo subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.24 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud de brotes del segundo subcultivo con respecto a la concentración de BAP. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.25 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud de brotes del segundo subcultivo con respecto a la concentración de ANA..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.26 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud de brotes del segundo subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.27 Tabla de contingencia para la variable vigorosidad del segundo subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.28 Tabla de contingencia para la variable presencia / ausencia de brotes del tercer subcultivo con respecto a la concentración de BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.29 Tabla de contingencia para la variable presencia / ausencia de brotes del tercer subcultivo con respecto a la concentración de ANA..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.30 Tabla de contingencia para la presencia/ausencia de brotes del tercer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.31 Tabla de contingencia para la variable número de entrenudos del tercer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.32 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable número de entrenudos del tercer subcultivo con respecto a la concentración de BAP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla C.1.33 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable número de entrenudos del tercer subcultivo con respecto a la concentración de ANA.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.34 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable número de entrenudos del tercer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.35 Tabla de contingencia para la variable longitud de brotes del tercer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.36 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud del tercer subcultivo de brotes con respecto a la concentración de BAP.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.37 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud del tercer subcultivo de brotes con respecto a la concentración de ANA.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.38 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud de brotes del tercer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla C.1.39 Tabla de contingencia para la variable vigorosidad del tercer subcultivo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO D.....	¡Error! Marcador no definido.
D.1 Tablas de contingencia y ADEVA para las variables evaluadas en la etapa de enraizamiento con respecto a los factores aplicados	¡Error! Marcador no definido.
Tabla D.1.1 Tabla de contingencia para la variable longitud de brotes con respecto a la concentración de ANA en medio M&S	¡Error! Marcador no definido.
Tabla D.1.2 Análisis de la varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud de brotes con respecto a la concentración de ANA en medio M&S.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla D.1.3 Tabla de contingencia para la variable nivel de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA en el medio M&S.	¡Error! Marcador no definido.

Tabla D.1.4 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable nivel de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA en medio M&S..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.5 Tabla de contingencia para el tiempo de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA aplicada en el medio M&S.**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.6 Tabla de contingencia para la variable longitud de brotes con respecto a la concentración de ANA en medio B5**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.7 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable longitud de brotes con respecto a la concentración de ANA en medio B5..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.8 Tabla de contingencia para la variable nivel de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA en el medio B5..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.9 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para la variable nivel de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA en medio B5. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.10 Tabla de contingencia para el tiempo de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA aplicada en el medio B5.**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.11 Tabla de contingencia para la variable longitud de brotes con respecto al uso de carbón activado en el medio de cultivo M&S**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.12 Tabla de contingencia para la variable nivel de enraizamiento con respecto al uso de carbón activado en el medio de cultivo M&S **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.13 Tabla de contingencia para la variable tiempo de enraizamiento con respecto al uso de carbón activado en el medio de cultivo M&S **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.14 Tabla de contingencia para la variable longitud de brotes con respecto al uso de medio M&S líquido.**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.15 Tabla de contingencia para la variable nivel de enraizamiento con respecto al uso de medio M&S líquido.**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla D.1.16 Tabla de contingencia para la variable tiempo de enraizamiento con respecto al uso de medio M&S líquido.**¡Error! Marcador no definido.**

Anexo estadístico

- Pruebas de hipótesis chi-cuadrado de independencia; **Error! Marcador no definido.**
- Prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia para la contaminación con respecto a la concentración de NaClO. **Error! Marcador no definido.**
 - Prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia para la contaminación con respecto al tiempo de inmersión en NaClO. **Error! Marcador no definido.**
 - Prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia para la necrosis con respecto a la concentración de NaClO. **Error! Marcador no definido.**
 - Prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia para la necrosis con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. **Error! Marcador no definido.**
 - Prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia para la muerte con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. **Error! Marcador no definido.**
 - Prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia para la muerte con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio. **Error! Marcador no definido.**
 - Prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia para la presencia /ausencia de brotes con respecto a la concentración de BAP. **Error! Marcador no definido.**
 - Prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia para la presencia /ausencia de brotes con respecto a la concentración de ANA. **Error! Marcador no definido.**
- Prueba de hipótesis de comparación de proporciones poblacionales; **Error! Marcador no definido.**
- Prueba de Kruskal-Wallis **Error! Marcador no definido.**

LISTADO DE ABREVIATURAS

2,4-D	2,4-dichlorofenoxiacético
ADEVA	análisis de varianza
ANA	ácido α .naftalenácetico
BAP	6-bencilaminopurina
CDP	copalil difosfato
CPP	copalil pirofosfato
CPPU	forclorofenurón
DCA	diseño completamente al azar
GA ₃	ácido giberélico
GA _s	giberelinas
GABA	ácido gamma aminobutírico
GGDP	geranil geranil difosfato
GGPP	geranil geranil pirofosfato
IAA	ácido indol acético
IASA	Instituto Agropecuario Superior Andino
IBA	ácido indol butírico
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
IPP	isopentenil pirofosfato
L	litro
LSD	least significant difference (menor diferencia significativa)
M&S	Murashige & Skoog
mg	miligramos
RE	retículo endoplasmático
TDZ	tidiazurón

RESUMEN

Valeriana scandens es una planta muy conocida por su uso en la industria farmacéutica, la aplicación exhaustiva de prácticas antropogénicas, la explotación indiscriminada de sus principios activos y la ausencia de prácticas de cultivo programado han minimizado en gran manera la presencia de esta especie y de este género en la sierra ecuatoriana, por ello se plantea el cultivo *in vitro* como estrategia de conservación a fin de lograr un ciclo de explotación-recuperación. Yemas apicales, fueron sometidas a un proceso de desinfección utilizando un fungicida sistémico, alcohol al 70% y una concentración de hipoclorito de sodio 1.5% en un medio de cultivo con sales de Murashige y Skoog (M&S) enriquecido con sacarosa 30g L⁻¹ y 1 mg L⁻¹ de brasinólida, obteniendo un 90% de descontaminación, los brotes generados, fueron divididos en sus segmentos nodales para multiplicarlos sobre un medio M&S sin adición hormonal, evaluando su vigorosidad, longitud, número de entrenudos, y formación de callo, en tres subcultivos sucesivos, para garantizar su asepsia; las plántulas obtenidas tras la multiplicación, fueron colocadas en un medio de enraizamiento, donde se observó que la adición de carbón activado permitió generar raicillas más rápidamente y en mayor densidad, dejándolas aptas para su adaptación en el invernadero. Este trabajo permitió estandarizar las etapas de la micropropagación de esta especie y representa un paso importante para la conservación de ésta y muchas especies que están vulnerables o en peligro de extinción.

ABSTRACT

Valeriana scandens is a plant known for its use in the pharmaceutical industry, the development of excessive anthropogenic practices, indiscriminated exploitation of active compounds and the absence of programated culture practices have minimized greatly the presence of this specie and its genus on the mountains of Ecuador. For that reason, *in vitro* culture is presented as a conservation strategy to achieve an operating explotation/recuperation technique. Apical buds were used to apply the disinfection process using a systemic fungicide, 70% alcohol and a concentration of sodium hypochlorite 1.5% on Murashige and Skoog (M&S) medium supplemented with sucrose 30 g L⁻¹ and 1 mg L⁻¹ of brassinolide. A decontamination of 90% was obtained; shoots generated were divided in their nodal segments to proliferate shoots in M&S medium without hormones. Variables as length, number of internodes and callus formation, in three successive subcultures were evaluated in order to assure asepsia of the subcultures. After multiplication, the plantlets obtained were placed in a rooting medium showing that the addition of activated charcoal allows to generate roots faster and in greater density which makes plantlets more suitable for adaptation the greenhouse. This work allowed to establish the methodology for micropropagation of this specie which represents an important step for its conservation and other valeriana species that are already vulnerable or endangered.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El Parque Nacional Cajas, considerado como uno de los lugares más importantes de conservación de especies endémicas y de evolución de muchos taxones, cuenta con cerca de 16 especies de plantas vasculares, las cuales son únicas del lugar. Los géneros endémicos más importantes son *Polylepis* y *Valeriana* (45 especies registradas en Ecuador), de este último se puede encontrar 13 especies, cinco de las cuales, se encuentran únicamente en este parque y dos de ellas, *Valeriana secunda* y *Valeriana cernua* son exclusivas de este centro de endemismo y se encuentran categorizadas como en peligro de extinción (EN) y vulnerable (VU) respectivamente (Rivera, 2007).

Según Xena de Enrech (1993), valeriana es un género reconocido por su extensivo uso en la elaboración de fitomedicinas que contribuyen al control de la ansiedad, el insomnio y principalmente la tensión nerviosa (citado por Duarte-Silva Vanzela & Mariath, 2009, p. 1), sin embargo registros efectuados por Cárdenas C., Docente de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias, IASA I (comunicación personal, Marzo 17, 2010), muestran que *Valeriana officinalis*, y *Valeriana recaudata* se encuentra en grave escasez en el sector de Lloa y Pintag, el Libro Rojo de las especies de la Flora de Ecuador manifiesta que varias especies y cultivares de valeriana ya no se pueden describir en el país.

La pérdida de este género se debe principalmente a dos factores, en primer lugar, a la aplicación exhaustiva de prácticas antropogénicas como quemas, sobre pastoreo, extracción maderera, tala de bosques e inserción de especies animales en el páramo Andino, que poco a poco han ido deteriorando la capa superficial del suelo, provocando una destrucción masiva de los

hábitats y limitando las condiciones para el desarrollo de especies vegetales, que al ser vulnerables representan una gran pérdida tanto científica como industrial y por otro lado a la explotación indiscriminada de sus principios activos sin contar con prácticas de cultivo programado que permitan equilibrar la pérdida con la reinserción de la misma, es por esto que su distribución con los años ha llegado a ser escasa dentro de la sierra ecuatoriana y resulta de vital importancia recuperarla para poder seguir extrayendo sus metabolitos secundarios, sin que ello represente un daño ecológico.

1.2 Justificación del problema

Desde tiempos memorables, la valeriana ha sido considerada como una planta con virtudes medicinales, según Xena de Enrech (1993), es un género reconocido por su extensivo uso en la elaboración de fitomedicinas que contribuyen al control de la ansiedad, el insomnio y principalmente la tensión nerviosa (citado por Duarte-Silva Vanzela & Mariath, 2009, p. 1), sus principios activos están localizadas específicamente en el rizoma, el cual está constituido por ésteres de iridoides bicíclicos conocidos como valepotriatos (0,5-2 %) que actúan como reequilibradores generales del sistema nervioso, además pineno, canfeno, valeranona, ácidos valeriánicos e isovaleriánicos, borneol, mirtenol, valenol, cetonas sesquiterpénicas, heterósidos, alcaloides y aminoácidos libres como ácido gamma amino butírico (GABA), tirosina, arginina y glutamina que actúan como antiespasmódicos, vermífugos, diuréticos, carminativos, analgésicos, hipnóticos, e hipotensores. (Fon negra y Jiménez, 2007).

“La lista de plantas permitidas para la fabricación de fitoterapéuticos elaborada por la Comisión Revisora de Productos Farmacéuticos del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) tiene aprobadas dos especies de valeriana: *Valeriana officinalis* L. (origen europeo) y *Valeriana scandens* L. (origen americano), sin embargo en Colombia las especies de valeriana más empleadas son *V. pavonii* y *V. clematitidis*, debido a que *V. officinalis* es una especie importada de Europa, la cual, recientemente se está

comenzando a cultivar en Colombia mientras que *V. scandens* y sus variantes específicas son abundantes en los Andes del Ecuador y Perú, en alturas inferiores a los 2000 msnm, y aparecen poco representadas en Colombia” (Piñeros, Herreño y Pombo, 2005, p. 24).

Para poder evitar la pérdida de esta valiosa especie, es necesario obtener plantas de valeriana en corto tiempo, a fin de lograr un ciclo de explotación-recuperación, es por ello que el presente trabajo plantea el cultivo *in vitro* como una estrategia de conservación, ya que permite almacenar un resguardo del material clonal por largo tiempo y en un espacio relativamente pequeño, utilizando simplemente pequeñas secciones de la planta, que aportan con la suficiente información genética para regenerar una planta completa.

La técnica de cultivo *in vitro*, nos brinda la oportunidad de producir valeriana a gran escala, evitando así, la pérdida parcial o total de este recurso medicinal en la Sierra Ecuatoriana, para ello se vale de los reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas, giberelinas) que constituyen un aporte significativo al proceso *in vitro*, gracias a que poseen la capacidad de promover la división y diferenciación celular en la plántula, el cual se ve potenciado aún más cuando estas fitohormonas actúan en forma sinérgica ya que dan lugar a la formación de plántulas con mejores respuestas en cuanto al tiempo, tamaño y aptitud para adaptarse a las condiciones de campo.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de ácido α naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA_3) en las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* a partir de yemas apicales de *Valeriana scandens*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Establecer un método de desinfección para las yemas apicales de *Valeriana scandens* a fin de controlar los agentes contaminantes.
- Evaluar la concentración de ANA y BAP adecuada para la inducción de brotes.
- Evaluar la concentración de ANA y BAP adecuada para la etapa de multiplicación.
- Evaluar el efecto de GA₃ en el alargamiento de brotes previo al enraizamiento.
- Evaluar la concentración ideal de ácido naftalenacético (ANA) para utilizarla como hormona de enraizamiento *in vitro* en los medios de cultivo MS y B5.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Características Generales de la Especie

1.4.1.1 Taxonomía

El nombre valeriana proviene del latín "*valere*" que significa coraje, una palabra que quizá refleje lo que necesita para beber la infusión. Otra fuente sugiere los términos "valeo" que significa ser fuerte, o " *valere* "que significa estar en buena salud (Houghton, 1996).

Valeriana scandens está incluida en la siguiente clasificación taxonómica

Reino:	Plantae
Subreino:	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión:	Spermatophyta (plantas con semillas)
División:	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase:	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase:	Asteridae
Orden:	Dipsacales
Familia:	Valerianaceae
Género	Valeriana
Especie	scandens

1.4.1.2 Descripción botánica

Valeriana scandens es una de las más distintivas especies de valeriana, es una planta herbácea y tiene un fuerte y desagradable olor (Houghton, 1996).

Es una enredadera perenne que puede medir hasta seis metros de largo, muy ramificada, con presencia de entrenudos (porción del tallo entre un par de hojas y el siguiente) (Meyer, 1951).

Las hojas que posee son opuestas y cada par en dirección perpendicular al par que sigue, compuestas de tres hojillas llamadas folíolos, los laterales más pequeños y frecuentemente con la base asimétrica, los folíolos más o menos puntiagudos, generalmente con dientes en el margen, a veces con pelillos (Figura 1.1A) (Barrie, 1989).

Las flores son pequeñas y numerosas se encuentran agrupadas en inflorescencias grandes que pueden llegar a medir hasta 40 centímetros de largo, muy ramificadas, en la base de cada ramificación de la inflorescencia se encuentra un par de brácteas de un tamaño aproximado de 2.5 centímetros de

largo. Presentan dos tipos de flores, bisexuales y femeninas; el cáliz en la flor está representado por diminutos diente-cillos en el ápice del ovario, la corola blanca consiste en un tubo acampanado, con la base asimétrica, que hacia el ápice se divide en cinco lóbulos de apariencia triangular, las corolas de las flores bisexuales pueden medir hasta 2.3 milímetros de largo y las de las flores femeninas de un tamaño hasta un milímetro de largo; tiene generalmente tres estambres que permanecen ocultos en el tubo de la corola y exsertos de la flor(Figura 1.1B) (Meyer, 1951).

El fruto es un aquenio oblongo-lineal u oval, de hasta 3.1 milímetros de largo, hacia el ápice presenta de 11 a 15 segmentos largos y plumosos que representan el cáliz desplegado (Meyer, 1951).

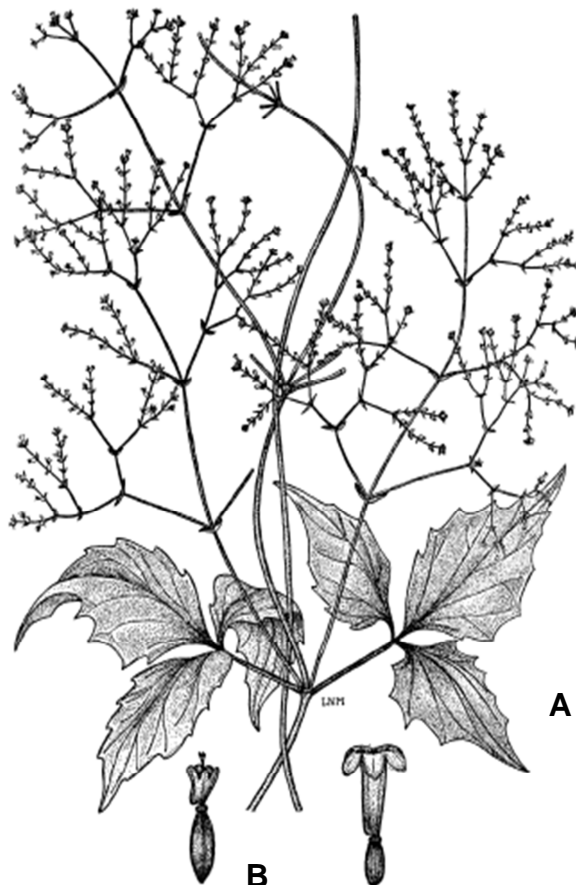


Figura 1.1 Estructura morfológica de *Valeriana scandens* (A) Hojas trifoliadas (B) Flores (Meyer, 1951).

1.4.1.3 Distribución Geográfica de la especie

V. scandens pertenece a la familia Valerianaceae que está conformada por 350 especies distribuidas en todo el mundo excepto en Australia y Nueva Zelanda (Houghton, 1996).

Se ubica en pendientes rocosas, orillas de ríos, arroyos y bosques, laderas densamente arboladas matorrales en las orillas de caminos (Meyer, 1951), "Moderadamente frecuente del bosque mesófilo de montaña y de algunos encinares húmedos, pero sobre todo en la vegetación secundaria" (Rzedowski y Rzedowski, 2003).

1.4.1.4 Usos y propiedades

Desde la antigüedad la valeriana ha tenido un amplio uso en el campo medicinal, los primeros registros se remontan al aprovechamiento de esta familia por sus cualidades aromáticas y amargas (Houghton, 1996).

El médico griego Galeno (131-201 DC), fue probablemente el primero en aludir las cualidades sedantes de la valeriana, sin embargo, no fue sino hasta el final del siglo XVI que su uso se reconoció realmente (Houghton, 1996).

Valeriana es un género usado ampliamente para el tratamiento del insomnio y menos comúnmente en pacientes con ansiedad, por las propiedades sedativas e hipnóticas que posee gracias a la actividad farmacológica de sus componentes individuales como el ácido valérico y los valepotriatos y su interacción con neurotransmisores como el ácido gamma aminobutírico (GABA) (Intermedicina, 2003).

La valeriana es una planta que está llena de historia, su uso original como un perfume o quizás incluso como una fuente de alimento era totalmente diferente a su uso en la medicina natural moderna hoy en día como un sedante y agente calmante (Houghton, 1996).

La raíz de la valeriana tiene actividad sedante, ansiolítica y ligeramente hipnótica, cuyo principal mecanismo se debe a un incremento de la transmisión gabaérgica, se ha comprobado que la raíz de valeriana provoca un aumento de la concentración de GABA en el espacio sináptico debido a una inhibición de su catabolismo y su recaptación producida por los ácidos valeránico y acetoxivalerénico, mientras que otros componentes del aceite esencial tal como la valeranona presentan también efectos sedantes en modelos animales. El incremento de la actividad gabaérgica podría ser debido al aporte de GABA de los propios extractos de valeriana, sin embargo, este no atraviesa de manera adecuada la barrera hematoencefálica, lo que ha sugerido una contribución más importante podría deberse a la glutamina que si atraviesa dicha barrera y además es un precursor del GABA (Salazar, Concha y Ruiz, 2009).

Del mismo modo se ha demostrado la capacidad de unión de extractos de valeriana a receptores GABA-A, atribuida a su contenido en aminoácidos, pero que por sí sola resulta ineficiente para explicar la acción sedativa; en cuanto a los flavonoides se ha demostrado que la 2S(-)hesperidina tiene propiedades sedantes e inductoras del sueño, mientras que la 6-metil-apigenina es ansiolítica y puede potenciar los efectos inductores del sueños de la hesperdina, por otro lado, el ligano 8'-hidroxipinoresinol ha demostrado una alta afinidad para los receptores 5-HT_{1A}. En cuanto a la posible contribución de los valepotriatos, actualmente se considera escasa o nula ya que es poco probable que se encuentren en los productos terminados y su absorción es baja, además los extractos de valeriana presentan una ligera actividad anticonvulsiva frente a convulsiones inducidas por picrotoxina en ratones que resulta coherente con los mecanismos gabaérgicos, por otra parte la

valerianona y algunos otros valepotriatos presentan actividad espasmolítica sobre la musculatura lisa (Salazar, Concha y Ruiz, 2009).

El efecto de valeriana como relajante muscular consiste en la estimulación de las células musculares lisas, y no mediante la interacción con los receptores del sistema nervioso autónomo (Houghton, 1996).

Algunos estudios clínicos han demostrado que 300-600 miligramos de raíz de valeriana reducen el tiempo de latencia del sueño y mejora la calidad del mismo. Por lo que se encuentra indicada en el insomnio leve a moderado, pero para el tratamiento de la ansiedad la evidencia que soporta su eficacia en el tratamiento es limitada (Intermedicina, 2003).

La dosis oral efectiva en adultos es de 1-3 gramos de droga por toma o dosis equivalente de extracto acuoso o etanólico (máximo etanol 70%), como tranquilizante se recomienda hasta tres dosis diarias, para ayudar a conciliar el sueño, una dosis entre media y una hora antes de acostarse; en el caso de niños la dosis proporcional a la del adulto según edad y peso (Salazar, Concha y Ruiz, 2009).

1.4.2 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* constituye una técnica cuyas aplicaciones actualmente son muy utilizadas, ha brindado un gran aporte práctico ya que a través de ella se cultivan explantes en condiciones asépticas en un medio nutritivo artificial de composición conocida y se mantienen en condiciones ambientales controladas. (Roca & Mroginski, 1993). Con esto se logra que la planta desarrolle brotes que posteriormente son multiplicados para finalmente ser llevados a un proceso de aclimatación y comprobar su comportamiento *ex vitro*.

Basado en los estudios de fisiólogos y botánicos, el cultivo de tejidos apareció alrededor de 1950 y desde ese entonces ha posibilitado la obtención y cultivo de plantas a gran escala. (Morgan, 2000).

Las plantas seleccionadas para ser sometidas al proceso *in vitro* son escogidas mediante criterios como: problemas de regeneración *in vivo*, especies difíciles de propagar, especies que al ser propagadas aumentan su valor comercial o especies a las cuales se pretende aplicar ingeniería genética (Estopá, 2005).

Los avances en el cultivo *in vitro* ha desarrollado toda una industria de micropropagación especialmente en Europa y Estados Unidos que paso a paso ha ido extendiéndose hasta alcanzar incluso a América Latina, Asia y África logrando así conformar alrededor de 600 compañías en el mundo, con una producción anual de más de 500 millones de unidades (Pérez, 1998).

1.4.2.1 Etapa 0: Selección del material vegetal

Para la selección del material vegetal es importante considerar el sistema de propagación de la planta, es decir, si la reproducción de la planta se da por semillas, los explantes ideales constituyen las partes embrionales, mientras que las especies que se reproducen vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos son los explantes más utilizados (Roca & Mroginski, 1993).

Si se utilizan plantas directamente del campo es importante realizar un cuidado pre-cultivo en el cual podría incorporarse controles fitosanitarios con fungicidas a fin de aminorar la contaminación que podría presentarse al realizar el proceso *in vitro*.

1.4.2.2 Etapa 1: Fase de desinfección

Los procesos de desinfección comprenden una serie de tratamientos que permiten eliminar agentes contaminantes que competirán ventajosamente con el explante (Roca y Mroginski, 1993) y a la vez permitan mantener vivo el explante, entre las sustancias más utilizadas se encuentran, el hipoclorito de sodio (2-5%), el hipoclorito de calcio (6-12%) este último considerado menos tóxico y etanol una concentración de 70%. Además se adicionan surfactantes como tween 20 que actúa rompiendo la tensión superficial facilitando así el contacto entre los químicos y el explante, sin embargo no se puede generalizar sobre un tipo de desinfección ya que cada especie es un caso particular (Abdelnour-Esquivel y Vincent, 1994).

Los procesos de desinfección están estrechamente relacionados con el tamaño del explante, mientras más pequeño sea, menos será el riesgo de contaminación sin embargo, hay que asegurarse que el tamaño del explante sea el adecuado para permitir el establecimiento del tejido (Abdelnour-Esquivel y Vincent, 1994).

1.4.2.3 Etapa 2: Fase de inducción

En esta etapa, el tejido utilizado atraviesa un proceso de estrés que altera su metabolismo celular y es ahí cuando debe responder de la mejor manera a las condiciones, es decir que las células sobrevivan al cambio hormonal que se produce y puedan desarrollarse en el medio de iniciación en el que son colocadas, además en esta etapa juega un papel importante la aplicación de reguladores de crecimiento que mejoran las respuesta por parte del explante (Roca y Mroginski, 1993).

1.4.2.4 Etapa 3: Fase de multiplicación

Durante esta etapa, se analiza la relación que se establece entre el explante y los reguladores de crecimiento presentes en el medio, con el fin de lograr obtener un máximo coeficiente de multiplicación. Los explantes que ya han atravesado el proceso de desinfección superficial, se han adaptado eficientemente al medio de iniciación, se desarrollan y originan brotes ya sean estos axilares o adventicios y constantemente son subcultivados en un nuevo medio controlando igualmente la asepsia para evitar el apareamiento de contaminación, de esta manera se logra aumentar en gran manera la cantidad de plantas con las que se contaba en la etapa inicial del proceso *in vitro* (Roca y Mroginski, 1993).

1.4.2.5 Etapa 4: Fase de enraizamiento

En esta etapa del proceso de cultivo, se cambia el explante a un medio de cultivo que contenga una baja cantidad de sales y además se realiza un cambio en el balance hormonal, el cual se logra disminuyendo la concentración de citoquininas y aumentando las auxinas exógenas; en algunas especies, solamente es necesario la eliminación de las citoquininas exógenas para estimular la diferenciación del sistema radical (Roca & Mroginski, 1993).

No todas las plantas necesitan atravesar un proceso de enraizamiento ya que pueden dar origen a raíces en el mismo medio de multiplicación es decir que ambos procesos suceden de forma simultánea (Roca & Mroginski, 1993).

1.4.2.6 Aclimatación de los explantes enraizados

Los explantes enraizados, se encuentran listos para ser transferidos al campo, sin embargo estos son muy sensibles y requieren de una gradual adaptación a las condiciones medioambientales del invernadero, es por esto

que se debe ser muy cuidadoso en esta etapa y ofrecer condiciones mínimas de estrés a la planta para que se produzca una excelente multiplicación y desarrollo *ex vitro*.

El proceso de aclimatación es un proceso decisivo dentro del proceso *in vitro*, ya que las condiciones a las que van a ser transferidos no son asépticas, ni a luz, temperatura y humedad controladas, y principalmente donde el crecimiento se convierte en autotrófico, un factor muy importante en esta adaptación lo constituye la humedad relativa la cual es muy elevada en condiciones *in vitro* aquí los explantes tienen estomas que no están adaptados para responder al descenso de la humedad y son demasiado lentos para evitar la desecación del explante por lo que la aclimatación debe incluir un cambio progresivo, disminuyendo la humedad e incrementando la intensidad de luz (Sabit, 2006).

1.4.3 Factores que influyen en el cultivo *in vitro*

1.4.3.1 Material Vegetal

Idealmente las plantas donadoras del material vegetal deben haber permanecido en un estricto cuidado tanto en invernadero como en cámaras de ambiente controlado, sin embargo la mayoría de cultivos deben realizarse con explantes cultivados en el campo, lo que acarrea consigo una gran probabilidad de contaminación por lo que si es necesario utilizar este tipo de explantes se recomienda:

- Impedir las infecciones de insectos ya que estos son portadores de enfermedades.
- Utilizar fungicidas o bactericidas para controlar la proliferación de hongos.

- Mantener la humedad tan baja como sea posible en el invernadero
- Permitir a las plantas secarse parcialmente antes de iniciar la esterilización y el aislamiento
- No mojar las plantas al regar, añadir el agua directamente a la maceta, ya que el agua puede producir la reproducción y propagación de microorganismos (Pierik, 1990).

La selección del material vegetal constituye una etapa muy importante en el proceso de cultivo *in vitro* ya que de ello depende en gran manera el éxito del desarrollo vegetal por lo que se requiere en lo posible que el material sea lo más homogéneo posible, sano, con un genotipo adecuado y en un estado fisiológico adecuado ya que este tiene un fuerte efecto sobre la división celular y la regeneración *in vitro* (Pierik, 1990).

1.4.3.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo es una combinación sólida o líquida de nutrientes y agua, esenciales para el desarrollo del explante, aunque los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie, este debe incluir macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl) (Roca y Mroginski, 1993).

Los principales componentes de los medios de cultivo son los siguientes:

El agua, ya que representa el 95% de su composición, por tal razón es necesario que atraviese un proceso de destilación (Pierik, 1990), la utilización de agua corriente conlleva un efecto negativo sobre la preparación de medios

de cultivo ya que a más de contener contaminantes orgánicos y microorganismos puede poseer trazas de iones calcio que afectarían la composición del medio precipitando algunos componentes de los mismos (Roca y Mroginski, 1993).

El agar, ya que se utiliza como gelificante y permite la retención de agua y adsorción de compuestos, mientras mayor es la concentración, mayor es la retención de agua que puede alcanzar, debe tener una densidad que permita que el explante pueda absorber los nutrientes pero que al mismo tiempo los mantenga firmes para que tenga un crecimiento adecuado (Pierik, 1990; Evans *et al.*, 2003).

El azúcar, como fuente de carbono, ya que los explantes se desarrollan en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis, la concentración ideal varía en el rango de 1 a 5% de sacarosa, sin embargo debe tomarse en cuenta la edad y el tipo de explante para administrar una concentración, ya que por ejemplo los embriones muy jóvenes necesitan concentraciones altas de azúcar (Pierik, 1990).

Las vitaminas que aunque se requieren en una concentración mínima, actúan catalizando sistemas enzimáticos (Moran y Caho, 2003).

La nutrición mineral, cuya efectividad radica en la correcta mezcla tanto de macronutrientes como de micronutrientes como lo indica el cuadro 1.1

Cuadro1.1 Concentración de macro y microelementos en un medio de cultivo
(Tomado de Evans *et al.*, 2003).

	ELEMENTOS	CONCENTRACIÓN
Macroelementos	Nitrógeno (NO ₃ ⁻) (NH ₄ ⁺)	20 - 40 mM
	Azufre (SO ₄ ²⁻)	1 - 3 mM
	Fósforo (PO ₄ ³⁻)	1 - 3 mM
	Calcio	1 - 3 mM
	Magnesio	1 - 3 mM
	Potasio	20 - 30 mM
	Microelementos	Hierro
Boro		-
Cobalto		0,1 uM
Cobre		0,1 uM
Iodo		-
Manganeso		5 - 30 uM
Molibdeno		0,1 uM
Zinc		5 - 30 uM

1.4.3.3 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos involucrados en el desarrollo, crecimiento y actividad metabólica de las plantas, constituyen un elemento importante en el cultivo *in vitro* ya están encargados de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza y además determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta (Pierik, 1990). Debido a que desencadenan respuestas en muchas partes del vegetal, las concentraciones adecuadas de los mismos varía con respecto a la especie, órgano, estado de desarrollo y factores ambientales es por esto que no se puede generalizar acerca de los efectos de estos compuestos en los procesos de crecimiento, para que el sistema de respuesta sea eficiente el regulador de crecimiento debe encontrarse en la cantidad adecuada, debe ser reconocido por los receptores de las células blanco y dar lugar a la formación del complejo hormona-receptor para que de esta manera inicie la transducción de señales, la cual inicia una serie de cambios que integran una respuesta compleja que inducen a la respuesta fisiológica (Kurina, 2009). Los reguladores de

crecimiento más importantes involucrados en el proceso de cultivo *in vitro* son las auxinas, citoquininas, giberelinas, brasinoesteroides (Roca y Mroginski, 1993).

Auxinas

Las auxinas constituyen un grupo de hormonas vegetales que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal, afectan al crecimiento del tallo, hojas, raíces, desarrollo de ramas laterales y frutos, estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución (Pierik, 1990). Los efectos fisiológicos más importantes en las plantas son: inducción de la división celular, formación de callo, formación de raíces adventicias, aumento de la extensibilidad de la pared celular y participación en la diferenciación celular y en el fenómeno de dominancia apical (CONICET, 2004).

Las auxinas se encuentran distribuidas en toda la planta, sin embargo las concentraciones más altas se localizan en las regiones meristemáticas es decir en aquellas que tiene un crecimiento activo (Sánchez & Valverde, 2006), su transporte a lo largo de la planta comprende un proceso dependiente de energía en el cual se demuestra su fuerte polaridad, las auxinas se trasportan desde la parte apical de la planta hacia su base (transporte basipétalo), este flujo hace que se reprima el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniéndose así la dominancia apical (Sánchez & Valverde, 2006).

Según Takahashi (1986), la ruta biosintética más común para la formación de AIA se produce a partir de L-triptófano, mediante una serie de acciones enzimáticas hasta llegar a la obtención de AIA por deshidrogenación y oxidación (Figura 1.2) (citado por Kurina, 2009, p. 6).

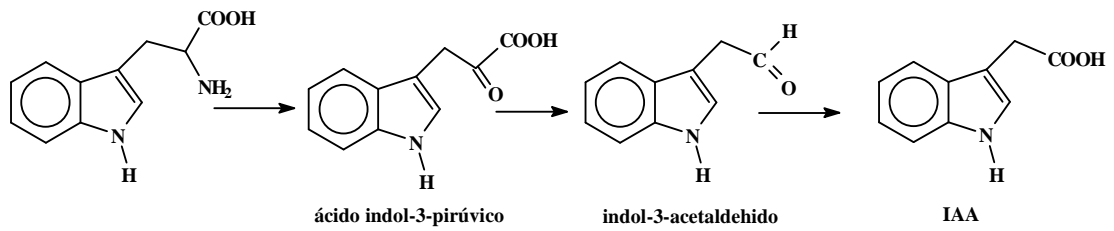


Figura 1.2 Ruta biosintética para la formación de AIA (Kurina, 2009).

La auxina natural se metaboliza por dos rutas principales: el metabolismo oxidativo o peroxidativo y la conjugación con aminoácidos y azúcares (Figura 1.3). El primero de ellos genera, como principal producto en plantas superiores, al indol-3-aldehído, mientras que como metabolitos mayoritarios de la segunda ruta se producen ácido indol-3-acetilaspártico y 1-(indol-3-acetil)-D-glucosa (citado por Kurina, 2009, p. 6).

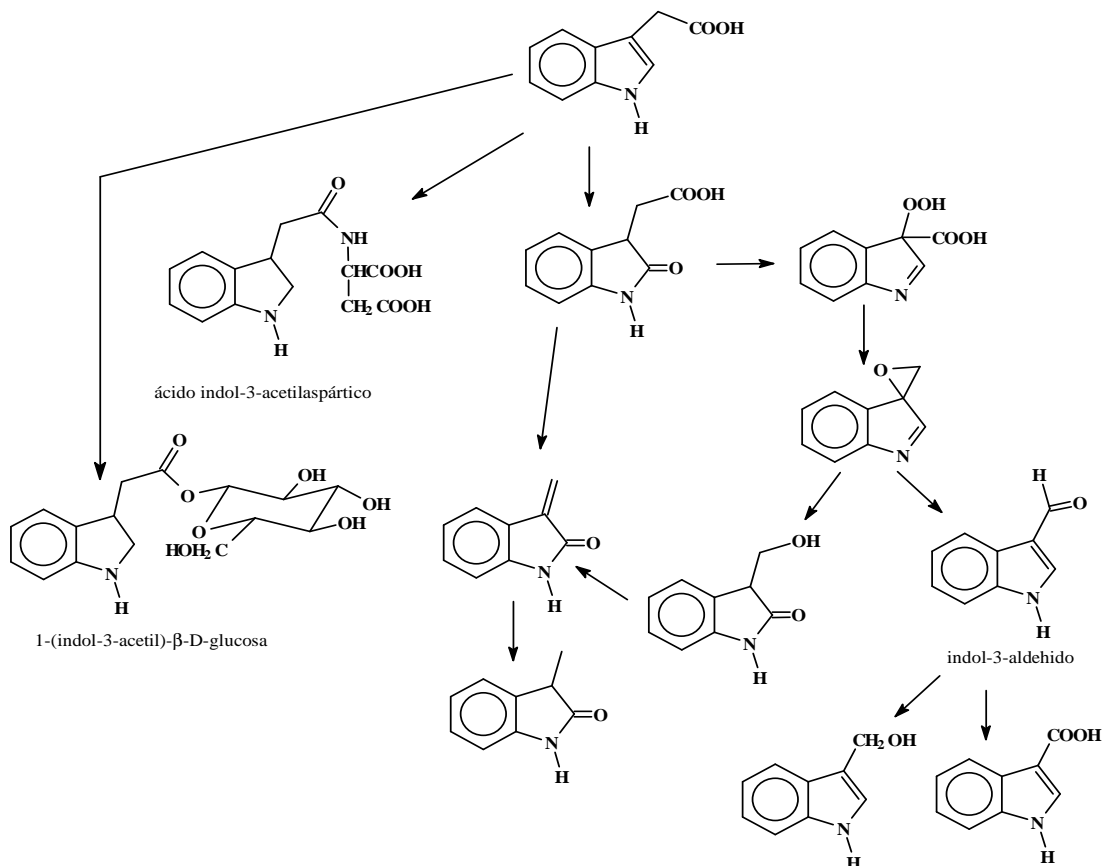


Figura 1.3 Ruta biosintética de una auxina natural (Kurina, 2009).

Tras el descubrimiento del AIA, se pensó que, si una estructura tan simple era capaz de producir respuestas tan importantes sobre el crecimiento, tendría que haber compuestos con propiedades análogas; por lo que se realizaron ensayos y así, se descubrió que compuestos como el ácido indenoacético, el ácido 2-benzofuranacético, el ácido 3-benzofuranacético, el ácido naftalenacético, también eran capaces de favorecer el crecimiento de las células. Además, se encontró que algunos ácidos fenoxiacéticos tenían actividad auxínica lo que llevó al descubrimiento del 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que posee una gran actividad (Figura 1.4). A partir de aquí se desarrolló una amplia gama de moléculas con actividad auxínica, como el ácido 2-metil, 4-cloro fenoxiacético (MCPA) y el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ambos con propiedades herbicidas cuando se emplean a concentraciones elevadas y utilizados como armas químicas en la guerra de Vietnam (Roca y Mroginski, 1993).

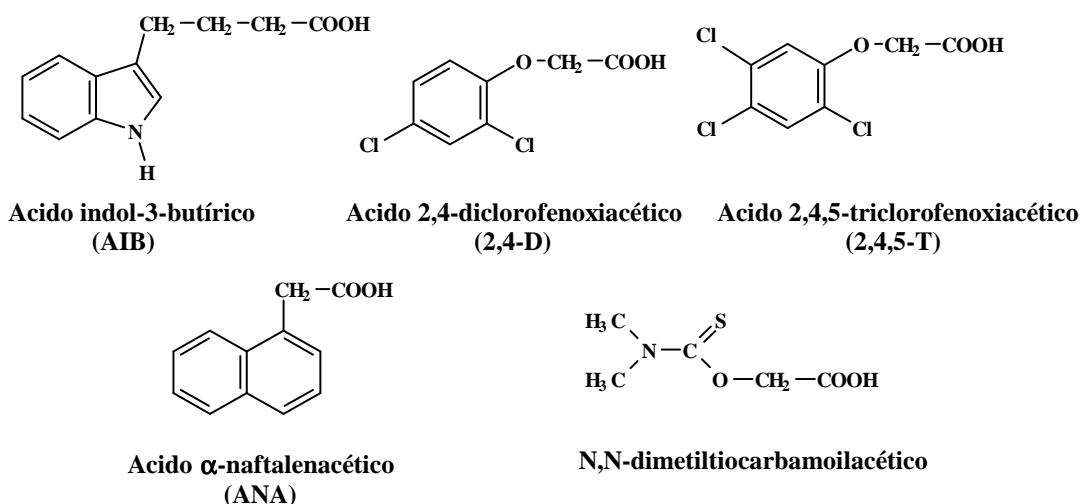


Figura 1.4 Auxinas sintéticas (Kurina, 2009).

El ácido α -naftalenacético es una auxina sintética utilizada normalmente para inducir la formación de raíces adventicias, a diferencia de las auxinas naturales como el ácido indol acético no son fácilmente degradadas por enzimas naturales de las plantas ni por los microorganismos (Raven, Evert & Eichhorn, 1992). Existen estudios que indican una mayor eficiencia de las

auxinas sintéticas como el ANA o el IBA respecto del IAA, esto puede deberse a que en el caso de NAA, no puede ser degradado por la IAA-oxidasa y otras enzimas encargadas de la degradación del IAA, lo que hace que esta permanezca más tiempo en el tejido originando en consecuencia mejores respuestas.

Citoquininas

Las citoquininas son hormonas vegetales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos, comprenden dos grupos químicos: los conformados a base de adeninas, en el cual se ha identificado a la zeatina de la cual se derivan muchas otras citoquininas activas como la ribofuranosilzeatina, la glucopiranosida de zeatina, etc. y las citoquininas a base de fenilureas en las que destaca la presencia de la difenilurea y algunos derivados de ésta como Forclorfenurón (CPPU) o Tiazurón (TDZ) (Mok, D. & Mok, M., 2001)

Las citoquininas son un grupo de sustancias que al igual que las auxinas intervienen en varios fenómenos fisiológicos entre los que están: Crecimiento celular y organogénesis en callo, participación en la síntesis y desarrollo de los cloroplastos, inducción a la formación de proteínas fotosintéticas y estructurales de membranas tilacoidales, retraso de la senescencia gracias a que evitan la degradación de proteínas existentes e inducen la síntesis de nuevas especialmente de aquellas que estabilizan clorofilas y porque poseen un efecto de movimiento diferencial mediante el cual los nutrientes se movilizan a la región de la planta donde se encuentran en mayor concentración (Sánchez & Valverde, 2006). La aplicación externa de citoquininas a un tejido, promueve en éste un mecanismo autoinductor de síntesis de citoquininas, con lo que su contenido y efecto fisiológico puede ir más allá del sitio en el que se aplicó (a todos los órganos de la planta), produciendo un beneficio más generalizado (Mok, D. & Mok, M., 2001).

La síntesis de estos reguladores de crecimiento tiene lugar tanto en los meristemas apicales de las raíces como en los tejidos embrionarios, su transporte a lo largo de la planta ocurre vía acropétala es decir desde el ápice de la raíz hasta los tallos, mediante el xilema (Sánchez & Valverde, 2006). Las citoquininas se sintetizan en cualquier tejido vegetal, sea este, semillas, tallo, raíz, flores o frutos, aunque se acepta generalmente que es en la raíz en donde tiene lugar la mayor producción de esta hormona. En los lugares del vegetal en donde se ha iniciado un proceso de diferenciación y/o una intensiva división celular, hay una mayor producción de citoquininas, es decir que cualquier tejido o etapa de la planta que no presente actividad de crecimiento activo, estará produciendo pocas citoquininas en sus partes terminales (Mok, D. & Mok, M., 2001).

Según Roca y Mroginski, 1993, el 6- bencilaminopurina (BAP), es una citoquinina sintética que pertenece al grupo de los análogos N6-benciladenina y se utiliza más que la kinetina y la zeatina (Figura 1.5)

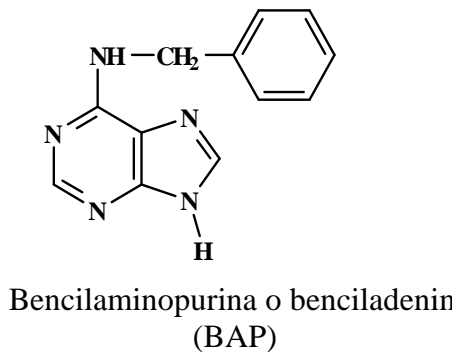


Figura 1.5 Estructura molecular del 6- bencilaminopurina (Kurina, 2009).

La función más importante del BAP es la de estimular la división celular cuando actúan junto a una auxina, ambos compuestos deben estar en balance ya que una alta relación auxina/citoquinina estimula la proliferación de raíces mientras que una baja relación auxina/citoquinina estimula la proliferación de tallos (Zeiger y Lincoln, 2007).

Giberelinas

Según Rademacher (1997), las giberelinas constituyen una familia de fitohormonas diterpénicas la cual guarda una estrecha relación con el núcleo del ent-giberelano, el cual tiene una distribución tanto en plantas como en hongos (citado por Contreras, Faini y Rojas, 2001, p. 194-205). Las giberelinas son compuestos que se conocen desde 1926 cuando se aislaron a partir del hongo *Gibberella fujikuroi* (Roca y Mroginski, 1993).

Las giberelinas son hormonas que tienen una acción sobre procesos como germinación de semillas y yemas, floración y fructificación, pero sin lugar a dudas la función principal de estos compuestos lo constituye la elongación celular, la cual es diferente a la producida por las auxinas ya que en este caso se controla la elongación de los entrenudos. Las giberelinas inducen el crecimiento provocando una alteración en lo que se refiere a la distribución de calcio en los tejidos, estas hormonas activan genes que sintetizan ARNm, el cual contribuye de forma positiva a la síntesis de enzimas hidrolíticos, como por ejemplo la α -amilasa, la cual desdobra el almidón en azúcares, resultando así en la producción de alimento para la planta y de esta manera haciendo que incremente su longitud, además se conoce que las giberelinas tienen control sobre la expresión de los genes involucrados en la síntesis de proteínas del tonoplasto, y la formación de canales de agua que regulan el flujo hídrico dentro de la vacuola durante el proceso de expansión (Kurina, 2009).

El transporte de las giberelinas es mediante el floema, su síntesis tiene lugar en ciertos tejidos (órganos reproductores, ápices de tallos, flores, raíces, entrenudos, semillas inmaduras, frutos) y se transportan a otros. Las formas de transporte son normalmente intermedias o inactivas, que se terminan de sintetizar o de activarse en el tejido receptor (David y Vergara, 2009).

Para la biosíntesis de las giberelinas incluye primero la formación de su precursor, el GGPP (geranil geranil pifosfato) para lo cual se pueden dar lugar 2 rutas: Síntesis del isopentenil pirofosfato (IPP) o Ruta de los terpenoides, cuando se ha formado el IPP se produce la formación del GGPP en los proplastidios. Las giberelinas, diterpenoides tetracíclicos, se derivan del GGDP, que es un diterpenoide lineal, en 3 etapas:

- Ciclación.- Esta etapa se da mediante dos procesos, primero el GGDP se transforma en CPP y el CDP se convierte en ent-kaweno (tetracíclico). Catalizado por ciclasas en los proplastidios.
- Oxidaciones.- Este paso tiene lugar para originar el aldehído de GA₁₂. El ent-kaweno se transforma en ácido ent-kawenoico, y posteriormente el ácido ent-kawenoico se transforma en aldehído de GA₁₂. Catalizado por monooxigenasas dependientes de P450 en el RE.
- Formación del resto de GAs a partir del Ald GA₁₂.- En esta etapa se da la transformación del ALd GA₁₂ en GA₁₂ (puede tener lugar en dos partes: en el RE (catalizado por una monooxigenasasa) o en el citosol (catalizado por una diosigenasa).

El resto de reacciones de esta etapa ocurren en el citosol, catalizadas por dioxigenasas: la primera modificación de la estructura básica es la oxidación, generándose distintas giberelinas en cada etapa oxidativa y posterior eliminación del C en posición 20 (David y Vergara, 2009).

El ácido giberélico GA₃(Figura 1.6), constituye la giberelina más importante, se conoce que su formación tiene lugar en los primordios apicales de las hojas, en puntas de raíces y en semillas en desarrollo, sin embargo su movimiento a lo largo de la planta no demuestra una gran polaridad como las auxinas, aunque en algunas especies se ha visto que se distribuyen mediante

un movimiento basipétalo se le atribuye más bien un movimiento bidireccional ya que se la ha podido aislar de exudados del xilema (Kurina, 2009).

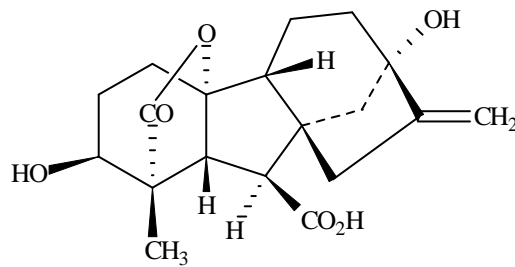


Figura1.6 Estructura molecular del ácido giberélico (Kurina, 2009).

Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis), es un compuesto termolábil, pierde el 90% de su actividad biológica después del proceso del autoclavado (Pierik, 1990).

Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides constituyen reguladores de crecimiento de origen natural, que tiene un efecto a bajas concentraciones lo que los hace muy atractivos y producen una aceleración sobre los ritmos de crecimiento vegetal. (Iglesias, Leliebre, Pérez, y Coll, 1997)

El primer brasinoesteroide aislado fue la brasinolida en el año de 1979 a partir del nabo *Brasica napus*, desempeñan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo, participando en procesos de expansión, división y diferenciación celular en los tejidos jóvenes de las plantas en crecimiento (Adam, 1998).

Estudios realizados por Choe (2010) han demostrado que los brasinoesteroides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, se han encontrado estos reguladores de crecimiento en una especie de algas (*Hydrodictyon reticulatum*) y pteridofitas (*Equisetum arvense*), además 5 especies de gimnospermas y 37 especies más de angiospermas.

La castasterona es uno de los brasinoesteroides naturales más ampliamente distribuido, está presente en alrededor de 33 especies, luego tenemos a la brasinolida, el tifasterol, la teasterona y la 6-deoxocasterona, de estos la brasinolida es la más activa biológicamente (Fujioka & Sakurai, 1997).

Los brasinoesteroides naturales que se han identificado hasta la actualidad en diversas especies vegetales tienen su origen en el escualeno, este da origen a los esteroides vegetales entre los que se incluyen: esterol, sitoesterol, estigmasterol, campesterol y colesterol, de estos el campesterol mediante una compleja vía biosintética da lugar a los brasinoesteroides (Fujioka & Yokota, 2003).

Los procesos que se encuentran influenciados por acción de la brasinolida son: Promover la elongación de tejidos, acelerar la dediferenciación de protoplastos y regeneración de la pared celular, hiperpolarizar potencial eléctrico de la membrana, gravitropismo, procesos de movilización dentro de las plantas, estimulación de la actividad fotosintética, acelerando la fijación de CO₂, estimulación del crecimiento de callos, actuando sinérgicamente con auxinas y citoquininas y la incrementación de la biosíntesis de proteínas y azúcares (Rossi, 2005).

1.4.4 Factores físicos

El cultivo *in vitro* está determinado por una serie de factores físicos, lo más importantes son: temperatura, fotoperiodo y pH.

La temperatura ideal es generalmente 3-4°C más alta que la correspondiente para el crecimiento *in vivo* (Pierik, 1990).

El crecimiento vegetal está determinado por el grado de alcalinidad o acidez dependiendo de cada especie, pero en general se conoce que un rango de 4.5 a 7 es ideal para el desarrollo de las plántulas (Moran y Cahó, 2003).

El fotoperíodo constituye un factor muy importante a considerar ya que los explantes cultivados *in vitro* no son fotosintéticamente eficientes, por lo que el tiempo de exposición a luz va a afectar los procesos morfogénicos de los cultivos y las actividades enzimáticas que regulan la síntesis de determinados compuestos (Moran y Cahó, 2003).

1.5 Sistema de hipótesis

La aplicación de reguladores de crecimiento ANA, BAP y GA₃ en las etapas de inducción, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Valeriana scandens* tiene un efecto positivo en la regeneración de plantas.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación geográfica de la investigación

El proyecto se realizará en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, de la carrera de Ingeniera en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército, el cual se encuentra ubicado en Sangolquí, cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha a 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; altitud: 2516 msnm.

2.2 Selección, colecta y transporte del material vegetal

La recolección del material vegetal para esta investigación se realizó en la Provincia de Tungurahua, ciudad de Ambato, parroquia Aguaján, ubicada a 01° 18,948 S; 078° 43,012 O a una altitud de 2856 msnm.

Las plantas recolectadas fueron colocadas en macetas que contenía tierra propia del lugar de recolección para de esta manera asegurar su mejor adaptación y transportadas hasta el Laboratorio.

La selección del material vegetal es un paso importante, ya que es en esta etapa en donde se escogerán a los mejores individuos para su posterior utilización en la fase de laboratorio, es por esto que las muestras recolectadas deben ser las mejores en cuanto a características fenotípicas.

Las muestras recolectadas fueron sometidas a condiciones de invernadero con temperatura y humedad controladas y una vez aclimatadas en el invernadero las plantas fueron sometidas a un tratamiento fitosanitario por

aspersión una vez por semana durante un mes, con un fungida sistémico y de contacto cuyo principio activo está formado por: 2 metoxicarbamilobencimidazol (Carbendazim) y Bisulfuro de tetrametiltiocarbamilo el cual es absorbido por las raíces y los tejidos verdes y transportado en sentido acrípeto es decir desde la base hacia el ápice.

Además se realizó aspersiones con una solución de 40 partes por millón (ppm) de brasinolida una vez por semana durante un mes para estimular y acelerar el crecimiento en la planta.

2.3 Fase de establecimiento

2.3.1 Desinfección de las muestras

Para el protocolo de desinfección, las yemas seccionadas de la planta (de un tamaño promedio de uno a dos centímetros), se sometieron a un lavado con agua estéril y 3 gL^{-1} de detergente en polvo por un tiempo de 10 minutos, a continuación se realiza un lavado con agua estéril durante 5 minutos, seguidamente se realiza un lavado con una solución del fungicida a una concentración de 0.175% de 2 metoxicarbamilobencimidazol (Carbendazim) y 0.075% de Bisulfuro de tetrametiltiocarbamilo durante 10 minutos, además de un lavado con agua estéril durante 5 minutos, para después sumergirlas en una solución de etanol al 70% por 1 minuto, seguido de una solución de hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones (0.5, 1, 1.5%) durante un tiempo de (3 y 5 minutos) a esta última se adiciona tween 20, para potenciar su efecto (Figura 2.1) finalmente se realiza un lavado en agua estéril para eliminar el cloro y se procede a su siembra en medio de cultivo M&S sin reguladores de crecimiento, para evidenciar el efecto del proceso de desinfección para evitar la contaminación tanto fúngica como bacteriana, en la cámara de siembra previamente esterilizada con luz ultravioleta por 15 minutos seguido por flujo de aire estéril igualmente por 15 minutos, bajo condiciones completamente asépticas.

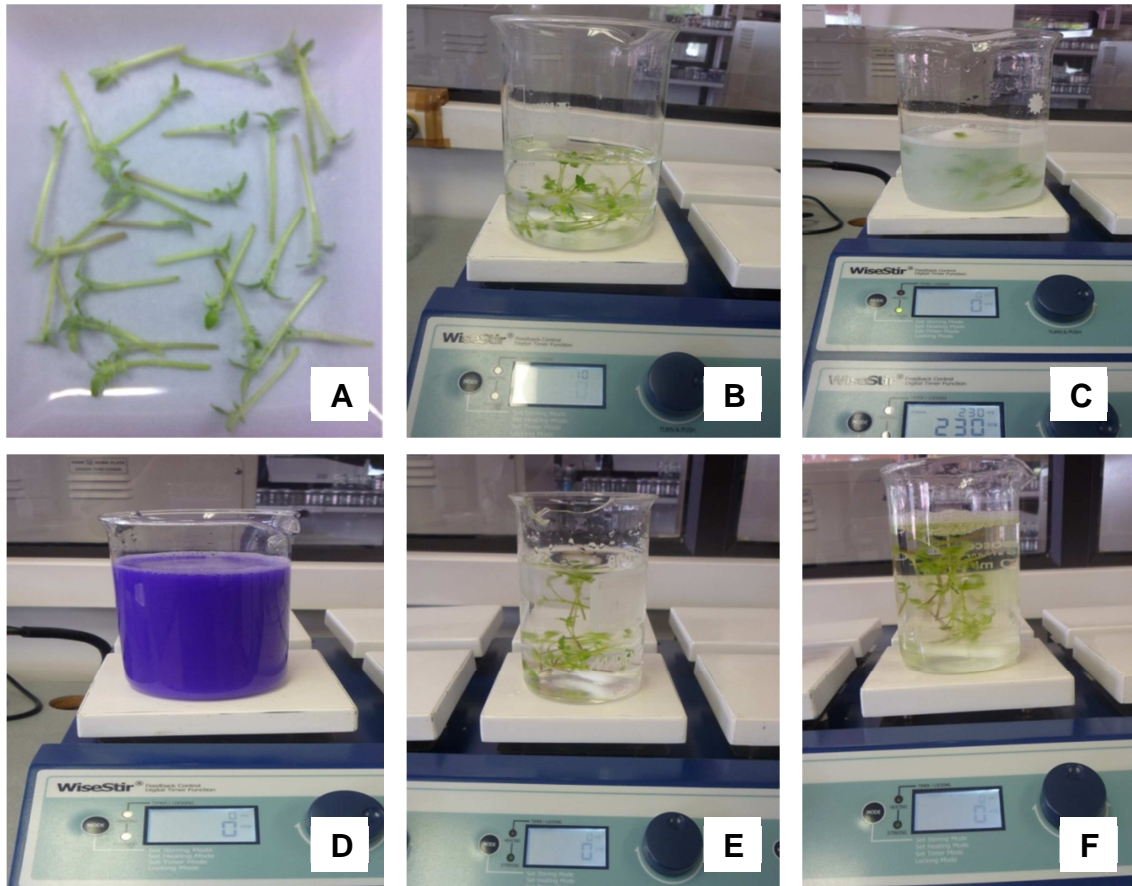


Figura 2.1 Proceso de desinfección (A) Yemas apicales, (B) Lavado con detergente (C) Lavado con agua estéril (D) Lavado con fungicida (E) Inmersión en alcohol (F) Inmersión en hipoclorito de sodio

En la tabla 2.1 se detallan los tratamientos de desinfección utilizados

Tabla 2.1. Tratamientos aplicados para la desinfección de yemas apicales.

Tratamiento	Concentración Cloro (%)	Tiempo (min)
T1	0.5	3
T2	1	3
T3	1.5	3
T4	0.5	5
T5	1	5
T6	1.5	5

Se realizó 10 repeticiones por cada tratamiento, siendo la unidad experimental un frasco con una yema (el explante), las cuales se incubaron a temperatura y humedad relativa ambiente y bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. Las variables de respuesta evaluadas fueron:

Contaminación.- Mediante observación se determinó la presencia de colonias bacterianas o fúngicas y se asignó el valor de "0" mientras que a un explante no contaminado se le asignó el valor de "1" (Figura 2.2)

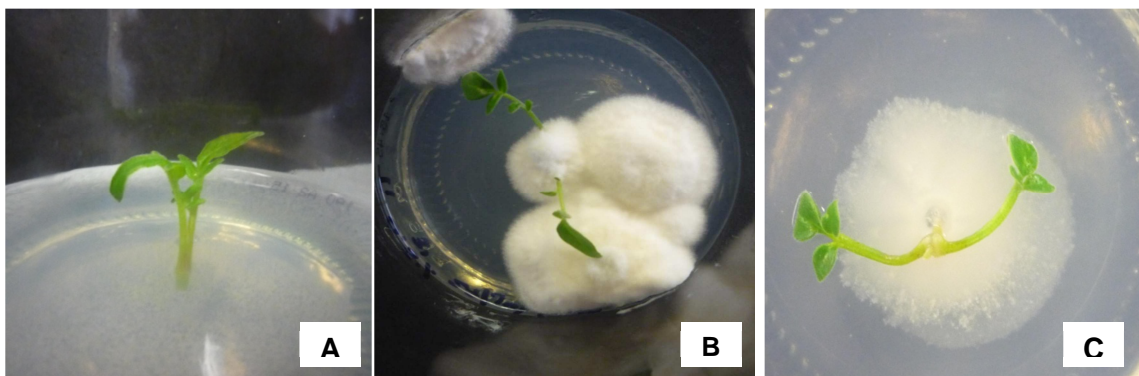


Figura 2.2 (A) Explante viable (B) Explante con contaminación fúngica (C) Explante con contaminación bacteriana

Necrosis.- Mediante la observación se determinó si un explante presentó necrosis y se le asignó el valor de "0", mientras que a un explante no necrosado se le asignó el valor de "1". (Figura 2.3 A).

Muerte.- Mediante la observación se determinó si un explante está muerto es decir una coloración blanca del tejido que al igual que la necrosis anula la viabilidad y crecimiento del explante y se le asignó el valor de "0", mientras que a un explante viable se le asignó el valor de "1". (Figura 2.3 B)

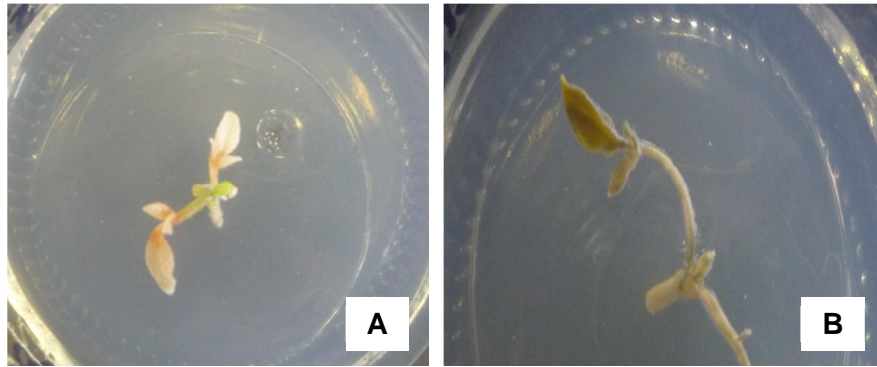


Figura 2. 3 (A) Explante muerto (B) Explante necrosado.

La evaluación se realizó al cabo de un mes y para el análisis estadístico de los datos se empleó un análisis exploratorio utilizando tablas de contingencia y gráficas y un análisis inferencial en el cual se aplicó pruebas de hipótesis chi-cuadrado de independencia, análisis de correspondencias e intervalos de confianza de acuerdo a cada variable.

2.4 Inducción de brotes

Ya establecido el mejor tratamiento de desinfección se continuó con la siguiente etapa del proceso *in vitro*, en la cual se indujo la formación de brotes capaces de regenerar plantas completas (Roca y Mroginski, 1993). Para esta etapa se introdujeron yemas de *V. scandens* de un tamaño promedio de uno a dos centímetros, previamente sometidas al que resultó ser el mejor tratamiento de desinfección.

2.4.1 Medios de cultivo para la inducción de brotes

El medio de cultivo que se utilizó para esta etapa fue el de Murashige y Skoog (M&S) enriquecido con 30 gL^{-1} de sacarosa y 6.2 gL^{-1} de agar, se trabajará a pH 5,7 - 5,8; suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de (1, 2, 3 mgL^{-1}) en combinación con ácido α -naftalenacético

(ANA) en una concentración de (0.1, 0.5, 1 mgL⁻¹) y brasinolida (1 mgL⁻¹). Los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave durante 30 minutos a 121°C de temperatura y 15 psi de presión y posterior a la siembra se incubaron a 25 ± 2 °C de temperatura, 50 – 60% de humedad relativa 2000 – 2500 luxes y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Para esta etapa se planteó un diseño completamente al azar (DCA) en el que se probaron 12 tratamientos más un control (Tabla 2.2) con 10 repeticiones cada uno, teniendo como unidad experimental a una yema inoculada en un frasco con medio de cultivo.

Tabla 2.2 Tratamientos para inducción de brotes

Tratamiento	BAP (mg L⁻¹)	ANA (mg L⁻¹)
Control	0	0
I1	1	0
I2	1	0.1
I3	1	0.5
I4	1	1
I5	2	0
I6	2	0.1
I7	2	0.5
I8	2	1
I9	3	0
I10	3	0.1
I11	3	0.5
I12	3	1

En esta etapa se evaluaron como variables:

Presencia / Ausencia de brotes.- Se observó el aparecimiento de brote generado por el explante introducido, dando valores de “0” a explantes con presencia de brote y “1” a los que no presentaron brote (Figura 2.4).

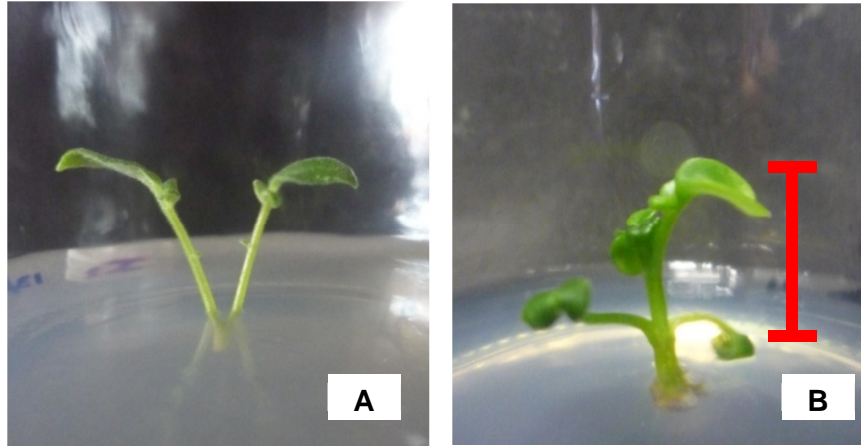


Figura 2.4 (A) Explante sin brote (B) Explante con presencia de brote

Formación de callo.- Se estableció niveles del 1 a 4 para la formación de callo, representando “1” la ausencia de callo y “4” la formación abundante de callo, (Figura 2.5). En la tabla 2.3 se resumen los niveles de formación de callo.

Tabla 2.3. Niveles que determina la formación de callo

Niveles	Formación de callo
1	Ausencia de callo
2	Poca formación de callo
3	Mediana formación de callo
4	Abundante formación de callo

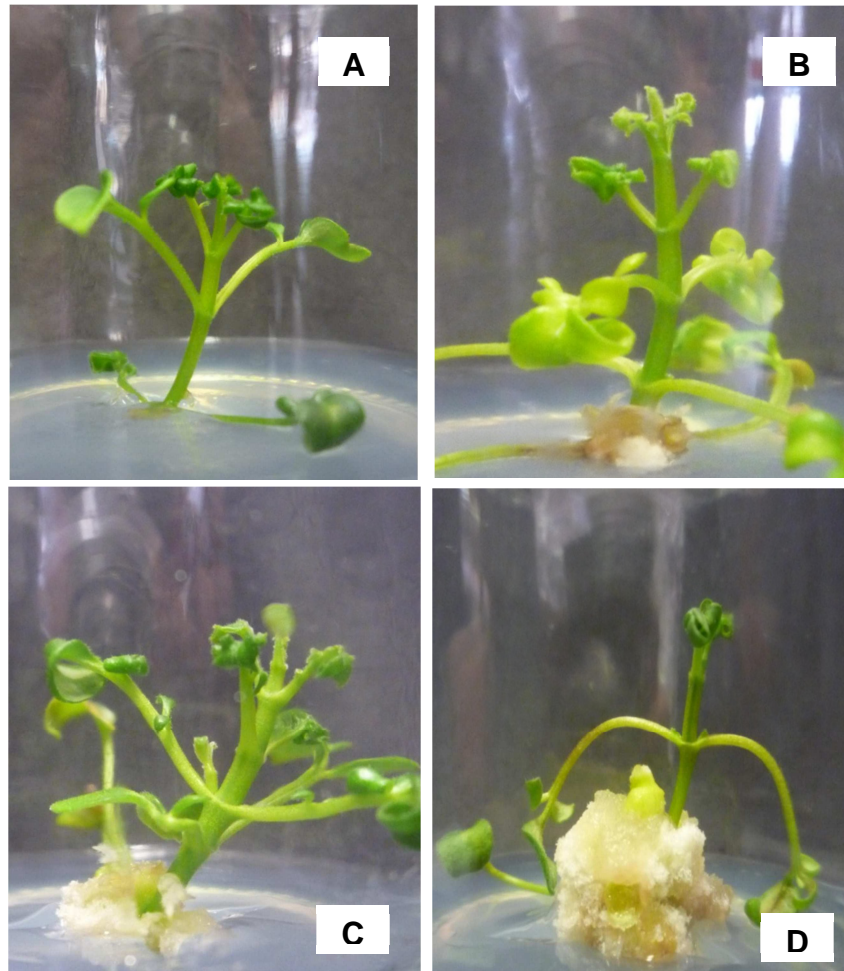


Figura 2.5 (A) Ausencia de callo (B) Poca formación de callo (C) Mediana formación de callo (D) Abundante formación de callo.

Longitud de los brotes.- Se midió la longitud en centímetros que alcanzaron los nuevos brotes.

Número de entrenudos.- Se contabilizó el número de entrenudos que desarrolló cada explante

La evaluación se realizó al cabo de un mes, para el análisis estadístico se empleó un análisis exploratorio mediante tablas de contingencia y gráficas y un análisis inferencial utilizando análisis de varianza (ADEVA) con los datos del

diseño experimental (DCA) y comparando los tratamientos e identificando subgrupos mediante el método LSD Fisher.

2.5 Fase de multiplicación

Para dar inicio a esta etapa los explantes en los que se observó una mejor respuesta vegetativa y que alcanzaron un tamaño adecuado para ser dividido en secciones (entrenudos), fueron multiplicados. La etapa de multiplicación, consta de 3 subcultivos, ya que esto permite analizar la capacidad de la planta para regenerar nuevos brotes, de esta manera se puede conocer cuál es el límite de subcultivos que la planta puede soportar antes de que pierda esta tan importante capacidad, además constituye una forma de asegurar un cultivo aséptico.

2.5.1 Medios de cultivo para la multiplicación

El medio utilizado en esta etapa fue el M&S, con diferentes concentraciones de BAP y ANA basado en el mejor tratamiento resultante de la etapa de inducción más un control, el cual no posee ningún suplemento en su fórmula.

Dado que los explantes usados en esta etapa provienen de la anterior no se tiene un número homogéneo de repeticiones por cada tratamiento, la unidad experimental es un frasco con yemas que han desarrollado brotes. Las variables que se evaluaron fueron:

Número de entrenudos.- Se contabilizó el número de entrenudos que desarrolló cada explante (Figura 2.6).

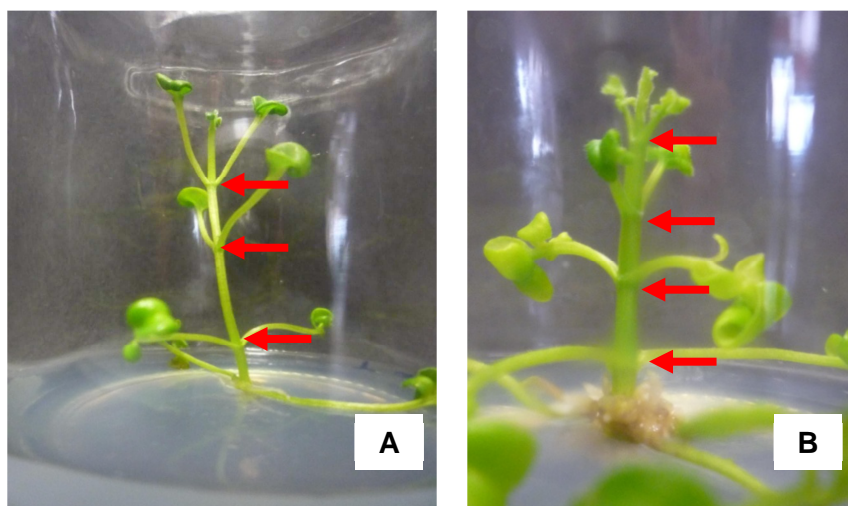


Figura 2.6 Numero de entrenudos (A) Brote con 3 entrenudos (B) Brote con 4 entrenudos

Vigrosidad de los nuevos brotes.- Se estableció niveles del 1 al 4 para medir la vigrosidad de los brotes, siendo “1” un brote débil y “4” un brote vigoroso (Figura 2.7), la escala se encuentra resumida en la tabla 2.4.

Tabla 2.4 Niveles que determina la vigrosidad de los nuevos brotes

Niveles	Vigrosidad
1	Brote débil
2	Brote resistente
3	Brote firme
4	Brote vigoroso

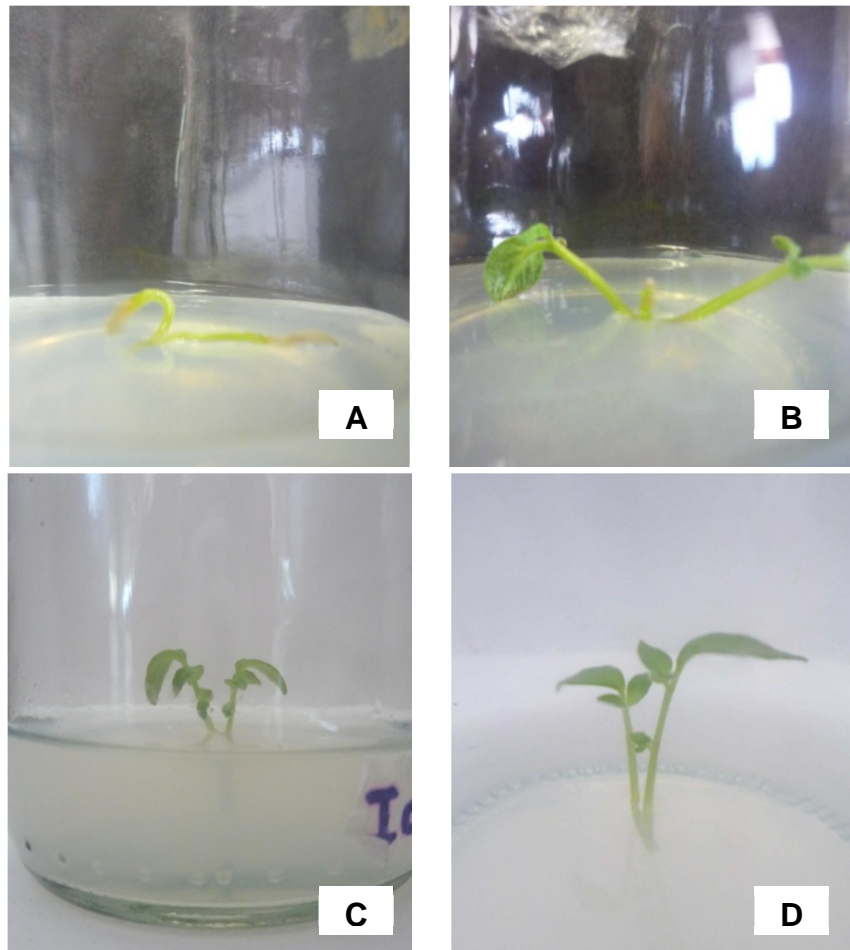


Figura 2.7 Niveles de vigorosidad (A) Brote débil (B) Brote resistente (C) Brote firme (D) Brote vigoroso.

Longitud de los brotes.- Se midió la longitud en centímetros que alcanzaron los nuevos brotes (Figura 2.8).

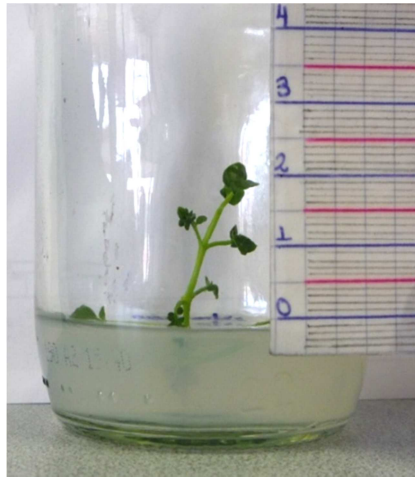


Figura 2. 8 Longitud de la planta tomada en centímetros

Cuando los nuevos brotes cumplieron el periodo de un mes, fueron seccionados en los entrenudos, de esta manera se obtuvo nuevos brotes que sirven como explante madre para el siguiente como lo indica la Figura 2.9

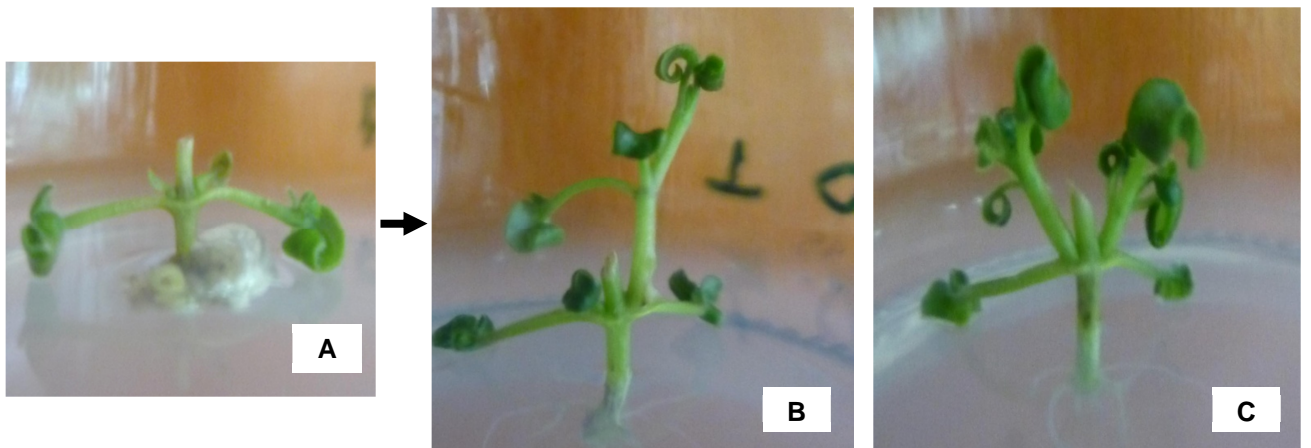


Figura 2. 9 (A) Entrenudos obtenido después del primer subcultivo (B) y (C)
Nuevos brotes generados en los subcultivos subsiguientes

La evaluación de las variables se realizó al cabo de un mes de iniciada la fase de multiplicación y así sucesivamente para cada subcultivo, para el análisis estadístico se realizó un análisis exploratorio mediante tablas de

contingencia y gráficas y un análisis inferencial utilizando análisis de varianza (ADEVA) con los datos del diseño experimental (DCA) y comparando los tratamientos e identificando subgrupos mediante el método LSD Fisher.

2.6 Fase de Enraizamiento

Esta etapa se divide en dos subprocesos:

2.6.1 Primer subproceso

Se determinó el efecto de ácido giberélico (GA_3) para el alargamiento de brotes aplicando como factor la concentración 1, 2 y 3 mgL^{-1} de GA_3 (Figura 2.10) arreglados en un DCA simple cuyos 3 tratamientos se encuentran resumidos en la tabla 2.5

Tabla 2.5 Tratamientos para alargamiento de brotes

Tratamiento	GA_3 ($mg L^{-1}$)
A1	1
A2	2
A3	3



Figura 2.10 Elaboración de medios de cultivo con GA_3 .

Se realizó 5 repeticiones por cada tratamiento, siendo la unidad experimental un frasco con brotes inducidos en yema apical.

La variable de respuesta que se evaluó fueron:

Respuesta de crecimiento.-Se midió la longitud alcanzada por los brotes al cabo de dos semanas

2.6.2 Segundo subproceso

Esta etapa comprendió el enraizamiento propiamente dicho en la cual se determinó el nivel de enraizamiento, el tiempo del enraizamiento y la variación de longitud de los brotes entre la etapa de multiplicación y esta nueva etapa de enraizamiento, sobre la base de 3 factores, la concentración 0.1, 0.5, 1 y 1.5 de ANA como hormona de enraizamiento en el medio de cultivo (MS y B5), estableciendo un factorial de 2×4 en un DCA, resultando en 8 tratamientos más un testigo, el cual no tendrá ningún suplemento en su fórmula. Los tratamientos aplicados se resumen en la tabla 2.6

Tabla 2.6 Tratamientos para el establecimiento de la etapa de enraizamiento.

Tratamiento	Medio de cultivo	ANA (mg L⁻¹)	Estado
R1	MS	0.1	Sólido
R2	MS	0.5	Sólido
R3	MS	1	Sólido
R4	MS	1.5	Sólido
R5	B5	0.1	Sólido
R6	B5	0.5	Sólido
R7	B5	1	Sólido
R8	B5	1.5	Sólido

El mejor tratamiento en medio sólido se evaluó también en medio líquido para ver el desarrollo del enraizamiento en este tipo de medio y la consistencia del medio, para este se utilizó una membrana que permitió separar el explante del medio de cultivo de manera que solo la parte inferior del explante, el sitio donde han de desarrollarse las raíces permaneció en contacto con el medio (Figura 2.11).

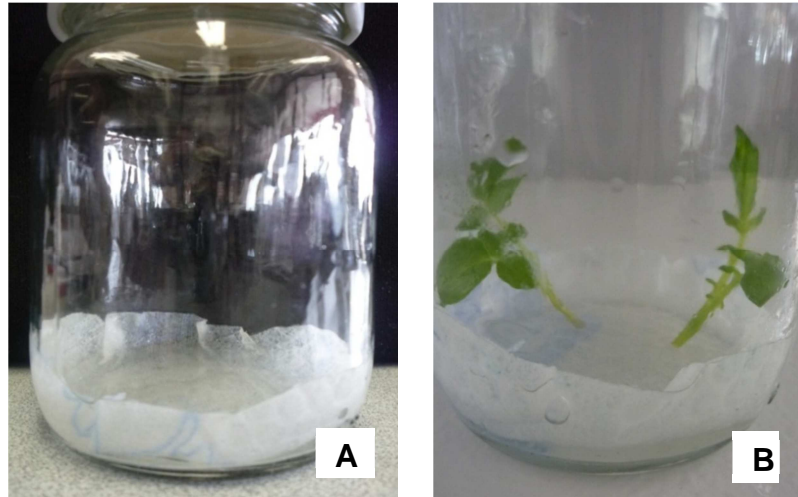


Figura 2.11 (A) Medio líquido con membrana para soportar el explante (B) Explantes dispuestos en la membrana *in vitro*.

Se realizó 5 repeticiones por cada tratamiento siendo la unidad experimental un frasco con un brote inducido de yema apical. Las variables de respuesta que se evaluaron en esta etapa fueron:

Nivel de enraizamiento.- Se observó la longitud de raíz desarrollada (Figura 2.11), mediante niveles del 0 al 4 resumida en la tabla 2.7.

Tabla 2.7 Niveles de enraizamiento

Niveles	Longitud de raíces
0	0%
1	25%
2	50%
3	75%
4	100%

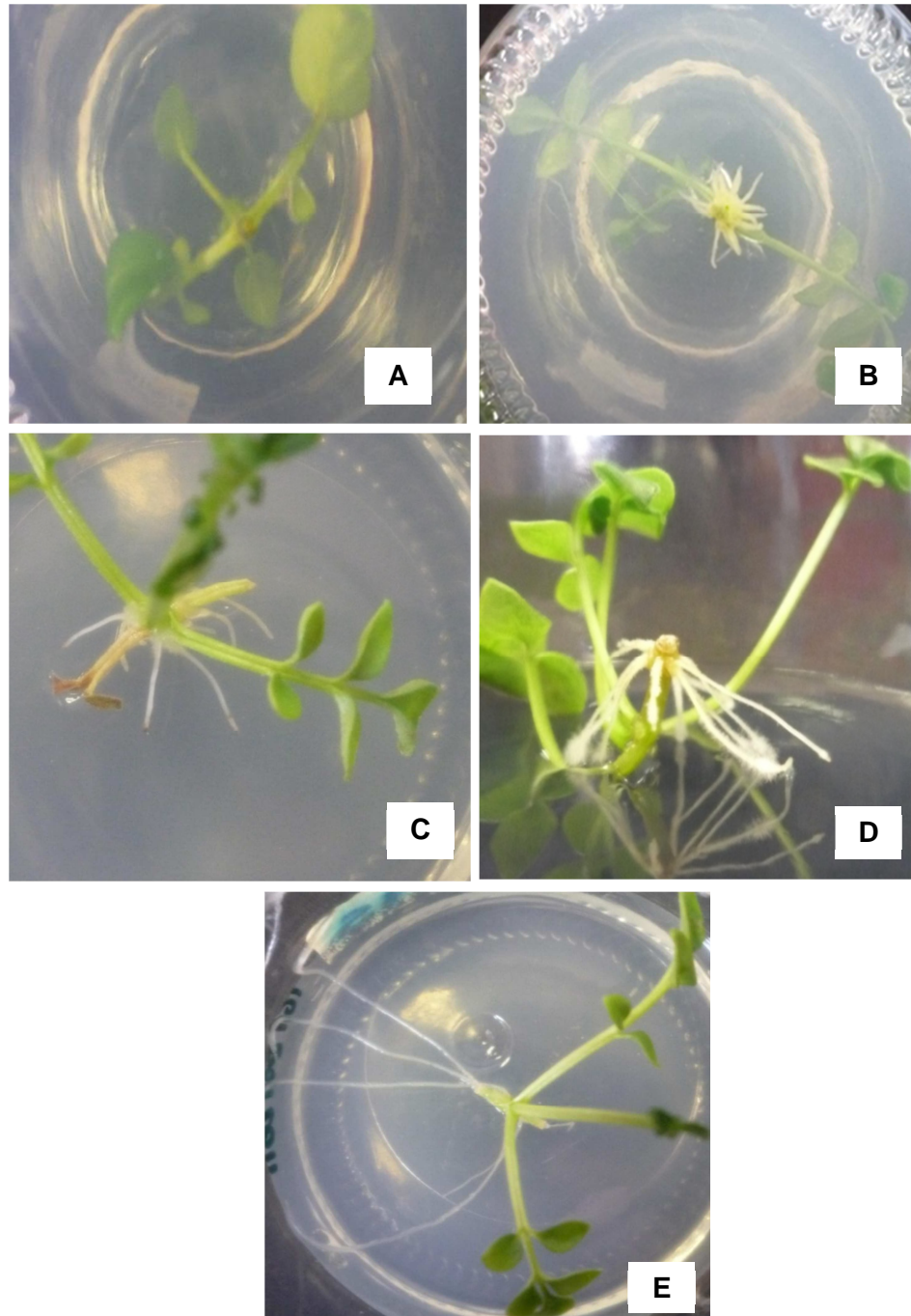


Figura 2.11 Niveles de enraizamiento (A) Sin raíz (B) Raíz desarrollada al 25% (C) Raíz desarrollada al 50% (D) Raíz desarrollada al 75% (D) Raíz desarrollada al 100%.

Tiempo de enraizamiento.-Se observó el tiempo que tarda en aparecer la primera raicilla en el explante.

Variación de longitud de los brotes.- Se midió la longitud alcanzada por la plántula (Figura 2.12).



Figura 2. 12 Longitud de la planta tomada en centímetros.

Adicionalmente se realizó un ensayo adicionando carbón activado al medio de cultivo para observar el efecto que tiene sobre el enraizamiento de las plántulas, las variables a evaluarse en este ensayo fueron tiempo y nivel de enraizamiento

La evaluación se realizó mediante observación al cabo de un mes, para el análisis estadístico se realizó un análisis exploratorio mediante tablas de contingencia y gráficas y un análisis inferencial utilizando análisis de varianza (ADEVA) con los datos del diseño experimental (DCA) y comparando los tratamientos e identificando subgrupos mediante el método LSD Fisher.

Programa estadístico

Se empleó el programa estadístico InfoStat para el análisis de todos los datos obtenidos en cada una de las fases del ensayo y Microsoft Excel, como herramienta adicional.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

El cultivo *in vitro* para la especie estudiada, *Valeriana scandens*, se llevó a cabo en diferentes fases, en las cuales se estableció el protocolo de desinfección de los explantes, los medios de cultivo más apropiados para la inducción, multiplicación de brotes y el enraizamiento de la plántula.

La fundamentación teórica de las pruebas estadísticas aplicadas se encuentra detallada en la sección de anexos (anexo estadístico).

3.1 Etapa de desinfección

Durante la etapa de desinfección se evaluó la *contaminación*, la *necrosis* y *muerte* de los explantes, a partir de tratamientos con hipoclorito de sodio (NaClO) (0.5, 1 y 1.5%) y tiempos de inmersión (3 y 5 minutos). Debido a que las variables de respuesta son dicotómicas, la evaluación del efecto de los factores, se analizó por separado para cada una de las variables.

3.1.1 Contaminación

a) Análisis exploratorio de datos

Para organizar los datos obtenidos de la evaluación de la variable contaminación, se realizó una tabla de contingencia (Tabla A.1.1), de los 23 explantes contaminados, 11 se encontraron cuando se aplicó una concentración 0.5% NaClO, 9 explantes a una concentración de 1% y 3 explantes cuando se aplicó una concentración de 1.5%; la concentración 1.5 % NaClO, permite una buena descontaminación de los explantes, evidenciando que a medida que aumentan la concentración, disminuye la contaminación, además se observa

que a bajas concentraciones (0.5 y 1 %) no existe una diferencia significativa entre los grupos contaminado y no contaminado ya que muestran relativamente la misma cantidad de explantes en ambos grupos (Figura 3.1).

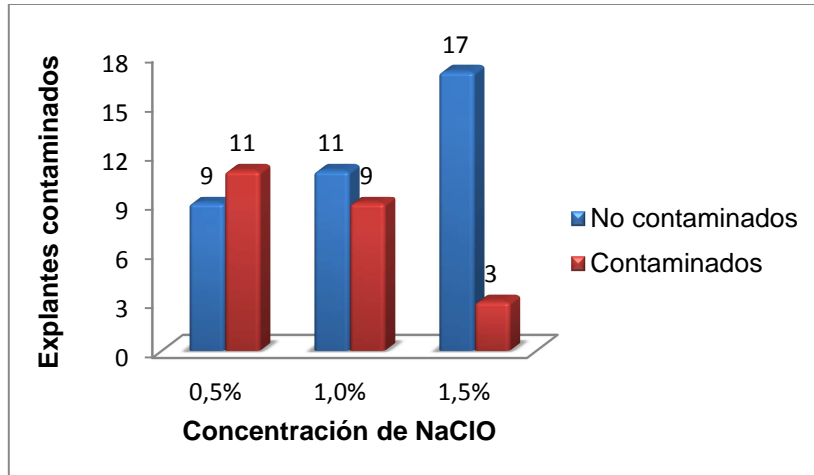


Figura 3.1 Gráfico de explantes contaminados y no contaminados encontrados después de la aplicación de diferentes concentraciones NaClO.

Adicionalmente, con respecto a la concentración de NaClO se realizó una distribución de frecuencias del grupo no contaminado que permite observar la proporción en porcentaje en la muestra (Tabla A.1.2), se evidencia que a una concentración de 1.5% el porcentaje de descontaminación alcanza un 85% mientras que a 0.5 y 1% de concentración los explantes no contaminados alcanzan un porcentaje de 45 y 55% respectivamente, haciendo de la concentración 0.5% no eficiente para el proceso de desinfección (Figura 3.2).

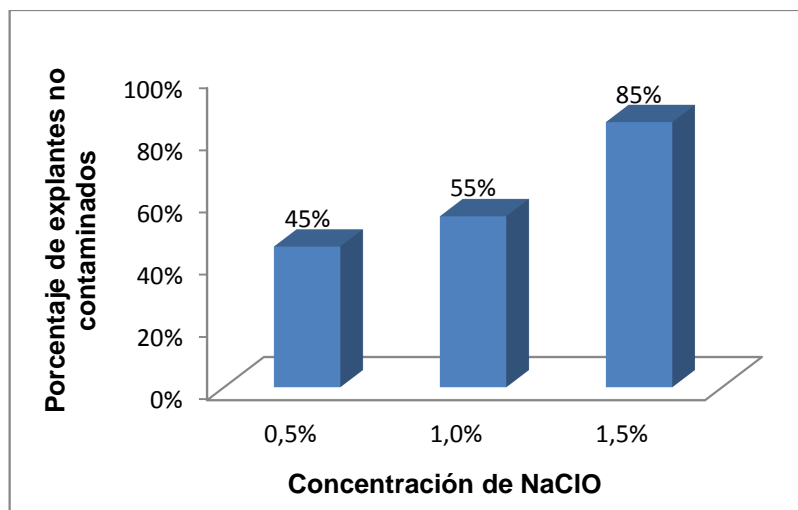


Figura 3.2 Gráfica de frecuencias de explantes no contaminados con respecto a la concentración de NaClO.

Con relación al tiempo de inmersión en NaClO y su relación con la contaminación, se realizó una tabla de contingencia (Tabla A.1.3), en la que se observa que de los 23 explantes contaminados, 11 se encontraron cuando se aplicó un tiempo de inmersión de tres minutos, mientras que 12 explantes cuando se aplicó un tiempo de cinco minutos a nivel muestral existe una ligera diferencia entre los grupos de explantes contaminados y no contaminados cuando estos son sometidos a los diferentes tiempos de inmersión (Figura 3.3).

Adicionalmente, con respecto al tiempo de inmersión se realizó una distribución de frecuencias del grupo no contaminado (Tabla A.1.4) que nos indica la proporción en porcentaje en la muestra, evidenciando que para un tiempo de inmersión de 3 minutos el porcentaje de explantes no contaminados es de 63%, mientras que la inmersión en NaClO durante 5 minutos alcanza el 60% de explantes no contaminados, al ser mínima la diferencia entre ambos tiempos se puede determinar que ambos alcanzan un nivel similar de descontaminación de los explantes (Figura 3.4).

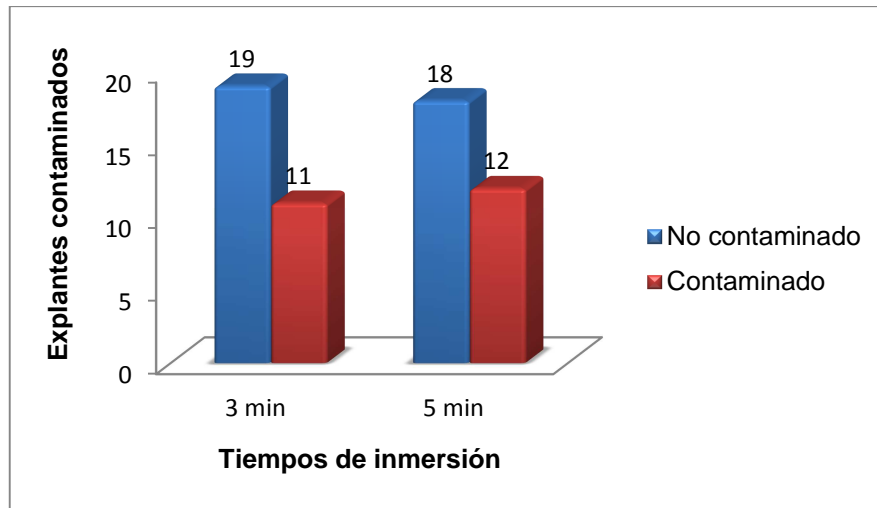


Figura 3.3 Gráfico de explantes contaminados y no contaminados encontrados después de diferentes tiempos de inmersión en NaClO.

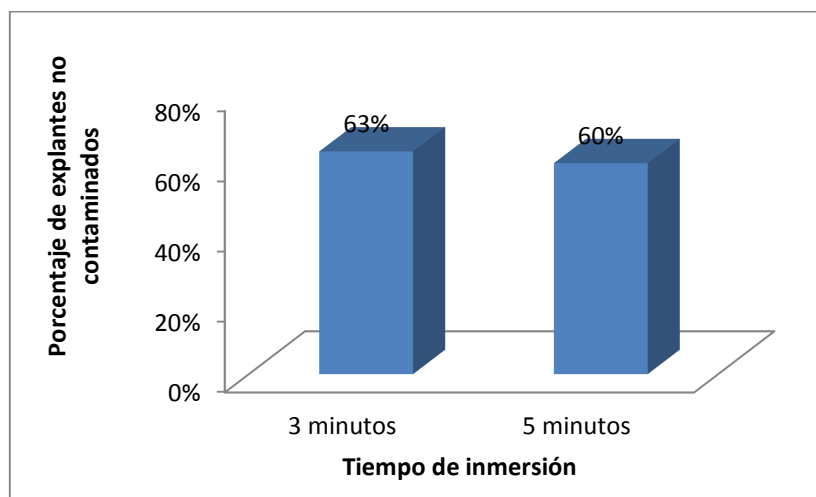


Figura 3.4 Gráfica de frecuencia de explantes no contaminados con respecto al tiempo de inmersión en NaClO

Para analizar la relación de los factores aplicados (concentración y tiempo) y la variable contaminación se realizó una distribución de frecuencias de la interacción (Tabla A.1.5), se evidencia que la concentración 1.5% de NaClO es eficiente para el proceso de desinfección, y que al aplicarla por un tiempo de inmersión de 5 minutos, resulta en un porcentaje de

descontaminación alto (90%), por otro lado la combinación 0.5%-5min es la menos eficiente para el proceso de desinfección ya que solamente alcanza un porcentaje de no contaminados del 40% (Figura 3.5).

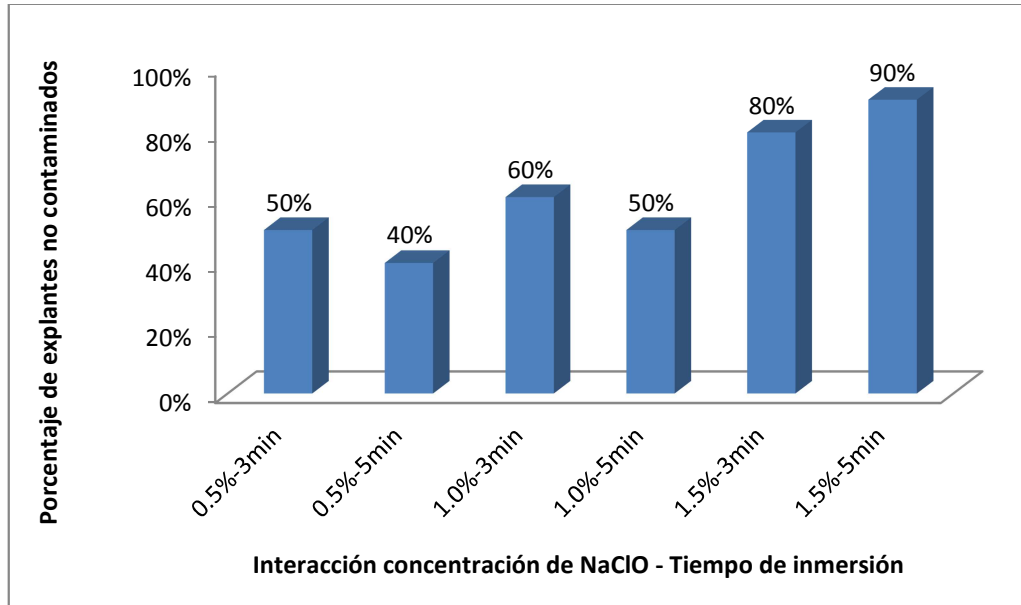


Figura 3.5 Gráfica de porcentaje de explantes no contaminados con respecto a la interacción concentración de NaClO - tiempo de inmersión

b) Análisis inferencial

Para analizar la relación entre la contaminación y la concentración de NaClO aplicada a los explantes, se efectuó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia empleando un nivel de significación $\alpha = 5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia A.1.1. En este caso se rechaza la hipótesis nula ($p = 2.56\%$) (Tabla 3.1); por lo tanto, existe la suficiente evidencia para afirmar que el porcentaje de contaminación, depende de la concentración de NaClO empleada; adicionalmente, de la prueba de hipótesis de comparación de proporciones poblacionales, se infiere que la proporción de explantes no contaminados es significativamente mayor utilizando una concentración de 1.5% ($p = 0.17\%$).

Tabla 3.1 Prueba chi cuadrado para la contaminación con respecto a la concentración de NaClO

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	7,33	2	0,0256

A fin de poner de manifiesto gráficamente las relaciones de dependencia existentes entre la variable analizadas y la variable contaminación a partir de la información proporcionada por sus tablas de contingencia, se realizó un análisis de correspondencias, la figura 3.6, muestra el diagrama cartesiano basado en la asociación entre las variables analizadas evidenciando la relación entre la concentración 0.5 y 1 % de NaClO y la respuesta 0 que indica la presencia de contaminación es decir que al utilizar estas concentraciones se evidencia una mayor proporción de explantes contaminados, mientras que una concentración de 1.5% está asociado a la respuesta 1 que indica los explantes no contaminados, es decir que esta concentración ofrece un mayor nivel de explantes viables.

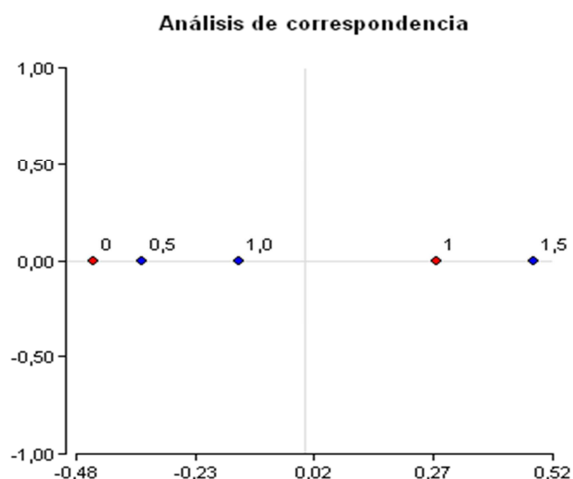


Figura 3.6 Gráfica del análisis de correspondencia entre la concentración de NaClO y la contaminación.

En cuanto al tiempo de inmersión, se efectuó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia, empleando un nivel de significación $\alpha = 5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia A.1.3, en este caso no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia ($p = 79.06\%$) (Tabla 3.2); por lo tanto, se sugiere que el porcentaje de contaminación de los explantes, no depende del tiempo de inmersión, además, de la prueba de hipótesis de comparación de proporciones poblacionales se infiere que la proporción de explantes no contaminados para los tiempos de inmersión 3 y 5 minutos no hay diferencia estadísticamente significativa ($p = 39.52\%$).

Tabla 3.2 Prueba chi cuadrado para la contaminación con respecto al tiempo de inmersión

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0,07	1	0,7906

Para la interacción de los factores concentración de NaClO y tiempo de inmersión, la prueba de hipótesis de comparación de proporciones poblacionales infiere que la proporción de explantes no contaminados entre los tratamientos 0.5% - 5 minutos y 1.5%-5 minutos son diferentes, es decir que se dividen en dos grupos entre los cuales existe diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.30\%$)

En base a la figura 3.1 se realizó intervalos de confianza para inferir a nivel poblacional la diferencia o semejanza entre los grupos contaminados y no contaminados, la tabla 3.3 muestra que existe un ligero traslape entre los límites superior e inferior del intervalo, lo que sugiere con un 95% de confianza que las medias poblacionales de ambos grupos son significativamente diferentes, sin embargo dado que el traslape es mínimo, tomando en cuenta

que los ensayos se realizaron en laboratorio bajo condiciones controladas, al realizar el análisis al 90% de confianza (Tabla 3.4), no se aprecia el traslape, lo que se sugiere que para esta variable las poblaciones contaminados y no contaminados a concentraciones de 0.5 y 1% NaClO son iguales.

Tabla 3.3 Intervalos de confianza para la variable contaminación con el 95% de confianza

Variable	Parámetro	Estimación	E.E.	n	LI(95%)	LS(95%)
Contaminación Media		0,62	0,06	60	0,49	0,74
Contaminación Proporción(=0)		0,38	0,06	60	0,26	0,52

Tabla 3.4 Intervalos de confianza para la variable contaminación con el 90% de confianza

Variable	Parámetro	Estimación	E.E.	n	LI(90%)	LS(90%)
Contaminación Media		0,62	0,06	60	0,51	0,72
Contaminación Proporción(=0)		0,38	0,06	60	0,28	0,50

Dado que, para los distintos tratamientos, los valores obtenidos de la variable contaminación son dicotómicos, no cumplen con los supuestos de normalidad, se hace necesario un análisis no paramétrico para comparar el comportamiento de esta variable según el tratamiento aplicado. Así mediante la prueba de Kruskal-Wallis, se determinó que no existe diferencia significativa entre las distribuciones de la contaminación en los tratamientos estudiados ($p = 16.56\%$) (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Prueba de Kruskal Wallis para la variable contaminación

Variable	Tratamiento	N trat	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
Contaminación 1	1	10	10	0,50	0,53	0,50	27,00	5,56	0,1656
Contaminación 2	2	10	10	0,60	0,52	1,00	30,00		
Contaminación 3	3	10	10	0,80	0,42	1,00	36,00		
Contaminación 4	4	10	10	0,40	0,52	0,00	24,00		
Contaminación 5	5	10	10	0,50	0,53	0,50	27,00		
Contaminación 6	6	10	10	0,90	0,32	1,00	39,00		

3.1.2 Necrosis

a) Análisis exploratorio de datos

Para los datos obtenidos en la variable necrosis, se realizó una tabla de contingencia (Tabla A.1.6), de los 9 explantes necrosados, 3 se encontraron cuando se aplicó una concentración 0.5 %, 4 explantes con una concentración de 1% y 2 explantes cuando se aplicó una concentración de 1.5% NaClO, existe diferencia significativa entre los grupos necrosados y no necrosados, al existir relativamente el mismo número de explantes no necrosados para las tres concentraciones, se puede determinar que esta variable, no está influenciada por la concentración de NaClO utilizada en la desinfección. (Figura 3.7).

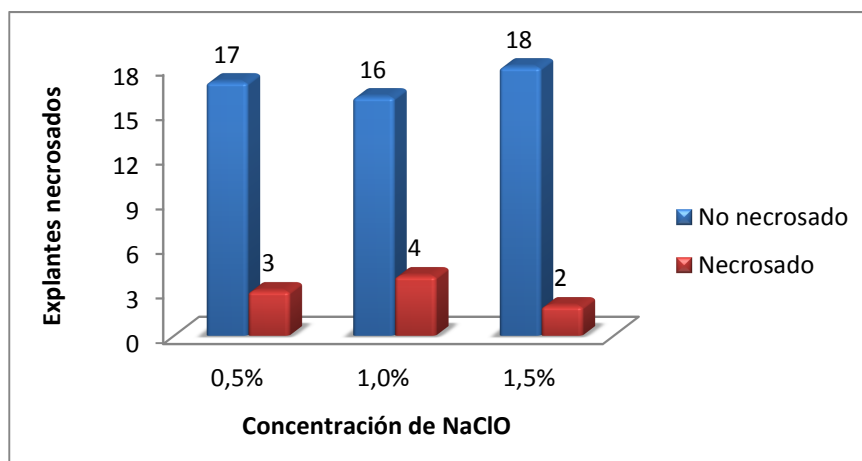


Figura 3.7 Gráfico de explantes necrosados y no necrosados encontrados después de la aplicación de diferentes concentraciones de NaClO.

Adicionalmente, con respecto a la concentración de NaClO se realizó una distribución de frecuencias del grupo no necrosado (Tabla A.1.7) se evidencia que la concentración de 1.5% de NaClO es el que menor daño causa a los explantes con un 90% de no necrosamiento, sin embargo a concentraciones bajas (0.5 y 1%) el porcentaje de explantes no necrosados, no difiere en gran manera del mejor tratamiento, por lo que se puede determinar que la necrosis es independiente de la concentración de NaClO (Figura 3.8).

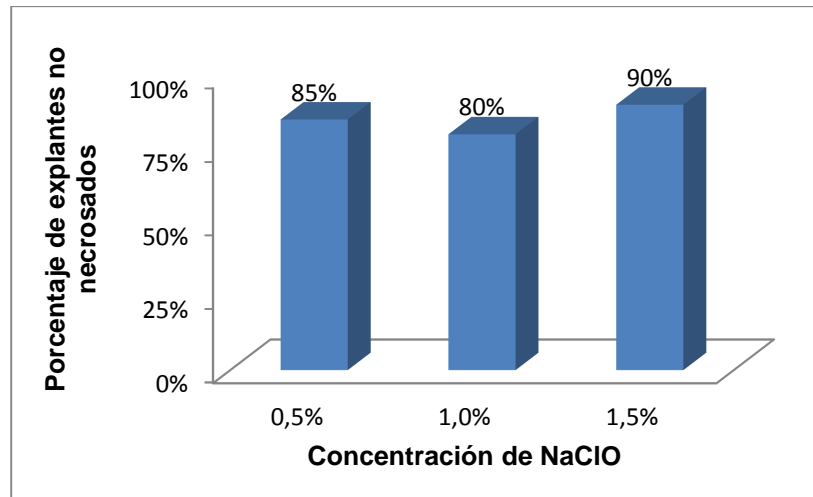


Figura 3.8 Gráfica de frecuencias de explantes no necrosados con respecto a la concentración de NaClO aplicada

Con relación al tiempo de inmersión y su relación con la necrosis, se realizó una tabla de contingencia (Tabla A.1.8) que nos muestra que de los 9 explantes necrosados, 6 se encontraron cuando se aplicó un tiempo de 3 minutos y 3 explantes cuando se aplicó un tiempo de 5 minutos, para ambos tiempos de inmersión existen diferencias significativas entre los grupos necrosados y no necrosados, por lo que se puede determinar que ambas poblaciones son estadísticamente diferentes (Figura 3.9).

Además, con respecto al tiempo de inmersión en NaClO se realizó una distribución de frecuencias del grupo no necrosado que nos indica la proporción en porcentaje del grupo en la muestra (Tabla A.1.9), no existe una relación de dependencia entre la necrosis y el tiempo de inmersión en NaClO, es decir que este factor no tiene un efecto significativo sobre el fenómeno de necrosamiento en las plantas *in vitro* (Figura 3.10).

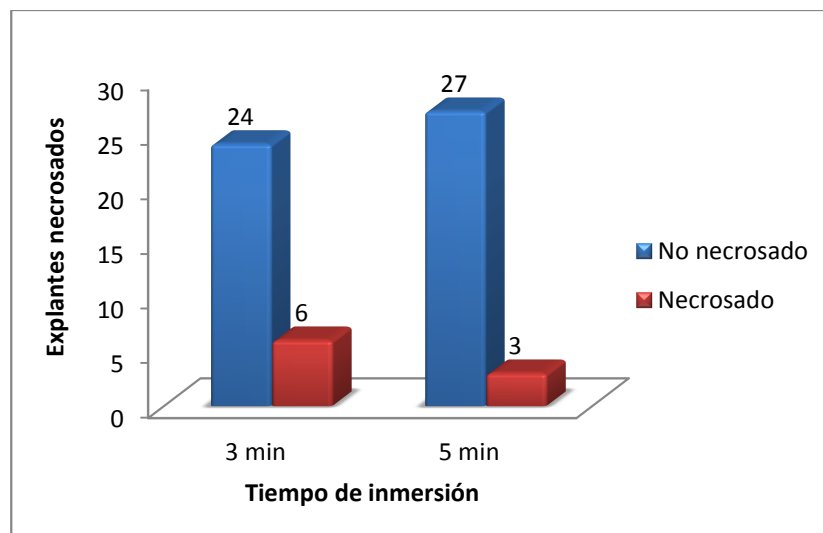


Figura 3.9 Gráfico de explantes necrosados y no necrosados encontrados después de la inmersión en NaClO en dos diferentes tiempos

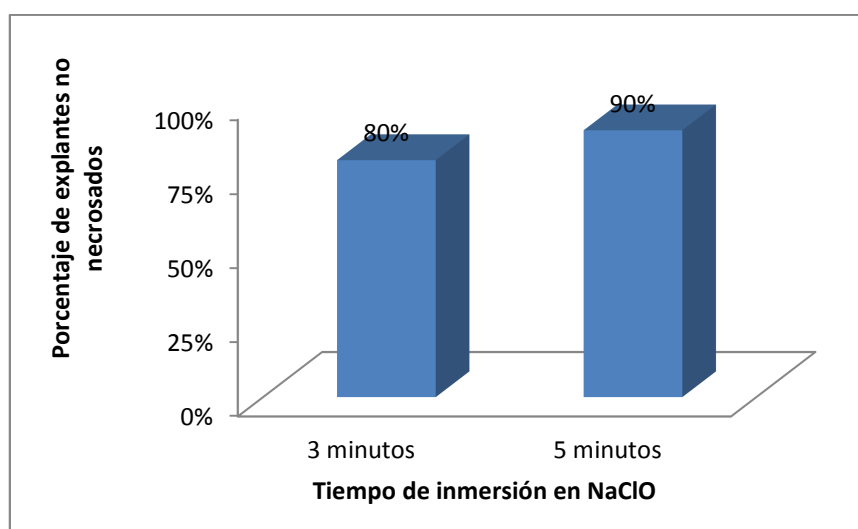


Figura 3.10 Gráfica de frecuencias de explantes no necrosados con respecto al tiempo de inmersión en NaClO.

Con respecto a la interacción (concentración y tiempo), se realizó una distribución de frecuencias (Tabla A.1.10) donde se evidencia que la concentración 1.5% es eficiente para el proceso de desinfección, y al aplicarla por un tiempo de 5 minutos resulta en un porcentaje de no necrosamiento alto

(100%), las combinaciones 0.5%-3min y 1.0%-5min también representan valores altos de no necrosados (90%), por otro lado el tratamiento 1.0%-3min no es eficiente para el proceso de desinfección, ya que alcanza un 70% de no necrosados. Al existir relativamente el mismo porcentaje de no necrosados para los seis tratamientos, evidencia que la interacción de los factores evaluados no afecta en el fenómeno de necrosamiento (Figura 3.11).

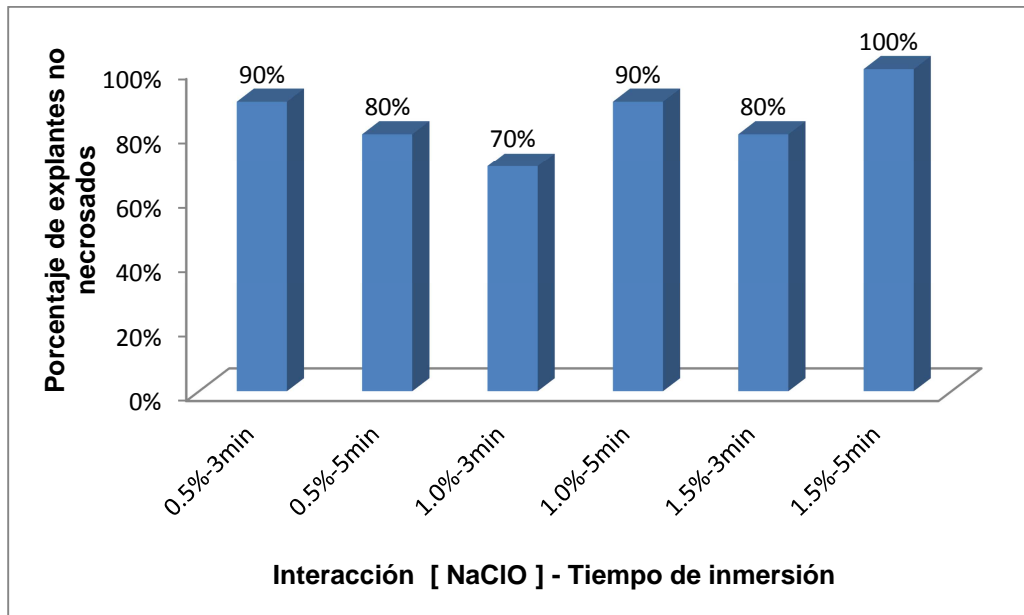


Figura 3.11 Gráfica de porcentajes de explantes no necrosados con respecto a la interacción concentración de NaClO - Tiempo de inmersión.

b) Análisis inferencial

Con respecto a la relación entre la necrosis y la concentración de NaClO aplicada sobre los explantes, se efectuó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia empleando un nivel de significación $\alpha = 5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia A.1.6. En este caso no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia ($p = 67.56\%$) (Tabla 3.6); por lo tanto se sugiere que la necrosis de los explantes no depende del tiempo de la concentración de NaClO en el proceso de desinfección, además de la prueba de hipótesis de comparación de

proporciones poblacionales, se infiere que la proporción de explantes no necrosados para las concentraciones 1% y 1.5% de NaClO son similares, es decir que entre ambos no hay diferencia estadísticamente significativa ($p=18.55\%$).

Tabla 3.6 Prueba chi cuadrado para la necrosis con respecto a la concentración de NaClO.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0,78	2	0,6756

Con respecto a la relación entre la necrosis y el tiempo de inmersión, se efectuó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia, empleando un nivel de significación $\alpha=5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia A.1.8, en este caso no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia ($p=79.06\%$) (Tabla 3.7); el valor p es superior al 5% lo que indica que no existe una relación de dependencia entre la necrosis y el tiempo de inmersión, además de la prueba de hipótesis de comparación de proporciones poblacionales, se infiere que la proporción de explantes no necrosados para los tiempos de inmersión 3 y 5 minutos en NaClO son similares, es decir que entre ambos no hay diferencia estadísticamente significativa ($p=13.67\%$).

Tabla 3.7 Prueba chi cuadrado para la necrosis con respecto al tiempo de inmersión

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1,18	1	0,2781

Para la interacción de los factores concentración de NaClO y tiempo de inmersión, la prueba de hipótesis de comparación de proporciones poblacionales, infiere que la proporción de explantes no necrosados entre los tratamientos 1%-3min y 1.5%-5 min son estadísticamente diferentes ($p=1.92\%$).

Los valores analizados para la variable necrosis son dicotómicos, por lo tanto, no cumplen con los supuestos de normalidad es por esta razón que se hace necesario un análisis no paramétrico para comparar el comportamiento de esta variable según el tratamiento aplicado, mediante la prueba de Kruskal-Wallis, se determinó que no existe diferencia significativa entre las distribuciones de la necrosis en los tratamientos estudiados ($p=51.51\%$) (Tabla 3.8).

Tabla 3.8 Prueba de Kruskal Wallis para la variable necrosis

Variable	Tratamiento	N	trat	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio	rangos	H	p
Necrosis 1	1	10		10	0,90	0,32	1,00	32,00	1,62	0,5151	
Necrosis 2	2	10		10	0,70	0,48	1,00	26,00			
Necrosis 3	3	10		10	0,80	0,42	1,00	29,00			
Necrosis 4	4	10		10	0,80	0,42	1,00	29,00			
Necrosis 5	5	10		10	0,90	0,32	1,00	32,00			
Necrosis 6	6	10		10	1,00	0,00	1,00	35,00			

3.1.3 Muerte

a) Análisis exploratorio de datos

Para organizar los datos obtenidos, se realizó una tabla de contingencia (Tabla A.1.11), de los 3 explantes muertos, 1 se encontró cuando se aplicó una concentración 0.5%, 2 explantes a una concentración de 1% y ningún explante cuando se aplicó una concentración de 1.5%, las tres

concentraciones de NaClO producen relativamente la misma cantidad de explantes vivos, lo que sugiere que este factor no influye sobre la variable muerte (Figura 3.12).

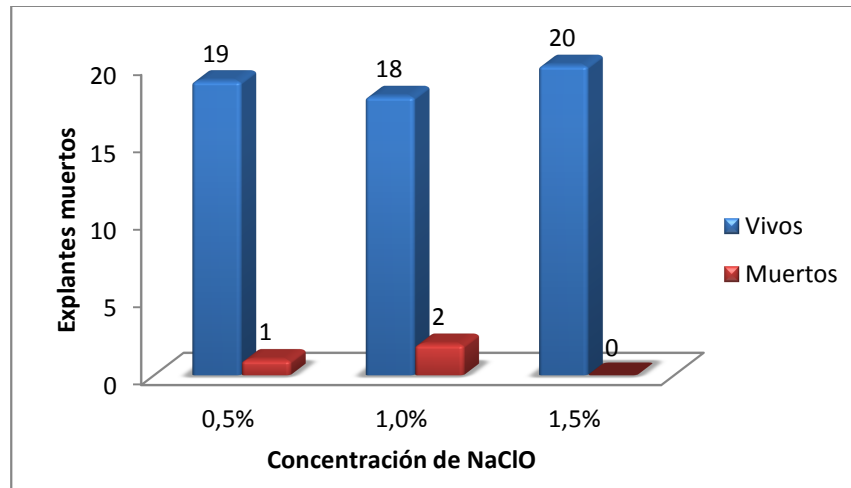


Figura 3.12 Gráfico de explantes vivos y muertos encontrados después de la aplicación de diferentes concentraciones de NaClO.

Adicionalmente, con respecto a la concentración de NaClO se realizó una distribución de frecuencias del grupo vivo, que indica la proporción en porcentaje en la muestra (Tabla A.1.12), la concentración 1.5% de NaClO es la más eficiente con un 100% de explantes vivos, sin embargo las concentraciones bajas como 0.5 y 1% muestran también porcentajes altos de viabilidad 95 y 90% respectivamente, por lo que se puede determinar que existe diferencias significativa entre vivos y muertos y al existir relativamente el mismo número de explantes vivos para las tres concentraciones, se evidencia que la variable muerte no está determinada por la concentración de NaClO utilizada (Figura 3.13).

Con relación al tiempo de inmersión en NaClO y su relación con la variable muerte, se realizó una tabla de contingencia (Tabla A.1.13) que nos indica que de los 57 explantes vivos, 30 se encontraron cuando se aplicó un

tiempo de inmersión de 3 minutos, mientras que 27 explantes cuando se aplicó un tiempo de 5 minutos, a nivel muestral existen diferencias significativas entre los grupos vivos y muertos, cuando estos son sometidos a los diferentes tiempos de inmersión, lo que nos indica que ambas poblaciones son estadísticamente diferentes y que el efecto de tiempo de inmersión en NaClO no está relacionado con la variable muerte (Figura 3.14).

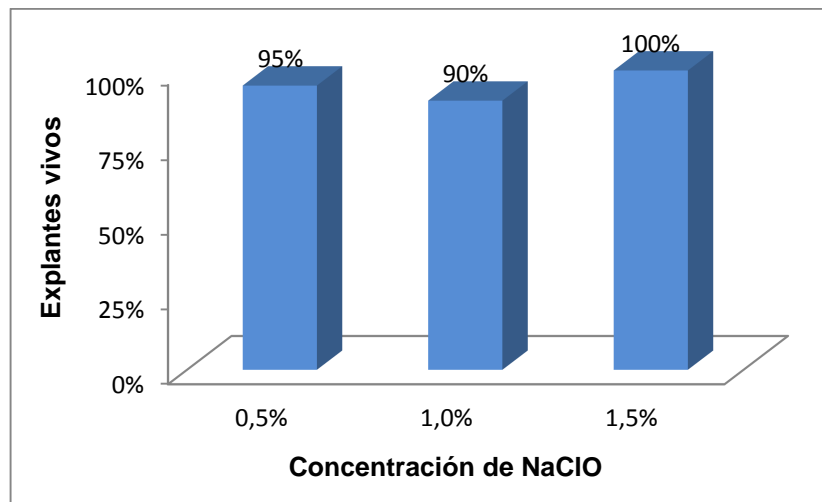


Figura 3.13 Gráfica de frecuencias de explantes vivos con respecto a la concentración de NaClO.

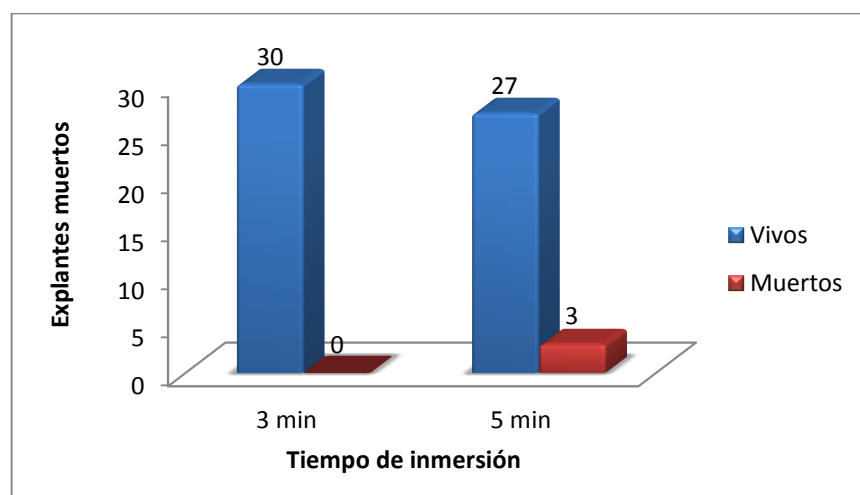


Figura 3.14 Gráfico de explantes vivos y muertos encontrados después de la aplicación de diferentes tiempos de inmersión en NaClO.

Adicionalmente, con respecto al tiempo de inmersión se realizó una distribución de frecuencias del grupo de explantes vivos que nos indica la proporción en porcentaje de la misma en la muestra (Tabla A.1.14), no existe una relación clara de dependencia entre la muerte y el tiempo de inmersión en NaClO, es decir que este factor si influye en la variable muerte pero no de una manera significativa, tanto para el tiempo de 3 y 5 minutos de inmersión, no existen diferencias significativas entre los grupos muertos y vivos, por lo que se puede determinar que ambas poblaciones son estadísticamente diferentes (Figura 3.15).

Para analizar la relación de los factores aplicados (concentración y tiempo de inmersión) y la variable muerte se realizó una distribución de frecuencias de la interacción (Tabla A.1.15), no tiene un efecto significativo sobre la muerte de los explantes, dado que tanto el tratamiento 1, 3, 5 y 6 presentan un 100% de explantes vivos, mientras que los tratamientos 2 y 4 presentan un porcentaje de 90 y 80% respectivamente, pero que sigue siendo no representativo para esta variable (Figura 3.16).

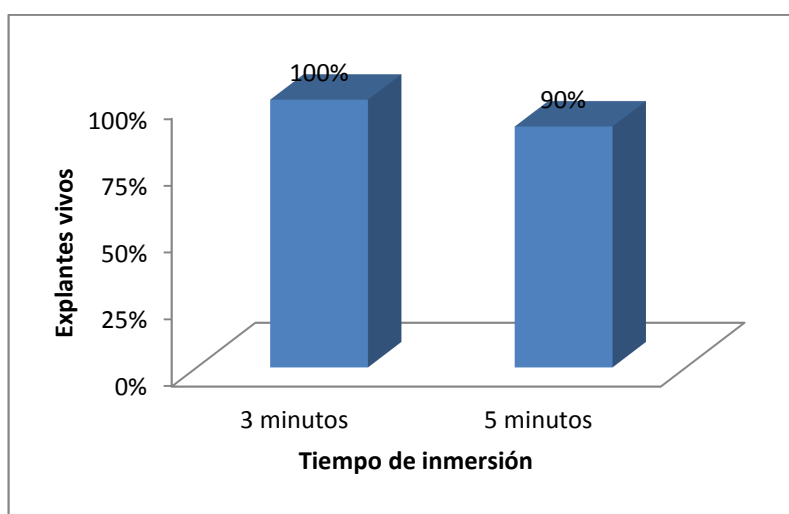


Figura 3.15 Gráfica de frecuencia de explantes vivos con respecto al tiempo de inmersión en NaClO.

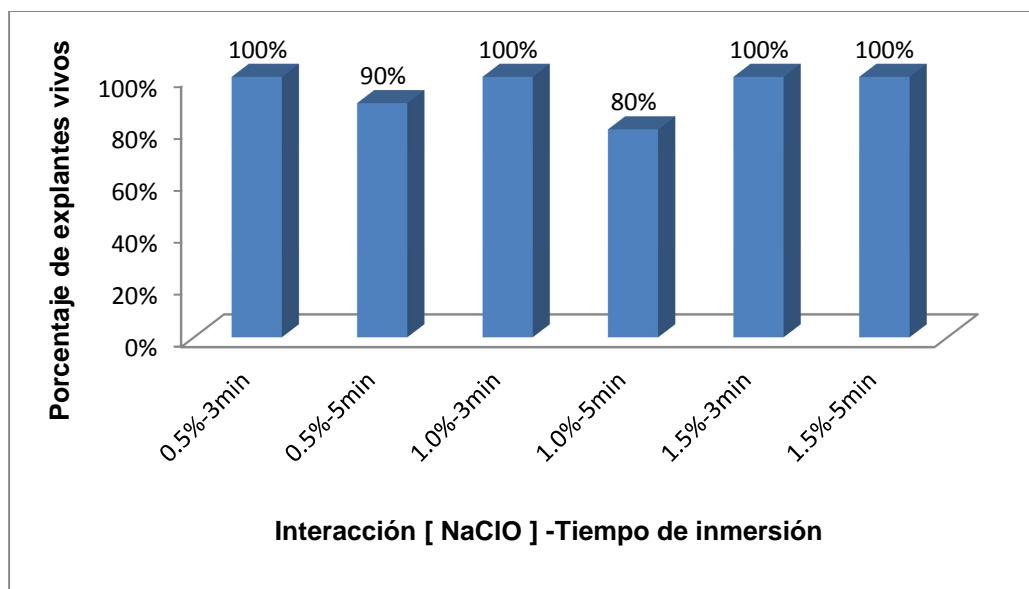


Figura 3.16 Gráfica de porcentaje de explantes vivos con respecto a la interacción concentración de NaClO - tiempo de inmersión

b) Análisis inferencial

Para analizar la relación entre la concentración de NaClO y la variable muerte, se realizó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia, empleando un nivel de significación $\alpha = 5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia 3.19. En este caso no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia ($p = 34.90\%$) (Tabla 3.9); por lo tanto, se sugiere que la muerte de los explantes no depende de la concentración de NaClO en el proceso de desinfección, además, de la prueba de hipótesis de comparación de proporciones poblacionales, se infiere que la proporción de explantes vivos para las concentraciones 1 y 1.5% de NaClO son similares, es decir que entre ambos no hay diferencia estadísticamente significativa ($p = 6.80\%$).

Tabla 3.9 Prueba chi cuadrado para la muerte con respecto a la concentración de NaClO

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2,11	2	0,3490

En cuanto al tiempo de inmersión, se efectuó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia empleando un nivel de significación $\alpha = 5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia A.1.13, en este caso no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia ($p = 7.56\%$) (Tabla 3.10); el valor p ligeramente superior al 5% indica que no existe una relación fuerte de dependencia entre la muerte y el tiempo de inmersión, es decir que este factor tiene un efecto pero no significativo sobre la muerte de los explantes, además, de la prueba de hipótesis de comparación de proporciones poblacionales, se infiere que la proporción de explantes vivos es significativamente mayor utilizando un tiempo de inmersión de 3 minutos ($p = 3.39\%$).

Tabla 3.10 Prueba chi cuadrado para la muerte con respecto al tiempo de inmersión

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	3,16	1	0,0756

Para la interacción de los factores, concentración de NaClO y tiempo de inmersión, la prueba de hipótesis de comparación de proporciones poblacionales, infiere que la proporción de explantes vivos entre los

tratamientos 1%-5min y 1.5%-5 min son similares, es decir que entre ambos existe una diferencia estadística ligeramente significativa ($p = 5.69\%$)

Dado que, para los distintos tratamientos, los valores obtenidos de la variable muerte son dicotómicos, no cumplen con los supuestos de normalidad; por lo tanto se hace necesario un análisis no paramétrico para comparar el comportamiento de esta variable según el tratamiento aplicado. Así mediante la prueba de Kruskal-Wallis, se determinó que no existe diferencia significativa entre las distribuciones de la muerte en los tratamientos estudiados ($p = 20.30\%$) (Tabla 3.11).

Tabla 3.11 Prueba de Kruskal Wallis para la variable muerte

Variable	Tratamiento	N	trat	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
Muerte	1	1	10	1,00	0,00	1,00	32,00	1,03	0,2030	
Muerte	2	2	10	1,00	0,00	1,00	32,00			
Muerte	3	3	10	1,00	0,00	1,00	32,00			
Muerte	4	4	10	0,90	0,32	1,00	29,00			
Muerte	5	5	10	0,80	0,42	1,00	26,00			
Muerte	6	6	10	1,00	0,00	1,00	32,00			

La figura 3.17 muestra un resumen de las variables evaluadas en cada uno de los tratamientos de desinfección, evidenciando que el tratamiento 6 (1.5%-5minutos), es el que menor porcentaje de explantes contaminados, necrosados y muertos presenta, por lo que se determina a este como el mejor tratamiento.

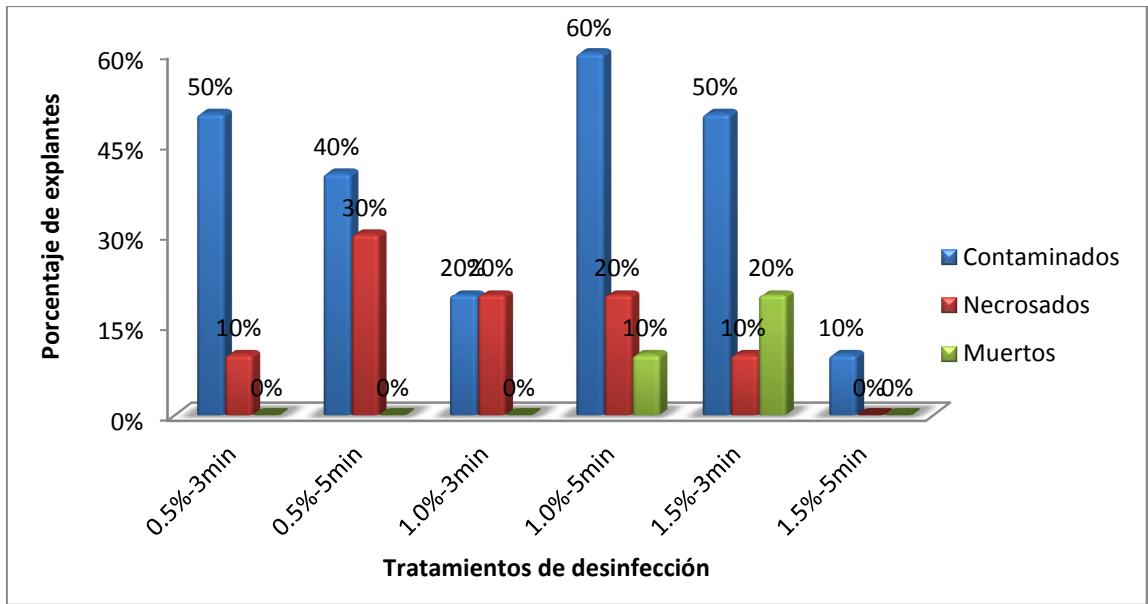


Figura 3.17 Gráfico de tratamientos de desinfección vs porcentaje de explantes contaminados, necrosados y muertos.

3.2 Etapa de inducción de brotes

Para esta etapa se utilizó explantes (yemas) desinfectadas con el tratamiento 6 (1.5%-5minutos) de desinfección, cultivadas en el medio de Murashige y Skoog (M&S) suplementado con 30 gL^{-1} de azúcar, 6.2 gL^{-1} de agar, con BAP en concentraciones 1, 2, 3 mgL^{-1} en combinación ANA a concentraciones 0.1, 0.5, 1 mgL^{-1} además una concentración constante 1 mgL^{-1} de brasinolida, se evaluó como variables la presencia o ausencia de brote, longitud, número de entrenudos y la formación de callo.

3.2.1 Presencia o ausencia de brotes

a) Análisis exploratorio de datos

Para analizar la relación entre la concentración de hormona BAP y la presencia/ausencia de brotes, se realizó una tabla de contingencia (Tabla B.1.1) donde se tiene que de los 123 brotes producidos: 10 se encontraron

cuando se aplicó una concentración de 0 mgL⁻¹ BAP, 37 cuando se aplicó 1 mgL⁻¹ BAP, 36 con 2 mgL⁻¹ BAP y 40 cuando se aplicó 3 mgL⁻¹ BAP al medio de cultivo. A una concentración de 3 mgL⁻¹ BAP se evidencia una mayor generación de brotes, lo que sugiere que el BAP tiene un efecto sobre el crecimiento de los explantes (Figura 3.18)

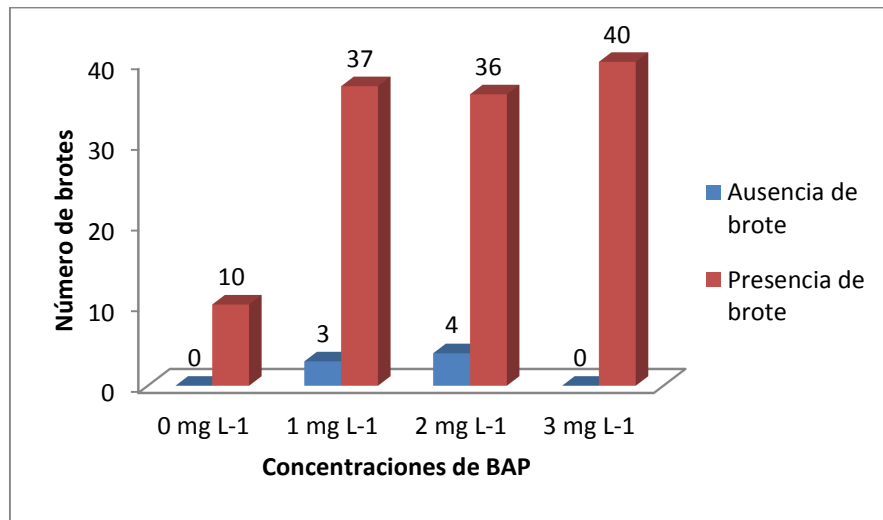


Figura 3.18 Gráfico de presencia/ausencia de brotes encontrados al usar BAP en el medio de cultivo.

Con respecto a la concentración de ácido α -naftalenacético (ANA) se encontró que de los 123 brotes producidos, 39 se encontraron cuando se aplicó una concentración de 0 mgL⁻¹ ANA, 29 cuando se aplicó 0.1 mgL⁻¹ ANA, 28 con 0.5 mgL⁻¹ ANA y 27 cuando se aplicó 1 mgL⁻¹ ANA al medio de cultivo (Tabla B.1.2). La generación de brotes es mayor cuando no se añade ANA al medio de cultivo y va disminuyendo a medida que la concentración de este regulador de crecimiento aumenta, es decir que son inversamente proporcionales (Figura 3.19).

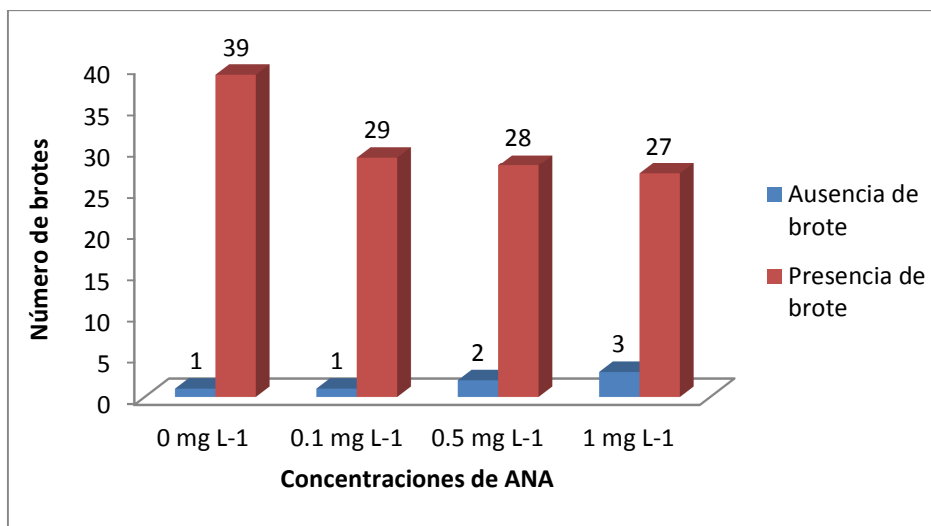


Figura 3.19 Gráfico de presencia/ausencia de brotes encontrados al usar ANA en el medio de cultivo.

En cuanto a la interacción de ambos reguladores de crecimiento se encontró que de los 123 brotes generados: 10 se presentaron cuando se aplicaron los tratamientos I0, I1, I2, I9, I10, I11 e I12; 9 brotes cuando se aplicaron los tratamientos I3, I5, I6, I7 e I8 y 8 brotes cuando se aplicó el tratamiento I4 (Tabla B.1.3). En la figura 3.20 se observa que todas las interacciones de reguladores de crecimiento presentan relativamente el mismo número de brotes por lo que se considera que no existe diferencia estadística entre los tratamientos.

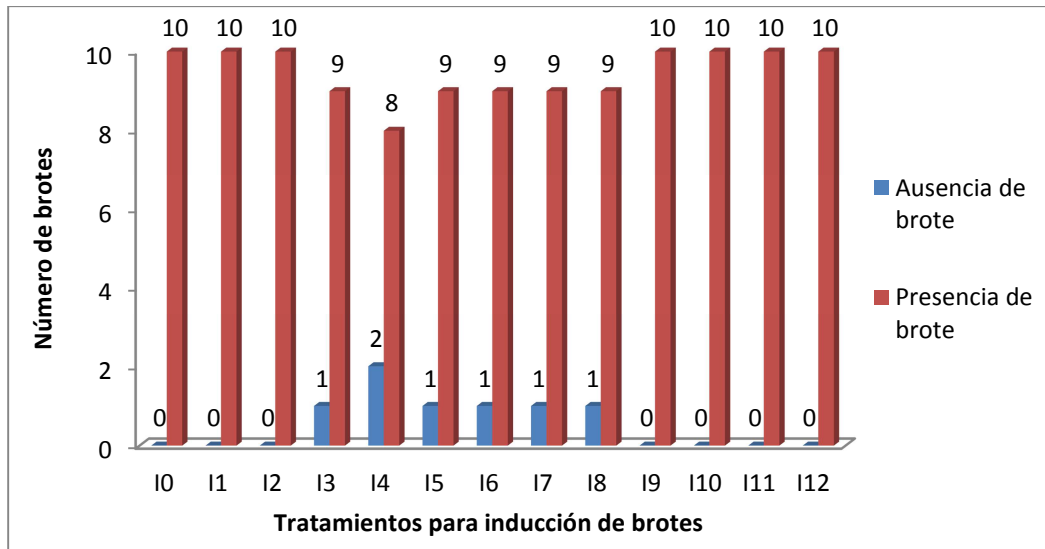


Figura 3.20 Gráfico de presencia/ausencia de brotes encontrados al usar la interacción ANA y BAP en el medio de cultivo.

b) Análisis Inferencial

Para analizar la relación entre la presencia/ausencia de brote con la concentración de BAP, se efectuó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia empleando un nivel de significación $\alpha = 5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia B.1.1 en este caso no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia ($p = 18.16\%$) (Tabla 3.12); por lo tanto, se sugiere que la generación de brotes, no depende de la concentración de BAP aplicado en el medio de cultivo.

Tabla 3.12 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de BAP.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	4,87	3	0,1816

Con respecto a la concentración de ANA, la prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia empleando un nivel de significación $\alpha=5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia B.1.2, para analizar la relación entre la presencia/ausencia de brote y la concentración de hormona, mostró un valor ($p=52.17\%$) mayor al nivel de significación $\alpha=5\%$ (Tabla 3.13), por lo tanto, no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia, lo que sugiere que la generación de brotes, no depende de la concentración de ANA aplicado en el medio de cultivo.

Tabla 3.13 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de ANA.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2,25	3	0,5217

3.2.2 Longitud de los brotes

a) Análisis exploratorio de datos

Para el análisis de esta variable, se categorizó los datos en 4 niveles: el nivel 1 que comprende los brotes de 0 a 1,075 cm; el nivel 2 con brotes de 1,075 a 2,15 cm, el nivel 3 incluye brotes de 2,15 a 3,225 cm y el nivel 4 que está formado por los brotes de tamaño entre 3,225 a 4,3 cm.

La relación entre la concentración de BAP, la concentración de ANA y la longitud de los brotes, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla B.1.4), donde se tiene que 73 brotes pertenecen al nivel uno, 46 brotes al nivel dos, 6 brotes en el nivel tres y 5 brotes pertenecen al nivel cuatro de longitud. El tratamiento I0 presenta la mayor cantidad de brotes de nivel cuatro, es decir brotes con mayor longitud y al mismo tiempo la menor cantidad de brotes de nivel uno, los brotes de corta longitud, mientras que los tratamientos I6, I7 e

18 presentan la mayor cantidad de brotes de nivel uno y ningún brote de longitud alta (Figura 3.21).

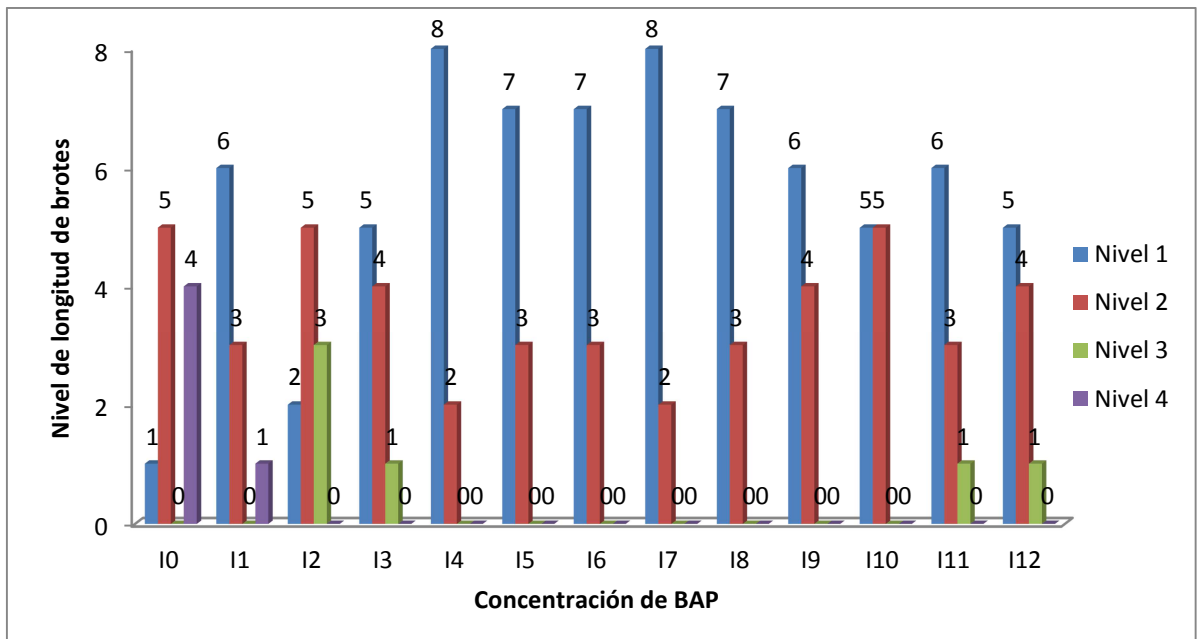


Figura 3.21 Gráfico de longitud de los brotes con respecto a la interacción de las hormonas ANA y BAP.

b) Análisis inferencial

De acuerdo al análisis de varianza (ADEVA) para el efecto de la concentración de la hormona BAP, se encontró un valor ($p < 0.01\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha = 5\%$), es decir que en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher se encontró tres grupos estadísticos, las concentraciones 1 y 3 mg L⁻¹ BAP comparten el grupo B, mientras que las concentraciones 0 y 2 mg L⁻¹ BAP pertenecen a un solo grupo, el grupo C y el grupo A respectivamente, por lo tanto se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de BAP considerando la variable longitud de brotes (Tabla B.1.5).

Con respecto a la concentración de la hormona ANA, el análisis de varianza (ADEVA), mostró un valor ($p=13.25\%$), mayor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), lo que implica que en el dominio estudiado, no hay la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA, considerando la variable longitud de brotes, esta contradicción se debe a que la prueba de comparaciones utilizada, no es una prueba exigente en cuanto a la categorización, sin embargo es suficiente cuando se realizan ensayos a nivel de laboratorio (Tabla B.1.6).

El análisis de varianza (ADEVA) para la interacción de hormonas BAP y ANA, mostró un valor ($p=0.01\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), lo que implica, que en el dominio estudiado, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró tres grupos estadísticos, donde se observa que el tratamiento I0 e I2 forman parte de un solo grupo estadístico, grupo C y grupo B respectivamente, los tratamientos I4, I5, I6, I7, I8, I9, I10 e I11, pertenecen al grupo A, mientras que los tratamientos I1, I3 e I12, pertenecen a los grupos A y B, por lo tanto se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de BAP y ANA considerando la variable longitud de brotes (Tabla B.1.7).

3.2.3 Número de entrenudos

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la concentración de BAP, la concentración de ANA y la variable número de entrenudos, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla B.1.8), donde se tiene que de 130 explantes con

entrenados, 21 de ellos no presentaron entrenudos, 74 explantes presentaron un entrenudo, 31 brotes desarrollaron dos entrenudos, y 2 explantes presentaron tres y cuatro entrenudos (Figura 3.22)

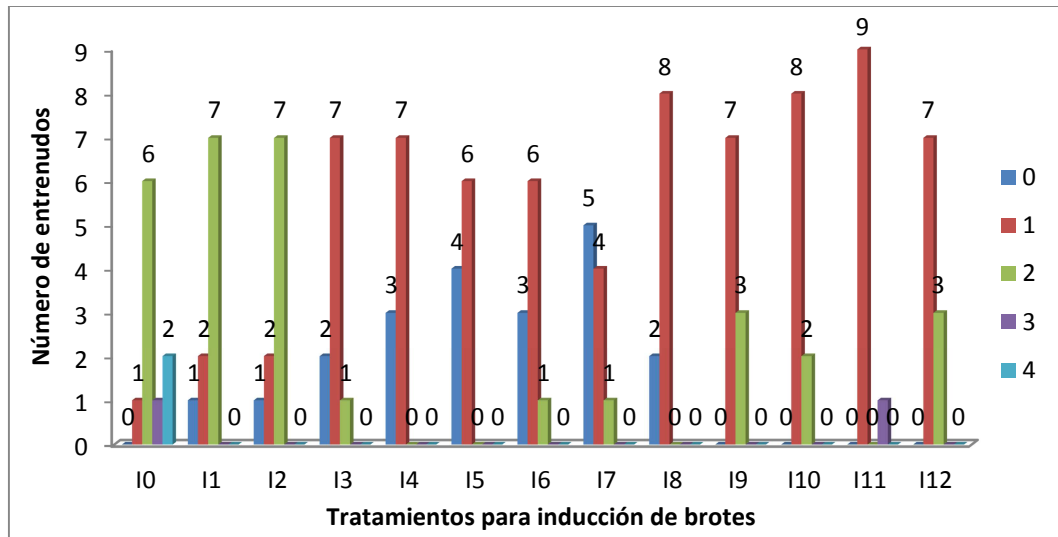


Figura 3.22 Gráfico del número de entrenudos con respecto a la interacción de hormonas ANA y BAP.

b) Análisis inferencial

De acuerdo al análisis de varianza (ADEVA) para el efecto de la concentración de la hormona BAP, se encontró un valor ($p < 0.01\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha = 5\%$), por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher se encontró tres grupos estadísticos, donde se observa que la concentración 0 mg L^{-1} forman parte del grupo C, las concentraciones 1 y 3 mg L^{-1} pertenecen al grupo B, y la concentración 2 mg L^{-1} está en el grupo A, por lo tanto se evidencia que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de BAP considerando la variable número de entrenudos (Tabla B.1.9).

Con respecto a la concentración de la hormona ANA, el ADEVA mostró un valor ($p=0.37\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), lo que implica que en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos, donde se observa que las concentraciones 0,5 y 1 mg L⁻¹ son el grupo A, es decir que entre ellas no muestran diferencias estadísticamente significativas, mientras que por otro lado la concentración 0 mg L⁻¹ pertenecen al grupo B, y la concentración 0,1 mg L⁻¹ forma parte del grupo A y B, por lo tanto se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos, es decir que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA considerando la variable número de entrenudos (Tabla B.1.10).

El análisis de varianza (ADEVA) para la interacción de hormonas BAP Y ANA, mostró un valor ($p<0.01\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), lo que implica que en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró cinco grupos estadísticos, donde se observa que el tratamiento I1 e I2 forman parte del grupo D; el tratamiento I5 e I7 forman parte del grupo A; el tratamiento I3, I6 e I8 pertenecen al grupo A,B y C; el tratamiento I10 e I11 pertenecen a los grupos B, C y D; el tratamiento I9 e I12 pertenecen a los grupos C y D; el tratamiento I4 pertenece a los grupos A y B, y el tratamiento I0 pertenece al grupo E y presenta la media más alta, por lo tanto se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de BAP y ANA considerando la variable número de entrenudos (Tabla B.1.11).

3.2.4 Formación de Callo

a) Análisis exploratorio de datos

Para la evaluación de esta variable se estableció niveles que evidencian el grado de desdiferenciación celular (formación de callo) que tiene lugar con las diferentes interacciones hormonales de BAP y ANA, mediante una tabla de contingencia (Tabla B.1.12), la cual nos permite organizar los datos que se obtuvo de dichos factores, así se tiene que los tratamientos I0, I1, I2, I5, I9 e I10 presentan poca o ninguna formación de callo, lo cual es muy beneficioso para la propagación clonal, en general se observa que ningún tratamiento presenta un número significativo de formación callosa (Figura 3.23).

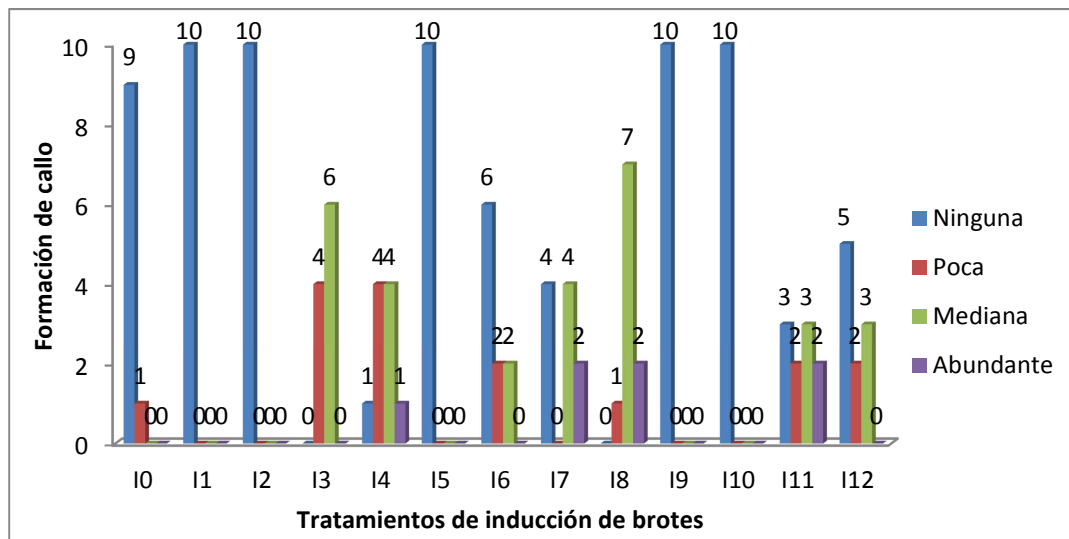


Figura 3.23 Gráfico de la formación de callo con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.

b) Análisis inferencial

Analizando la formación callo con respecto a la concentración de BAP, mediante el análisis de varianza (ADEVA), se tiene un valor ($p = 2.65\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha = 5\%$), por lo que en el dominio estudiado se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de

tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró tres grupos estadísticos, donde se observa que las concentraciones 0 y 2 mg L⁻¹ de BAP, pertenecen cada uno a un solo grupo estadístico, grupo A y grupo C respectivamente, por lo tanto se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de BAP considerando la variable formación de callo (Tabla B.1.13).

Por otro lado si se analiza la concentración de ANA, el ADEVA muestra un valor ($p < 0.01\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha = 5\%$), por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde las concentraciones 0 y 0,1 mg L⁻¹ ANA pertenecen al grupo A y concentraciones 0.5 y 1 mg L⁻¹ ANA forman parte del grupo B, por lo tanto se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA considerando la variable formación de callo (Tabla B.1.14).

De acuerdo al análisis de varianza (ADEVA), para el efecto de la concentración de las hormonas BAP y ANA, se encontró un valor ($p < 0.01\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha = 5\%$), lo que implica que el dominio estudiado se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró cinco grupos estadísticos, donde se observa que los tratamientos I1, I2, I5 I9 e I10 forman parte de un solo grupo estadístico (Grupo A), los tratamientos I4, I7 e I11 pertenecen al grupo D, el tratamiento I0 pertenece a los grupos A y B, el tratamiento I3 pertenece a los grupos D y E, el tratamiento I6 pertenece a los grupos B y C, el tratamiento I12 pertenece al grupo C y el tratamiento I8 pertenece al grupo E, por lo tanto se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de BAP y ANA considerando la variable formación de callo (Tabla B.1.15).

3.3 Etapa de multiplicación de brotes

Para esta etapa se utilizó los medios de cultivo que mejores resultados presentaron en la etapa anterior, en cuanto a las variables longitud y número de entrenudos, que son importantes a la hora de multiplicar, estos son los medios I0 e I2 y en base a ellos se estableció dos medios de cultivo adicionales (Tabla 3.14). Los explantes provenientes de la etapa de inducción del medio I0 (considerado como el mejor medio en cuanto a las variables más representativas) fueron multiplicadas a dichos 4 medios de cultivo para su evaluación en tres subcultivos sucesivos.

Tabla 3. 14 Medios de cultivo aplicados en la etapa de multiplicación

Tratamiento	BAP (mg L⁻¹)	ANA (mg L⁻¹)
M1	0	0
M2	0,5	0,05
M3	1	0,1
M4	0,5	0,1

3.3.1 Primer Subcultivo

3.3.1.1 Presencia o Ausencia de brote

a) Análisis exploratorio de datos

En esta etapa se realizó un DCA con diferente número de observaciones por lo que los resultados serán presentados en porcentaje para poder analizarlos de mejor manera.

Para analizar la relación entre la concentración de BAP y la presencia/ausencia de brotes, se realizó una tabla de contingencia (Tabla C.1.1) que nos permite organizar los datos obtenidos, se obtuvo un 100% en desarrollo de brotes cuando no se aplicó hormona y también para concentraciones de $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ y 1 mgL^{-1} BAP, lo que sugiere que el BAP tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de los explantes (Figura 3.24)

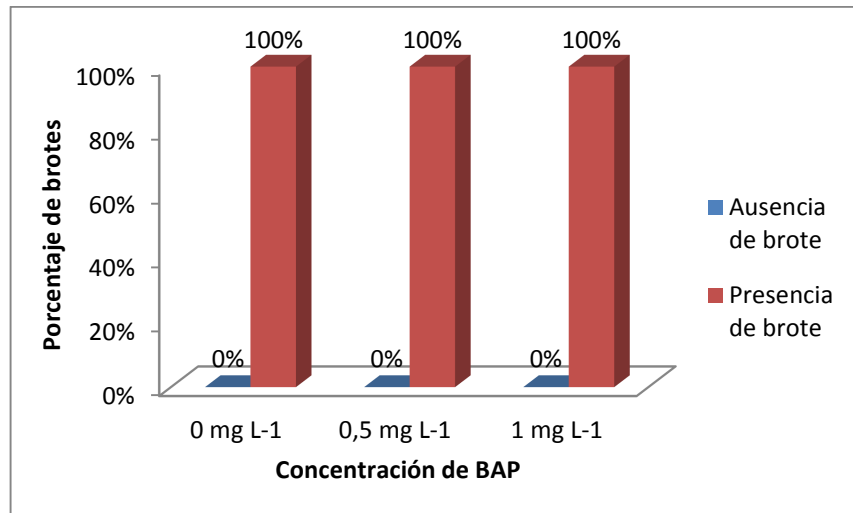


Figura 3.24 Gráfico de presencia/ausencia de brotes encontrados al usar BAP en el medio de cultivo

Con respecto a la concentración del ácido α -naftalenacético (ANA) se encontró un 100% en desarrollo de brotes tanto para cuando no se aplicó BAP como para las concentraciones de $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ y $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ANA lo que sugiere que el ANA tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de los explantes (Tabla C.1.2 y Figura 3.25).

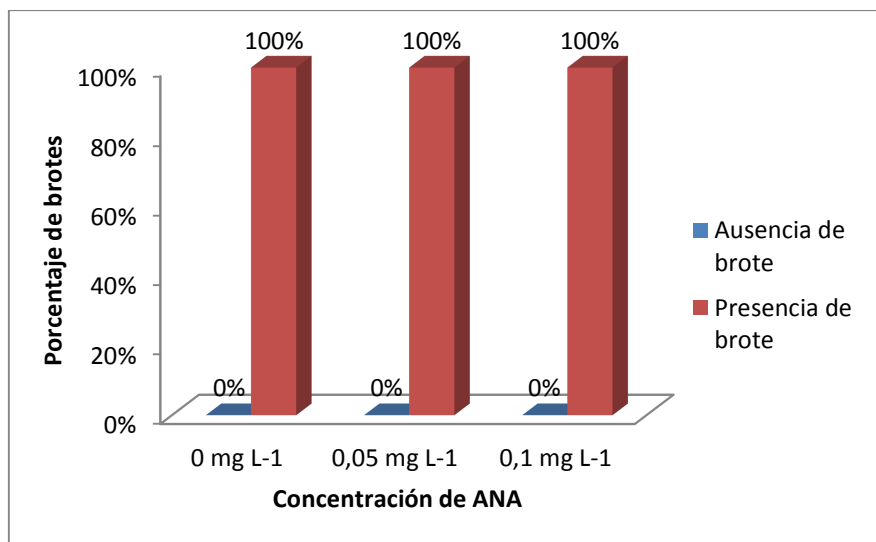


Figura 3.25 Gráfico de presencia/ausencia de brotes con respecto a la concentración de ANA.

En cuanto a la interacción de ambos reguladores de crecimiento (ANA y BAP), se encontró que los cuatro medios aplicados dieron lugar al 100% de brotes, por lo que se considera que no existe diferencia estadística entre los tratamientos para esta variable (Tabla C.1.3 y Figura 3.26).

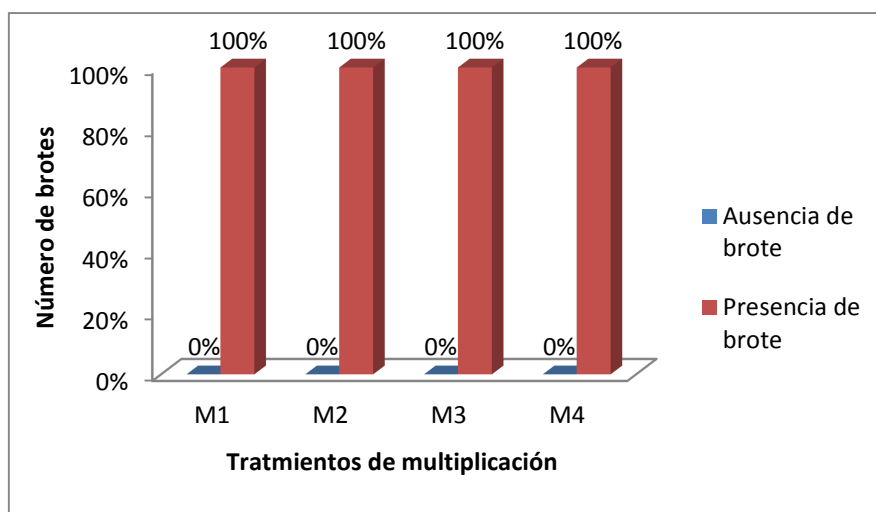


Figura 3.26 Gráfico de presencia/ausencia de brotes con respecto a la interacción de ANA y BAP.

b) Análisis Inferencial

Para analizar la relación entre la presencia/ausencia de brote con la concentración de BAP, se efectuó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia empleando un nivel de significación $\alpha = 5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia C.1.1, en este caso, no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia ($p = 30.12\%$) (Tabla 3.15); por lo tanto, se sugiere que la generación de brotes, es independiente de la concentración de BAP aplicado en el medio de cultivo.

Tabla 3.15 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de BAP.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2,40	2	0,3012

Con respecto a la concentración de ANA y la relación entre la presencia/ausencia de brotes, se efectuó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia empleando un nivel de significación $\alpha = 5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia C.1.2, en este caso no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia ($p = 30.12\%$) (Tabla 3.16) por lo tanto, se sugiere que la generación de brotes, no depende de la concentración de ANA aplicado en el medio de cultivo.

Tabla 3.16 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de ANA.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2,40	2	0,3012

3.3.1.2 Número de entrenudos

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la concentración de BAP, la concentración de ANA y la variable número de entrenudos, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla C.1.4), donde se tiene que de 30 explantes: 14 de ellos no presentaron entrenudos, 2 explantes presentaron un entrenudo, 8 brotes desarrollaron dos entrenudos, y 6 explantes presentaron tres entrenudos, no hubo explantes que presenten 4 o más entrenudos (Figura 3.27).

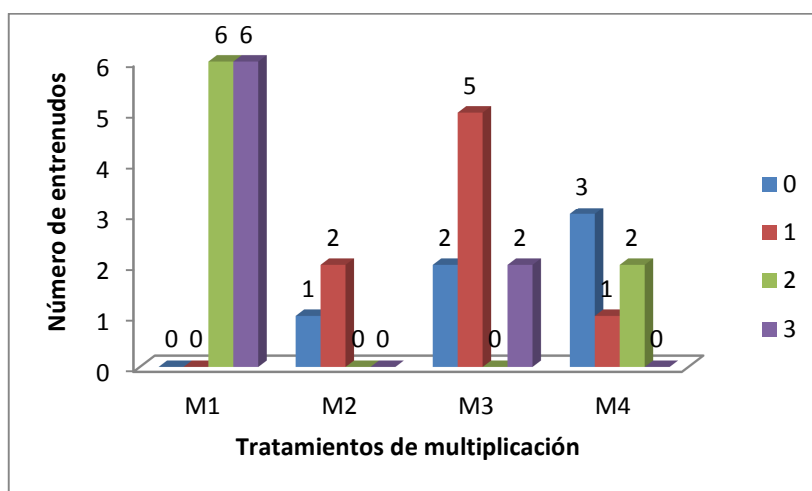


Figura 3.27 Gráfico del número de entrenudos con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP

b) Análisis inferencial

De acuerdo al ADEVA para el efecto de la concentración de la hormona BAP, sobre la variable número de entrenudos, se encontró un valor ($p=8,23\%$), mayor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), lo que implica que en el dominio estudiado, no hay la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, entre los que existe

diferencia estadísticamente significativa considerando la variable número de entrenudos, esta contradicción se debe a que la prueba de comparaciones utilizada, no es una prueba exigente en cuanto a la categorización, sin embargo es suficiente cuando se realizan ensayos a nivel de laboratorio (Tabla C.1.5).

Con respecto a la concentración de la hormona ANA, el ADEVA mostró un valor ($p=17.08\%$), mayor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), lo que implica que en el dominio estudiado, no hay la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró un solo grupo estadístico (Grupo A) por lo tanto se evidencia que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA considerando la variable número de entrenudos (Tabla C.1.6).

El ADEVA para la interacción hormonal BAP y ANA, mostró un valor ($p=4,75\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos donde se observa que el tratamiento M1 y M4 forman parte del grupo B; el tratamiento M2 forma parte del grupo A y B; y el tratamiento M3 pertenece al grupo A, es decir se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de BAP y ANA considerando la variable número de entrenudos (Tabla C.1.7).

3.3.1.3 Longitud de los brotes

a) Análisis exploratorio de datos

Para el análisis de la variable longitud de los brotes, se categorizó los datos en 4 niveles: el nivel 1 que comprende los brotes de 0,3 a 1,475 cm; el nivel 2 con brotes de 1,475 a 2,65 cm, el nivel 3 incluye brotes de 2,65 a 3,825 cm y el nivel 4 que está formado por los brotes de tamaño entre 3,825 a 5 cm.

La relación entre la concentración de BAP, la concentración de ANA y la longitud de los brotes, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla C.1.8), donde se tiene que 16 brotes pertenecen al nivel uno, 6 brotes al nivel dos, 5 brotes en el nivel tres y 3 brotes pertenecen al nivel cuatro de longitud. El tratamiento M1 presenta la mayor cantidad de brotes de nivel cuatro (Figura 3.28).

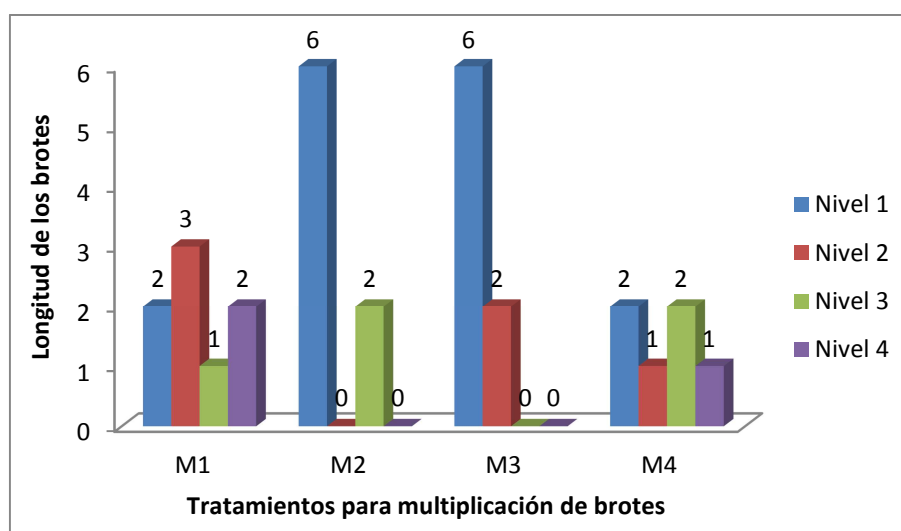


Figura 3.28 Gráfico de la longitud de brotes con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP

b) Análisis inferencial

De acuerdo al ADEVA para el efecto de la concentración de la hormona BAP, se encontró un valor ($p=9,84\%$), mayor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, no existe la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, es decir que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de BAP considerando la variable longitud, esta contradicción se debe a que la prueba de comparaciones utilizada, no es una prueba exigente en cuanto a la categorización, sin embargo es suficiente cuando se realizan ensayos a nivel de laboratorio (Tabla C.1.9).

Con respecto a la concentración de ANA, el ADEVA, mostró un valor ($p=21.78\%$), mayor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, no existe la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró un solo grupo estadístico, es decir se evidencia que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA considerando la variable longitud de brotes (Tabla C.1.10).

El ADEVA para la interacción de hormonas BAP y ANA, mostró un valor ($p=7.24\%$), mayor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, no existe la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que el tratamiento M1 y M4 forma parte del grupo B, el tratamiento M2, pertenecen a los grupos A y B y el tratamientos M3 al grupo A, es decir que existen diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de ANA y BAP considerando la variable longitud de brotes, esta contradicción se

debe a que la prueba de comparaciones utilizada, no es una prueba exigente en cuanto a la categorización, sin embargo es suficiente cuando se realizan ensayos a nivel de laboratorio (Tabla C.1.11).

3.3.1.4 Vigorosidad de los brotes

a) Análisis exploratorio de datos

Para analizar la relación de los factores aplicados (concentración de BAP y concentración de ANA) con la variable vigorosidad, se realizó una tabla de contingencia (Tabla C.1.12), donde se tiene que los cuatro tratamientos aplicados contribuyen al desarrollo de brotes vigorosos (Figura 3.29).

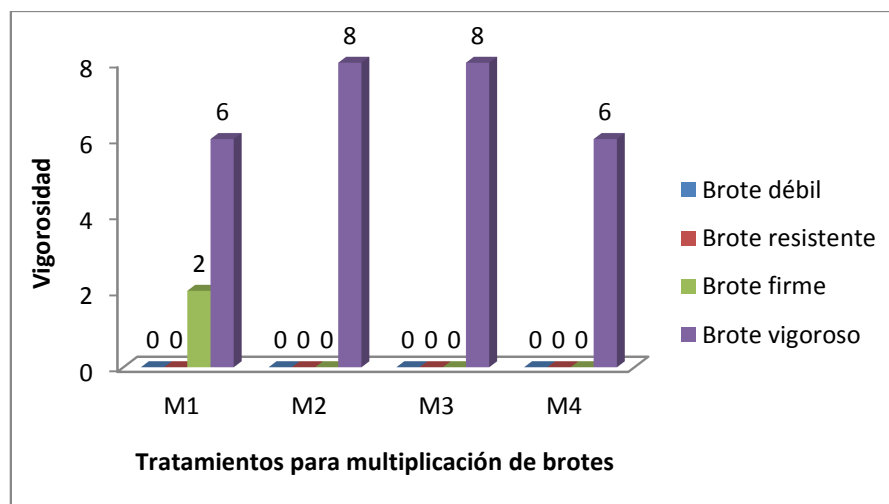


Figura 3. 29 Gráfico de la variable vigorosidad con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.

b) Análisis inferencial

De acuerdo al análisis de varianza para el efecto de la concentración de la hormona BAP, se encontró un valor ($p = 5.22\%$), ligeramente superior al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha = 5\%$), por lo tanto, en el dominio

estudiado, no existe la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que la concentración 0.5 y 1 mg L⁻¹ forman parte de un solo grupo estadístico (Grupo B), mientras que por otro lado la concentración 0 mg L⁻¹ pertenece al grupo A, es decir que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de BAP considerando la variable vigorosidad, esta contradicción se debe a que la prueba de comparaciones utilizada, no es una prueba exigente en cuanto a la categorización, sin embargo es suficiente cuando se realizan ensayos a nivel de laboratorio (Tabla C.1.13).

Con respecto a la concentración de ANA, el ADEVA mostró un valor ($p=5.22\%$), ligeramente superior al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, no existe la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher, se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que la concentración 0.5 y 1 mg L⁻¹ forman parte del grupo B, mientras que la concentración 0 mg L⁻¹ pertenece al grupo A, es decir, que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA considerando la variable vigorosidad esta contradicción se debe a que la prueba de comparaciones utilizada, no es una prueba exigente en cuanto a la categorización, sin embargo es suficiente cuando se realizan ensayos a nivel de laboratorio (Tabla C.1.14).

El ADEVA para la interacción hormonal BAP y ANA, mostró un valor ($p=12.22\%$), mayor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, no existe la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher, se encontró dos grupos estadísticos, es decir que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de BAP y ANA considerando la vigorosidad, esta contradicción se debe a que la

prueba de comparaciones utilizada, no es una prueba exigente en cuanto a la categorización, sin embargo es suficiente cuando se realizan ensayos a nivel de laboratorio (Tabla C.1.15).

3.3.2 Segundo Subcultivo

3.3.2.1 Presencia o Ausencia de brote

a) Análisis exploratorio de datos

Para analizar la relación entre la concentración de BAP y la presencia/ausencia de brotes, se realizó una tabla de contingencia (Tabla C.1.16), donde, se tiene que las tres concentraciones produjeron brotes en un 100% (Figura 3.30).

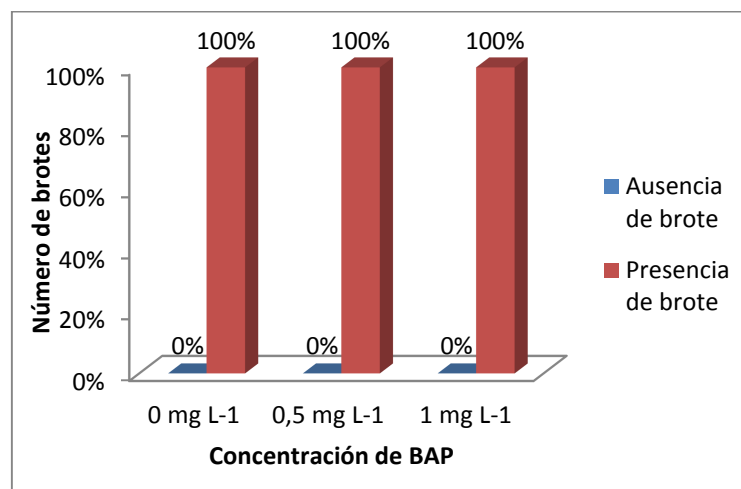


Figura 3.30 Gráfico de la presencia / ausencia de brotes con respecto a la concentración de BAP.

Para analizar la relación entre la concentración de ANA y la presencia/ausencia de brotes, se realizó una tabla de contingencia (Tabla C.1.17), donde, se tiene que las tres concentraciones aplicadas produjeron brotes en un 100% (Figura 3.31).

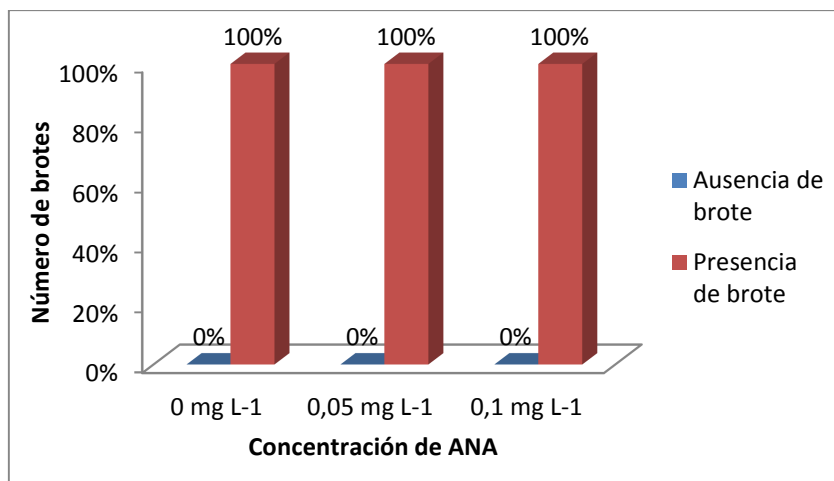


Figura 3.31 Gráfico de la presencia / ausencia de brotes con respecto a la concentración de ANA.

Para analizar la relación entre la concentración de BAP, la concentración de ANA y la presencia/ausencia de brotes, se realizó una tabla de contingencia, se encontró que los cuatro medios dieron lugar al 100% de brotes, por lo que se considera que no existe diferencia estadística entre los tratamientos para esta variable (Tabla C.1.18 y Figura 3.32).

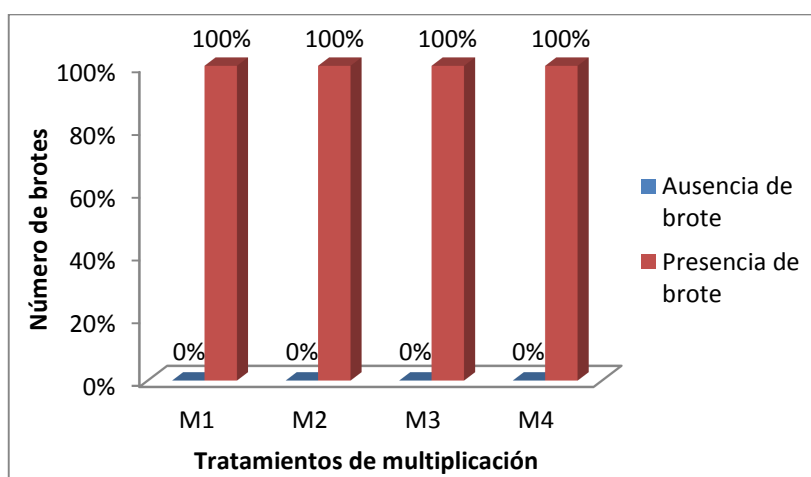


Figura 3.32 Gráfico de presencia/ausencia de brotes con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.

b) Análisis Inferencial

Para analizar la relación entre la presencia/ausencia de brote con la concentración de BAP, se efectuó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia empleando un nivel de significación $\alpha=5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia C.1.16, en este caso no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia ($p=24.1\%$) (Tabla 3.17); por lo tanto, se sugiere que la generación de brotes, es independiente de la concentración de BAP aplicado en el medio de cultivo.

Tabla 3.17 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de BAP.

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	2,85	2	0,2410

Con respecto a la concentración de ANA, la prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia empleando un nivel de significación $\alpha=5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia C.1.17, en este caso no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia ($p=48.15\%$) (Tabla 3.18); por lo tanto, se sugiere que la generación de brotes, no depende de la concentración de ANA aplicado en el medio de cultivo.

Tabla 3.18 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de ANA.

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	1,46	2	0,4815

3.3.2.2. Número de entrenudos

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la concentración de 6-bencilaminopurina (BAP), la concentración de ácido naftalenacético (ANA) y la variable número de entrenudos, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla C.1.19), donde se tiene que de 26 explantes, 13 de ellos no presentaron entrenudos, 7 explantes presentaron un entrenudo y 6 brotes desarrollaron dos entrenudos, no hubo explantes que presenten tres o más entrenudos (Figura 3.33).

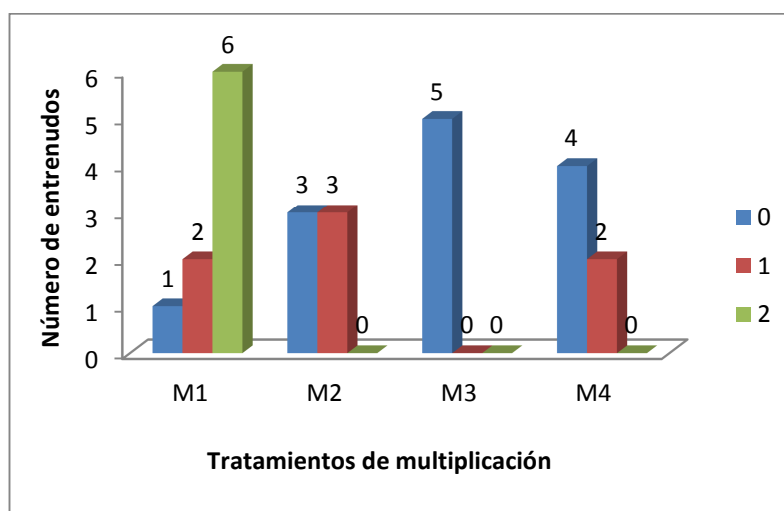


Figura 3.33 Gráfico del número de entrenudos con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.

b) Análisis inferencial

De acuerdo al análisis de varianza (ADEVA), se encontró un valor ($p < 0.01\%$), mayor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha = 5\%$), para el efecto de la concentración de la hormona BAP, por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que la concentración 0 mg L^{-1} forman parte del

grupo B y las concentraciones $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ y 1 mg L^{-1} está en el grupo A, es decir que se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de BAP considerando la variable número de entrenudos (Tabla C.1.20).

Con respecto a la concentración de la hormona ANA, el análisis de varianza (ADEVA), mostró un valor ($p=0.01\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que la concentración 0 mg L^{-1} forman parte del grupo B y las concentraciones $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ está en el grupo A, por lo tanto se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA considerando la variable número de entrenudos (Tabla C.1.21).

El análisis de varianza (ADEVA) para la interacción de hormonas BAP Y ANA, mostró un valor ($p=0,02\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que el tratamiento M1 forma parte del grupo A, mientras que los tratamientos M2, M3 y M4 pertenecen al grupo A; es decir que se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de BAP Y ANA considerando la variable número de entrenudos (Tabla C.1.22).

3.3.2.3 Longitud de los brotes

a) Análisis exploratorio de datos

Para el análisis de la variable longitud de los brotes, se categorizó los datos en 4 niveles: el nivel uno que comprende los brotes de 0,1 a 0,825 cm; el nivel dos con brotes de 0,825 a 1,55 cm, el nivel tres incluye brotes de 1,55 a 2,275 cm y el nivel cuatro, formado por los brotes entre 2,275 a 3 cm.

La relación entre la concentración de BAP, la concentración de ANA y la longitud de los brotes, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla C.1.23), donde se tiene que 26 brotes pertenecen al nivel uno, 15 brotes al nivel dos, 3 brotes en el nivel tres y 2 brotes pertenecen al nivel cuatro de longitud. El tratamiento M1 presenta la mayor cantidad de brotes de nivel tres y cuatro es decir brotes con mayor longitud, mientras que los tratamientos M2, M3 y M4 presentan mayor cantidad de brotes pequeños (Figura 3.34).

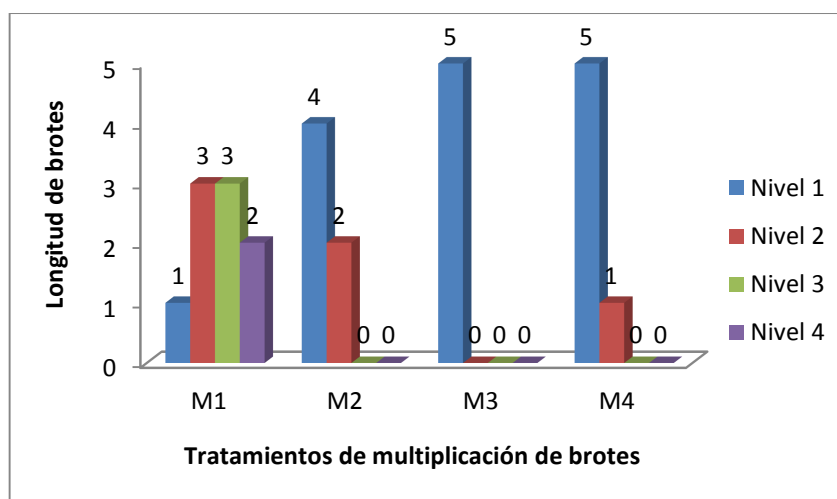


Figura 3.34 Gráfico de la longitud de brotes con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.

b) Análisis inferencial

De acuerdo al ADEVA, se encontró un valor ($p=0.01\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), para el efecto de la concentración de la hormona BAP sobre la variable longitud de brotes, por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher, se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que la concentración 0 mg L^{-1} forma parte del grupo B, mientras que las concentraciones $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ y 1 mg L^{-1} pertenece al grupo A, es decir que se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de BAP considerando la variable longitud (Tabla C.1.24).

Con respecto a la concentración de la hormona ANA, el ADEVA mostró un valor ($p=0.01\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher, se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que la concentración 0 mg L^{-1} forma parte del grupo B, mientras que las concentraciones $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ y 0.1 mg L^{-1} pertenecen al grupo A, es decir que se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA aplicadas (Tabla C.1.25).

El ADEVA para la interacción hormonal, mostró un valor ($p=0.03\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de BAP y ANA aplicadas, considerando la variable longitud de brotes (Tabla C.1.26).

3.3.2.4 Vigorosidad de los brotes

a) Análisis exploratorio de datos

Para analizar la relación de los factores aplicados (concentración de BAP y ANA) y la variable vigorosidad se realizó una tabla de contingencia (Tabla C.1.27), se tiene que los cuatro tratamientos aplicados contribuyen al desarrollo de brotes vigorosos los cuales adecuados para el propósito de la investigación, el tratamiento M1 es el que mayor cantidad de brotes vigorosos provee. (Figura 3.35).

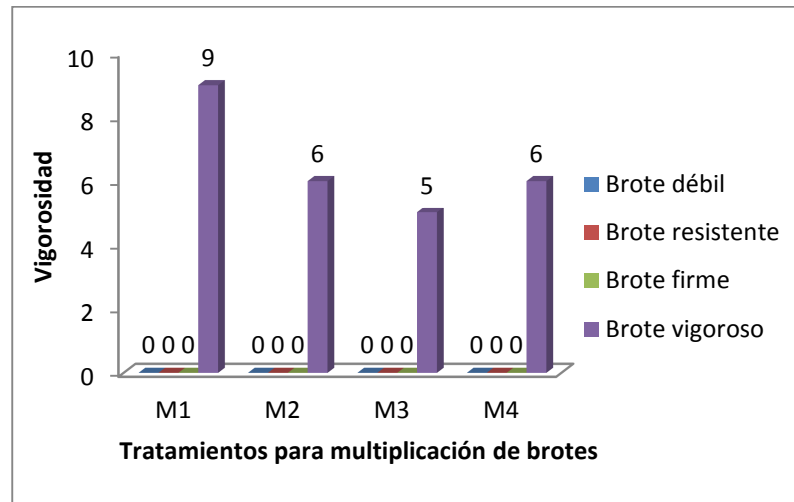


Figura 3.35 Gráfico de la vigorosidad con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.

b) Análisis inferencial

La figura 3.35 evidencia que no existe diferencia entre tratamientos para la vigorosidad, es decir que las medias son iguales entre si y a su vez igual a la media global, por tanto el efecto de los tratamientos es igual a cero, razón por la cual no aplica realizar un análisis de varianza (ADEVA) para esta variable.

3.3.3 Tercer Subcultivo

3.3.3.1 Presencia o Ausencia de brote

a) Análisis exploratorio de datos

Para analizar la relación entre la concentración de BAP y la presencia/ausencia de brotes, se realizó una tabla de contingencia (Tabla C.1.28), donde se encontró que la concentración 0,5 mg L⁻¹ produjo brotes en un 90%, mientras que las concentraciones 0 y 1 mg L⁻¹ dieron lugar al 100% de generación de brotes (Figura 3.36).

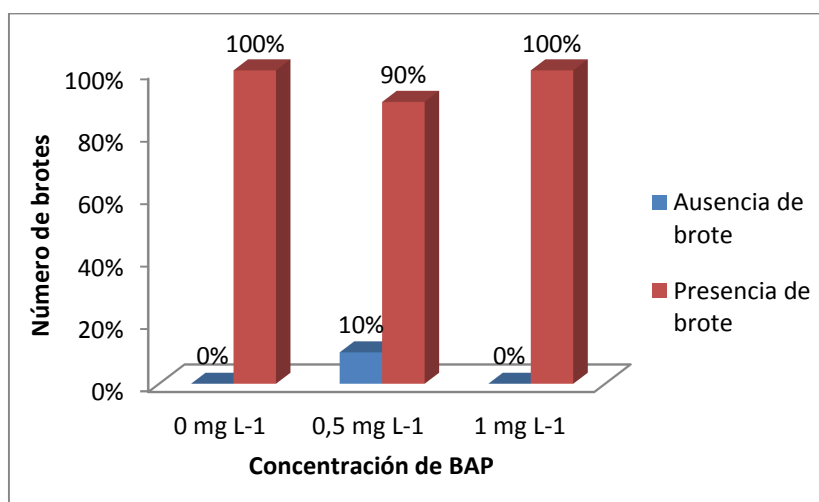


Figura 3.36 Gráfico de la presencia / ausencia de brotes con respecto a la concentración de BAP.

En cuanto a la relación entre la concentración de ANA y la presencia/ausencia de brotes, se realizó una tabla de contingencia (Tabla C.1.29), donde se encontró que la concentración 0,05 mg L⁻¹ produjo brotes en un 80%, mientras que las concentraciones 0 y 0,1 mg L⁻¹ dieron 100% de brotes, por lo que se considera que no existe diferencia estadística entre estos tratamientos (Figura 3.37).

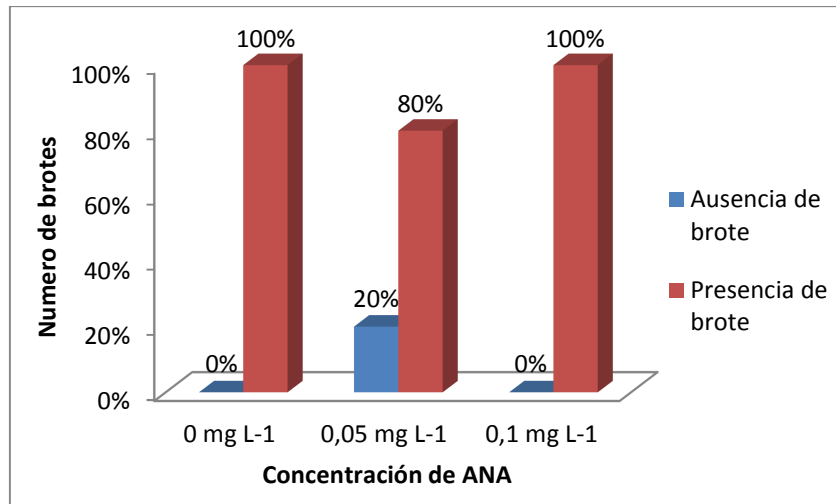


Figura 3.37 Gráfico de la presencia / ausencia de brotes con respecto a la concentración de ANA.

Para analizar la relación entre la concentración de BAP y ANA con la presencia/ausencia de brotes, se realizó una tabla de contingencia (Tabla C.1.30) donde se tiene que de los cuatro medios aplicados los M1, M3 y M4, dieron lugar al 100% de generación de brotes, por lo que se considera que no existe diferencia estadística entre estos tratamientos para esta variable (Figura 3.38).

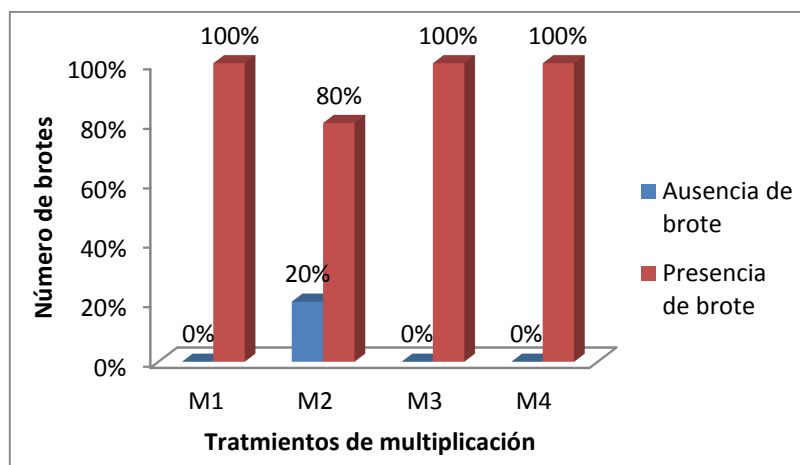


Figura 3.38 Gráfico de la presencia/ausencia de brotes con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.

a) Análisis Inferencial

Para analizar la relación entre la presencia/ausencia de brote con la concentración de BAP, se efectuó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia empleando un nivel de significación $\alpha = 5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia C.1.28, en este caso no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia ($p = 50.68\%$) (Tabla 3.19); por lo tanto, se sugiere que la generación de brotes, es independiente de la concentración de BAP aplicado en el medio de cultivo.

Tabla 3.19 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de BAP.

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	1,36	2	0,5068

Con respecto a la concentración de ANA, la prueba de hipótesis chi-cuadrado de independencia empleando un nivel de significación $\alpha = 5\%$ y sobre la base de la tabla de contingencia C.1.29, mostró un valor ($p = 15.23\%$), en este caso no existe la suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia (Tabla 3.20); por lo tanto, se sugiere que la generación de brotes, es independiente de la concentración de ANA aplicada en el medio de cultivo.

Tabla 3.20 Prueba chi cuadrado para la presencia/ausencia de brote con respecto a la concentración de ANA.

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	3,76	2	0,1523

3.3.3.2 Número de entrenudos

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la concentración de BAP, la concentración de ANA y la variable número de entrenudos, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla C.1.31), donde se tiene que de 23 explantes, 15 de ellos no presentaron entrenudos, 4 explantes presentaron un entrenudo, 2 brotes desarrollaron dos entrenudos, y 2 brotes presentaron tres entrenudos, no hubo explantes que presenten 4 o más entrenudos (Figura 3.39).

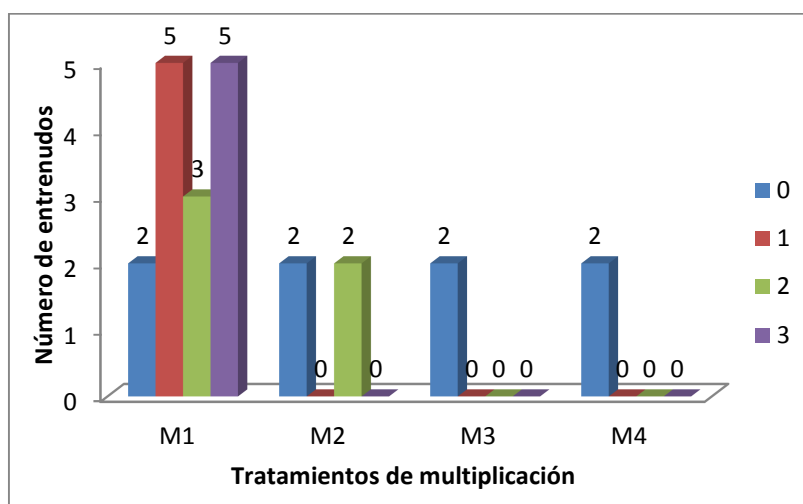


Figura 3.39 Gráfico del número de entrenudos con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.

b) Análisis inferencial

De acuerdo al ADEVA se encontró un valor ($p = 0.15\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha = 5\%$), para el efecto de la concentración de la hormona BAP, por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que la concentración 0 mg L^{-1} forman parte del grupo B y las

concentraciones 0,5 mg L⁻¹ y 1 mg L⁻¹ está en el grupo A, es decir que se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de BAP aplicadas, considerando la variable número de entrenudos (Tabla C.1.32).

Con respecto a la concentración de la hormona ANA, el ADEVA mostró un valor ($p=0.21\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que la concentración 0 mg L⁻¹ forman parte del grupo B y las concentraciones 0,05 mg L⁻¹ y 0,1 mg L⁻¹ está en el grupo A, es decir que se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA considerando la variable número de entrenudos (Tabla C.1.33).

El análisis de varianza (ADEVA) para la interacción de hormonas BAP y ANA, mostró un valor ($p=0,54\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos donde se observa que el tratamiento M1 forma parte del grupo B, mientras que los tratamientos M2, M3 y M4 pertenecen al grupo A; es decir que se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de BAP y ANA considerando la variable número de entrenudos (Tabla C.1.34).

3.3.3.3 Longitud de los brotes

a) Análisis exploratorio de datos

Para el análisis de la variable longitud de los brotes, se categorizó los datos en 4 niveles: el nivel uno que comprende los brotes de 0 a 0,5 cm; el nivel dos con brotes de 0,5 a 1 cm, el nivel tres incluye brotes de 1 a 1,5 cm y el nivel cuatro que está formado por los brotes de tamaño entre 1,5 a 2 cm.

La relación entre la concentración de BAP, la concentración de ANA y la longitud de los brotes, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla C.1.35), donde se tiene que 9 brotes pertenecen al nivel uno, 19 brotes al nivel dos y 4 brotes pertenecen al nivel cuatro de longitud. El tratamiento M1 presenta la mayor cantidad de brotes de nivel cuatro es decir brotes con mayor longitud, mientras que el tratamiento M2 presenta la menor cantidad de brotes de corta longitud (Figura 3.40).

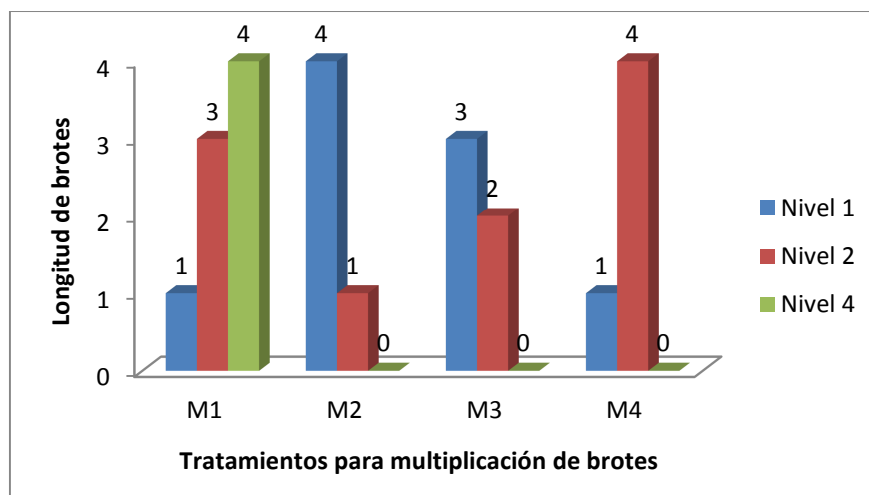


Figura 3.40 Gráfico de la longitud de brotes con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.

b) Análisis inferencial

De acuerdo al análisis de varianza (ADEVA), se encontró un valor ($p=0.46\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), para el efecto de la concentración de la hormona BAP, por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que las concentración 0 mg L⁻¹ forma parte de un solo grupo, el grupo B, mientras que las concentraciones 0,5 mg L⁻¹ y 1 mg L⁻¹ pertenece al grupo A, es decir que se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de BAP aplicadas considerando la variable longitud (Tabla C.1.36).

Con respecto a la concentración de la hormona ANA, el análisis de varianza (ADEVA), mostró un valor ($p=0.33\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que las concentración 0 mg L⁻¹ forma parte de un solo grupo, el grupo B, mientras que las concentraciones 0,05 mg L⁻¹ y 0.1 mg L⁻¹ pertenece al grupo A, es decir que se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA considerando la variable longitud (Tabla C.1.37).

El análisis de varianza (ADEVA) para la interacción de hormonas BAP Y ANA, mostró un valor ($p=0.84\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, donde se observa que el tratamiento M1 forma parte de un solo grupo, el grupo B, mientras que los tratamientos M2, M3 y M4 forman parte del grupo A, es decir que se evidencia

que existen diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de BAP y ANA aplicadas, considerando la variable longitud de brotes (Tabla C.1.38).

3.3.3.4 Vigorosidad de los brotes

a) Análisis exploratorio de datos

Para analizar la relación de los factores aplicados (concentración de BAP y concentración de ANA) y la variable vigorosidad se realizó una tabla de contingencia (Tabla C.1.39), la cual nos permite evidenciar la relación que existe, así se tiene que los cuatro tratamientos aplicados contribuyen al desarrollo de brotes vigorosos, el tratamiento M1 es que el mayor cantidad de brotes vigorosos genera (Figura 3.41).

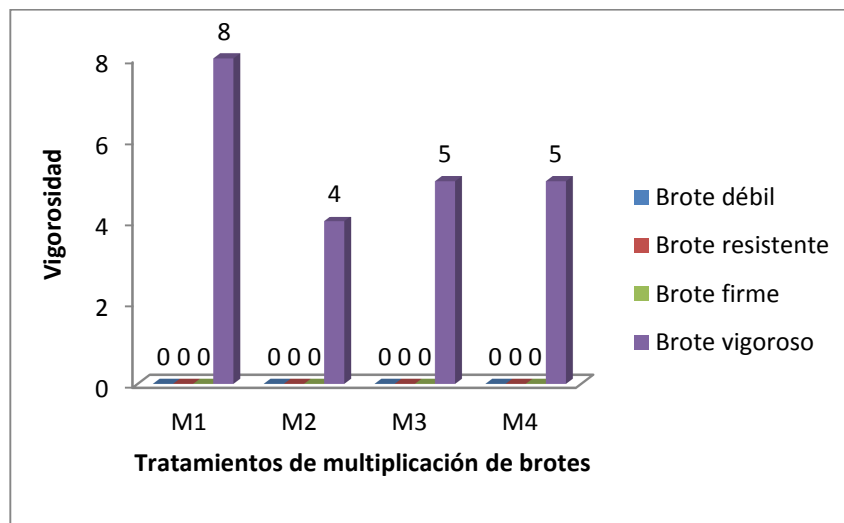


Figura 3.41 Gráfico de la vigorosidad con respecto a la interacción hormonal de ANA y BAP.

b) Análisis inferencial

La figura 3.41 evidencia que no existe diferencia entre tratamientos para la vigorosidad, es decir que las medias son iguales entre si y a su vez igual a la media global, por tanto podemos concluir que el efecto de los tratamientos es igual a cero, razón por la cual no aplica realizar un análisis de varianza (ADEVA) para esta variable.

3.4 Etapa de enraizamiento

3.4.1 Alargamiento de brotes usando ácido giberélico (GA_3)

En esta etapa se utilizó GA_3 en concentraciones 1, 2 y 3 mgL^{-1} para medir la respuesta de crecimiento, es decir la longitud de los brotes, sin embargo esta fitohormona no tuvo ningún efecto sobre los brotes, es decir que no existe un efecto significativo.

3.4.2 Enraizamiento en medio de cultivo Murashige y Skoog (M&S)

En esta etapa se realizó la siembra de los explantes en un medio M&S suplementado con diferentes concentraciones de ANA para ver su efecto sobre el enraizamiento de la plántula, se midieron como variables la longitud del brotes, el nivel de enraizamiento y el tiempo de enraizamiento.

3.4.2.1 Longitud de brotes

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la concentración ANA y el tipo de medio con la longitud de los brotes, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.1), donde se tiene que 7 brotes pertenecen al nivel uno, 14 brotes al nivel

dos, 3 brotes en el nivel tres y 1 brotes pertenecen al nivel cuatro de longitud. El tratamiento MS0 presenta la mayor cantidad de brotes de nivel cuatro, es decir brotes con mayor longitud (Figura 3.42).

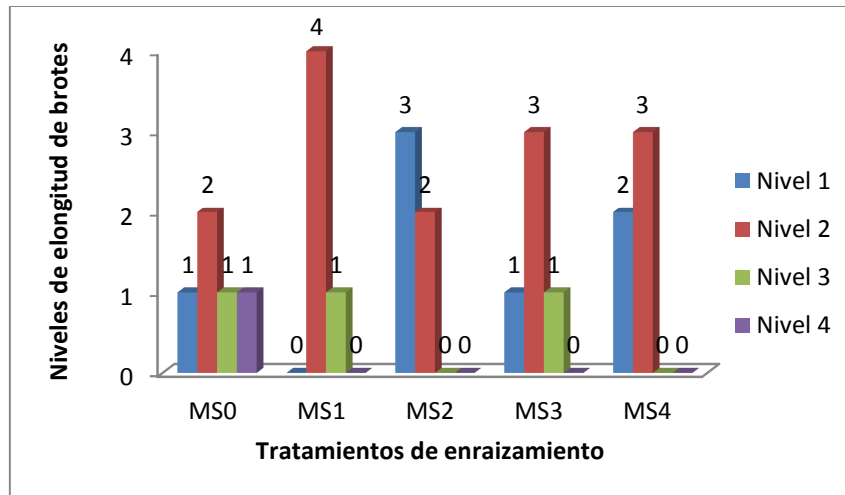


Figura 3.42 Gráfico de longitud de brotes con respecto a la concentración de ANA en medio M&S

b) Análisis inferencial

Con respecto a la concentración de la hormona ANA, el ADEVA, mostró un valor ($p=20,01\%$), mayor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, no existe la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, la concentración 0 mgL^{-1} pertenece al grupo B, la concentración $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ al grupo A, mientras que las concentraciones $0,1 \text{ mgL}^{-1}$, 1 mgL^{-1} y $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ al grupo A y B, es decir que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA aplicadas, esta contradicción se debe a que la prueba de comparaciones utilizada, no es una prueba exigente en cuanto a la categorización, sin embargo es suficiente cuando se realizan ensayos a nivel de laboratorio (Tabla D.1.2).

3.4.2.2 Nivel de enraizamiento

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la concentración de ANA, y el tipo de medio con la longitud de los brotes, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.3), donde se tiene que 17 brotes pertenecen al nivel cero, es decir que no genero raicillas, 5 brotes al nivel uno y 3 brotes pertenecen al nivel dos de enraizamiento. El tratamiento MS0 presentó la mayor cantidad de plántula con raíces largas (Figura 3.43).

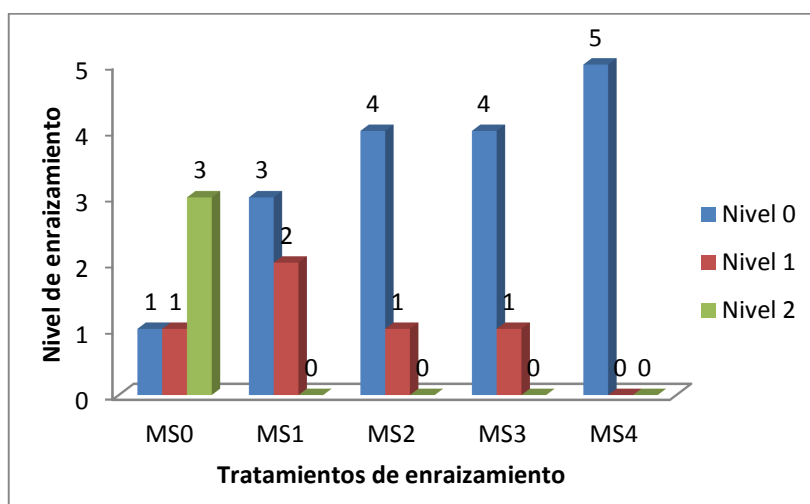


Figura 3.43 Gráfico del nivel de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA en el medio M&S.

b) Análisis inferencial

Con respecto a la concentración de la hormona ANA, el análisis de varianza (ADEVA), mostró un valor ($p=0,52\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, en el dominio estudiado, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, en los que la concentración 0 mg L^{-1} pertenece al grupo B, mientras que las concentraciones

0,1 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ y 1,5 mg L⁻¹ pertenecen al grupo A, es decir que se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA aplicadas en el medio M&S, considerando la variable nivel de enraizamiento (Tabla D.1.4).

3.4.2.3 Tiempo de enraizamiento

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre el tipo de medio de cultivo y el tiempo que tardan las plántulas en generar raíces, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.5) donde se tiene que 1 plántula presentaron su primera raicilla en un período de 1-10 días, 7 plántulas en el período de 20-30 días y 17 en más de un mes (Figura 3.44).

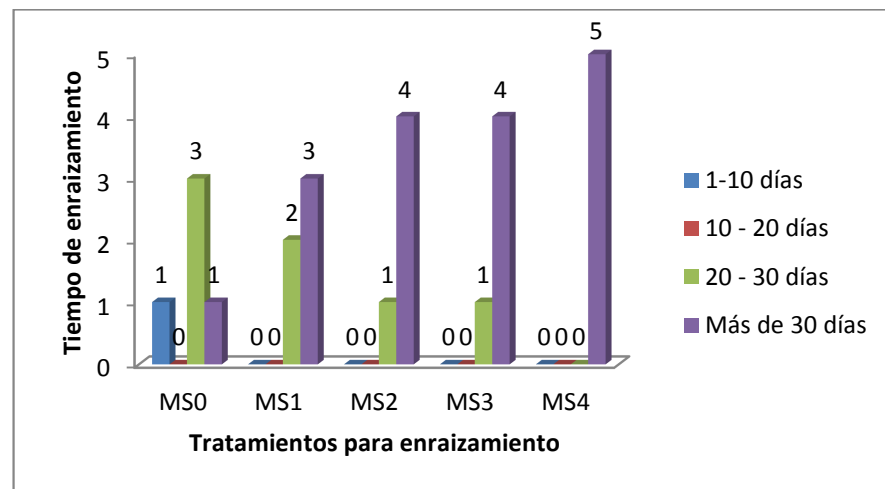


Figura 3.44 Gráfica del tiempo de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA aplicada en el medio M&S.

3.4.3 Enraizamiento en medio de cultivo B5

En esta etapa se realizó la siembra de los explantes en un medio de cultivo B5 (tiene la mitad de los nitratos del medio M&S) suplementado con diferentes

concentraciones de ANA para ver su efecto sobre el enraizamiento de la plántula, se midieron como variables las mismas que para la evaluación con el medio M&S.

3.4.3.1 Longitud de brotes

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la concentración de ANA, el tipo de medio y la longitud de los brotes, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.6), donde se tiene que 13 brotes pertenecen al nivel uno, 9 brotes al nivel dos, 1 brotes en el nivel tres y 2 brotes pertenecen al nivel cuatro de longitud. El tratamiento B51 presenta la mayor cantidad de brotes de nivel cuatro, es decir brotes con mayor longitud (Figura 3.45).

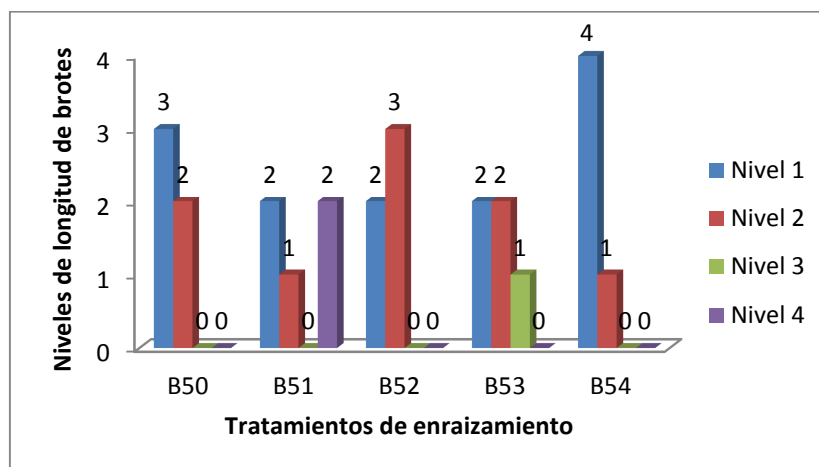


Figura 3.45 Gráfico de longitud de brotes con respecto a la concentración de ANA en medio B5.

b) Análisis inferencial

Con respecto a la concentración de la hormona ANA, el ADEVA mostró un valor ($p=27,17\%$), mayor al nivel de significación nominal de la prueba

($\alpha=5\%$), por lo tanto, no existe la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, es decir que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA aplicadas en el medio B5, considerando la variable longitud de brotes, esta contradicción se debe a que la prueba de comparaciones utilizada, no es una prueba exigente en cuanto a la categorización, sin embargo es suficiente cuando se realizan ensayos a nivel de laboratorio (Tabla D.1.7).

3.4.3.2 Nivel de enraizamiento

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la concentración de ANA, el tipo de medio y el nivel de enraizamiento, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.8), donde se tiene que 18 brotes pertenecen al nivel cero, es decir que no generaron raicillas, y 7 brotes pertenecen al nivel uno de enraizamiento (Figura 3.46).

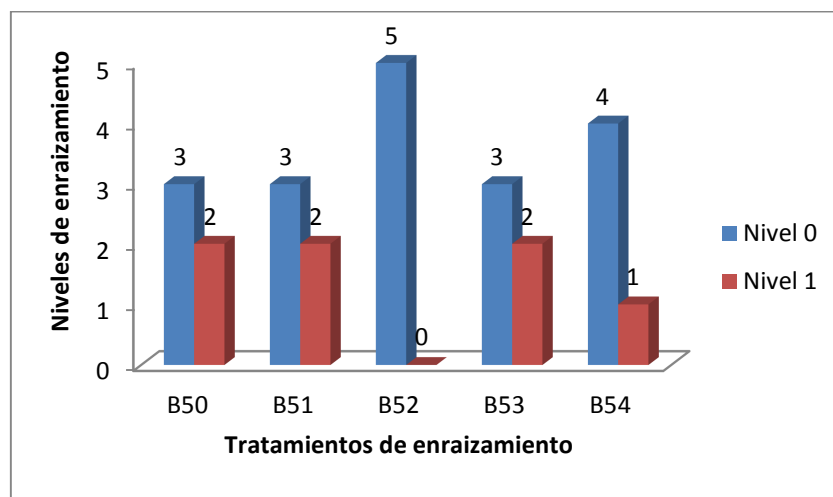


Figura 3.46 Gráfico del nivel de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA en el medio B5.

b) Análisis inferencial

Con respecto a la concentración de la hormona ANA, el ADEVA mostró un valor ($p=58,37\%$), mayor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha=5\%$), por lo tanto, no existe la suficiente evidencia muestral para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. De acuerdo a la prueba LSD de Fisher se encontró un solo grupo estadístico, el grupo A, es decir que se evidencia que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ANA aplicadas en el medio B5, considerando la variable nivel de enraizamiento (Tabla D.1.9).

3.4.3.3 Tiempo de enraizamiento

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre el tipo de medio y el tiempo que tardan las plántulas en generar raíces, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.10), donde se tiene que 7 plántulas presentaron su primera raicilla en el período de 20 - 30 días mientras que 18 tardaron más de un mes (Figura 3.47).

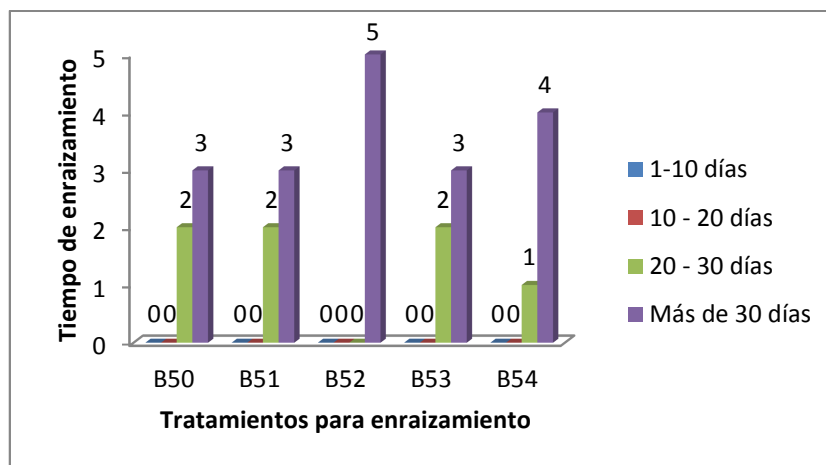


Figura 3.47 Gráfica del tiempo de enraizamiento con respecto a la concentración de ANA aplicada en el medio B5.

3.4.4 Enraizamiento con carbón activado

Se utilizó el medio M&S con carbón activado para proveer de mayor oscuridad a la zona de enraizamiento de la plántula y ver su efecto evaluando las mismas variables de longitud de brotes, nivel y tiempo de enraizamiento.

3.4.4.1 Longitud de brotes

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre el uso de carbón activado y la variable longitud, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.11), donde se tiene que 2 brotes pertenecen al nivel uno, 3 brotes al nivel dos, 2 brotes al nivel tres y 3 brotes al nivel cuatro de longitud (Figura 3.48).

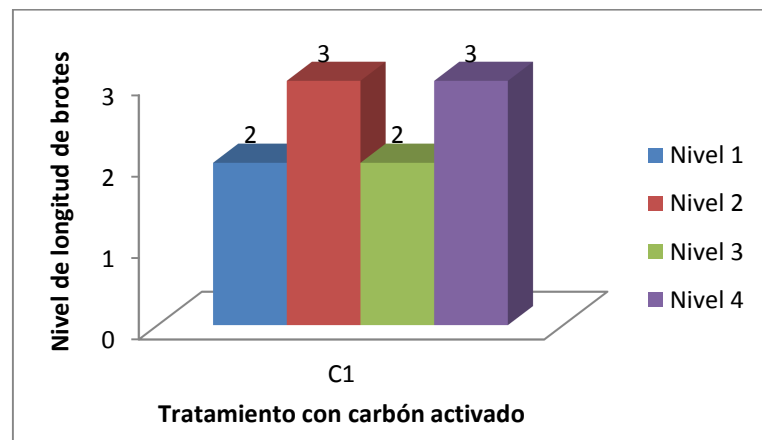


Figura 3.48 Gráfica de la longitud de brotes con respecto al uso de carbón activado en el medio de cultivo M&S

b) Análisis inferencial

En base a la figura 3.48 se realizó intervalos de confianza para inferir a nivel poblacional el tamaño promedio que alcanzan los explantes al incorporar

carbón activado en el medio de cultivo y en ausencia de hormona (ANA), la tabla 3.21 muestra con un 95% de confianza que la longitud de los brotes es significativo y que el valor mínimo alcanzado es de 2,85 cm mientras que el máximo es de 4,31 y en promedio los explantes producto del uso de este tratamiento alcanzarán una longitud de 3,58 cm.

Tabla 3.21 Intervalos de confianza para la variable longitud de brotes con el 95% de confianza.

Variable	Parámetro	Estimación	E.E.	n	LI(95%)	LS(95%)
Longitud	Media	3,58	0,32	10	2,85	4,31

3.4.4.2 Nivel de enraizamiento

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la concentración de BAP, ANA y el nivel de enraizamiento, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.12), donde se tiene que 2 brotes pertenecen al nivel cero, es decir que no generaron raicillas, 4 brotes pertenecen al nivel uno de enraizamiento, 2 brotes al nivel dos, y 1 brote para los niveles tres y cuatro (Figura 3.49).

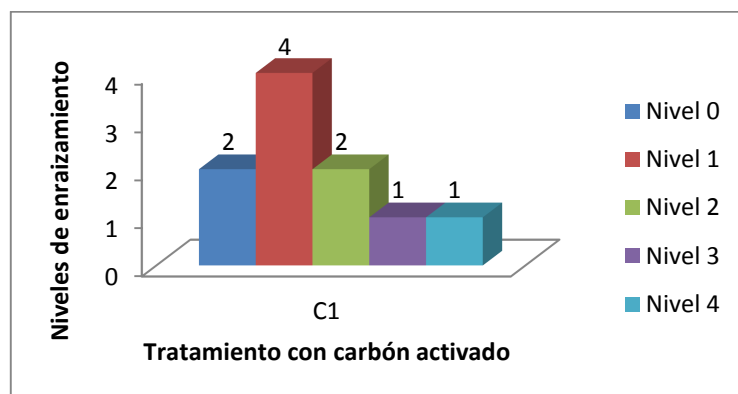


Figura 3.49 Gráfica del nivel de enraizamiento con respecto al uso de carbón activado en el medio de cultivo M&S

3.4.4.3 Tiempo de enraizamiento

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la aplicación de carbón activado y el tiempo de enraizamiento, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.13), donde se tiene que 8 plántulas tardaron un período comprendido entre 20-30 días para el aparecimiento de su primera raicilla, mientras que 2 plántulas tardaron más de un mes para este proceso (Figura 3.50).

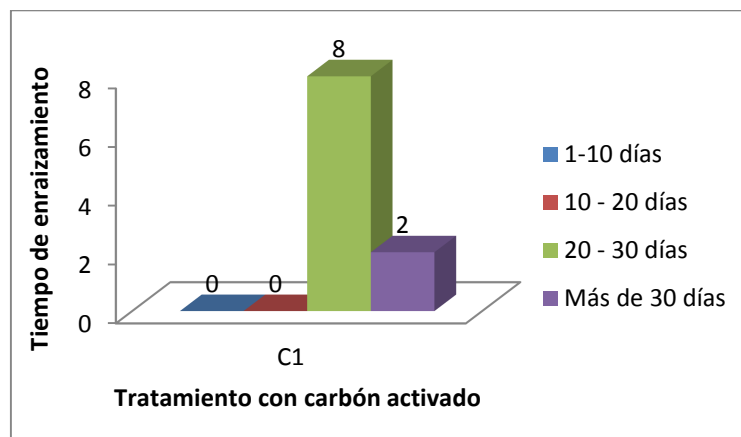


Figura 3.50 Gráfica del tiempo de enraizamiento con respecto al uso de carbón activado en el medio de cultivo M&S

3.4.5 Enraizamiento en medio líquido

Se utilizó el medio M&S líquido para proveer un mayor contacto de la zona de enraizamiento con el medio de cultivo y ver su efecto evaluando las mismas variables de longitud de brotes, nivel y tiempo de enraizamiento.

3.4.5.1 Longitud de brotes

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre el uso de medio líquido y la variable longitud de los brotes, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.14), donde se tiene que 2 brotes pertenecen al nivel uno, 5 brotes al nivel dos, 2 brotes en el nivel tres y 1 brote pertenecen al nivel cuatro de longitud. Hay una igual cantidad de brotes de nivel uno y tres (Figura 3.51).

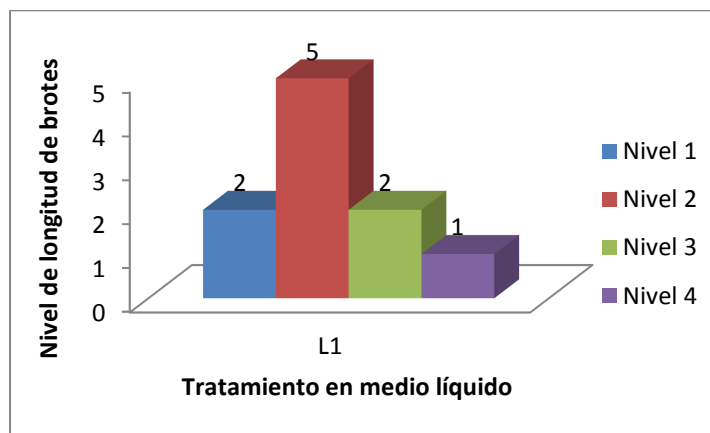


Figura 3.51 Gráfica de la longitud de brotes con respecto al uso de medio M&S líquido.

b) Análisis inferencial

En base a la figura 3.51 se realizó intervalos de confianza para inferir a nivel poblacional el tamaño promedio que alcanzan los explantes al usar medio de cultivo líquido en lugar de sólido y en ausencia de ANA, la tabla 3.22 muestra con un 95% de confianza que la longitud de los brotes es significativo y que el valor mínimo alcanzado es de 1,24 cm mientras que el máximo es de 2,06 y en promedio los explantes producto del uso de este tratamiento alcanzarán una longitud de 1,65 cm.

Tabla 3.22 Intervalos de confianza para la variable longitud de brotes con el 95% de confianza

Variable	Parámetro	Estimación	E.E.	n	LI(95%)	LS(95%)
Longitud	Media	1,65	0,18	10	1,24	2,06

3.4.5.2 Nivel de enraizamiento

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la consistencia del medio y el nivel de enraizamiento, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.15), donde se tiene que 9 brotes pertenecen al nivel cero, es decir que no generaron raicillas y 1 brote para el nivel uno, no se encontró la generación de raíces de nivel dos, tres ni cuatro, haciendo del medio líquido ineficiente para este proceso (Figura 3.52).

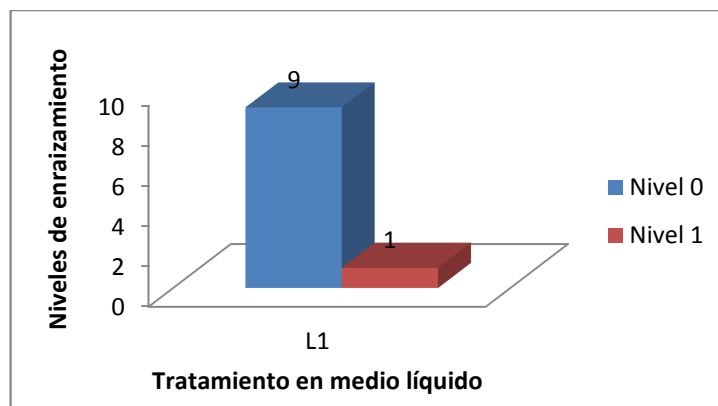


Figura 3.52 Gráfica del nivel de enraizamiento con respecto al uso de medio M&S líquido.

3.4.5.3 Tiempo de enraizamiento

a) Análisis exploratorio de datos

La relación entre la consistencia del medio de cultivo y el tiempo que tardan las plántulas en generar raíces, se realizó mediante una tabla de contingencia (Tabla D.1.16), donde se tiene que las 10 plántulas evaluadas no presentaron raicillas al cabo de un mes, tiempo en el cual se realizó la evaluación, es decir que el medio líquido resulta ineficiente para este proceso (Figura 3.53).

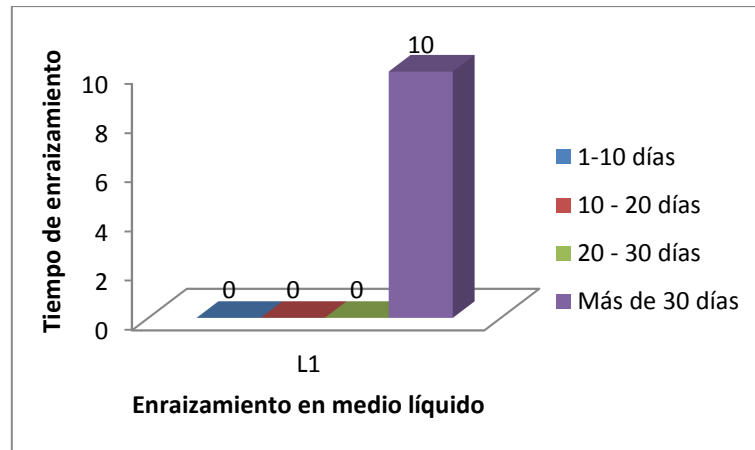


Figura 3.53 Gráfica del tiempo de enraizamiento con respecto al uso de medio M&S líquido.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Etapa de desinfección

4.1.1 Contaminación

El cultivo *in vitro* de explantes que no provienen de invernadero, conlleva un gran problema de contaminación, puesto que el contacto incontrolado con el medio ambiente las hace más susceptibles a una infección (Pierik, 1990). Según Carranza *et al.*, (1997), la utilización de sustancias químicas para la atenuación o eliminación de microorganismos constituye una herramienta fundamental dentro del proceso de desinfección (citado por Cruz, Acosta, Leiva, Alvarado y Lezcano, 2002).

La aplicación de NaClO contribuyó en gran manera en el protocolo de desinfección de los explantes, según Frazier (1981) es un esterilizante muy utilizado para procesos *in vitro* como agente antioxidante y germicida de contacto, actúa directamente oxidando o clorando las proteínas celulares de los microorganismos (citado por Toro, 2004 p. 9), estadísticamente se comprobó la existencia de una dependencia entre la contaminación y la concentración de hipoclorito de sodio aplicada en los diferentes tratamientos de desinfección, teniendo que la concentración 1.5% de NaClO es la más eficiente, porque permite obtener el mayor porcentaje de explantes no contaminados (85%) (Figura 3.2). La sinergia de este oxidante con el tween 20, complementó su acción, ya que este tensoactivo, rompe la tensión superficial y mejorar el contacto superficial entre el explante y la solución (Pierik, 1990).

Las plantas de *Valeriana scandens* utilizadas en este proyecto, colectadas en un campo abierto de la ciudad de Ambato, atravesaron por un tratamiento fitosanitario previo a la introducción *in vitro*. Tratamientos de

desinfección preliminares mostraban hasta un 90 y 100% de contaminación pero al aplicar un tratamiento fitosanitario con un fungicida sistémico y de contacto (1.5% de concentración) este se redujo considerablemente a un 10% (Figura 3.5).

Trabajos realizados por Kaur, Sood, Chander, Mahajan, Kumar & Sharma (2000), utilizan cloruro de mercurio, como esterilizantes superficial para desinfectar *Valeriana jatamansi*, sin embargo este es un compuesto muy tóxico y difícil de remover del explante (Roca y Mroginski, 1993).

El uso de alcohol al 70% antes de la inmersión en hipoclorito de sodio, es también un paso importante ya que permite la eliminación de las burbujas de aire facilitando así el contacto (Pierik, 1990).

4.1.2 Necrosis

Pedroza *et al.* (2007) sugiere que altas concentraciones de NaClO altera las condiciones fisiológicas de los explantes, generando tanto muerte como necrosis de los mismos (citado por López, Murcia, López y Valencia, 2010p. 123), sin embargo en Tabla A.2.2 se observa que la concentración 1.5%, es la que menos porcentaje de explantes necrosados presenta, a pesar de ser la concentración más alta, esto puede deberse a que la planta madre, provee de yemas vigorosas y jóvenes, que son adecuadas para el proceso *in vitro* y resisten las condiciones de desinfección, según Olmos, Luciani y Galdeano (2004), los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos, tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos.

4.1.3 Muerte

Para establecer un tratamiento de desinfección óptimo hay que evaluar la sobrevivencia del tejido, ya que el NaClO puede causar estrés fisiológico por ser un compuesto químico altamente oxidante (Pierik, 1990; Roca y Mroginski, 1993), sin embargo como se evidenció en el tratamiento 6, el cual tenía una concentración de hipoclorito de sodio del 1.5% y un tiempo de inmersión de 5 min, no se registraron porcentajes de explantes muertos, lo que nos indica que es el mejor tratamiento para la etapa de desinfección.

4.2 Etapa de inducción de brotes

4.2.1 Presencia o ausencia de brotes

El efecto de la hormona BAP, para el apareamiento de brotes es positivo ya que de los 130 explantes introducidos utilizando varias concentraciones de esta hormona, solo 7 no desarrollaron brote (Figura 3.18), lo que indica que definitivamente la adición de esta citoquinina en el medio de cultivo ayuda al desarrollo vegetal, lo que se corrobora con Sánchez & Valverde (2006) quienes nos dicen que el transporte de BAP a lo largo de la planta ocurre vía acropétala es decir desde el ápice de la raíz hasta los tallos, mediante el xilema.

La auxina ANA aplicada constituyen una hormona que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal, afectan al crecimiento del tallo, las hojas y las raíces y al desarrollo de ramas laterales y frutos, estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución (Pierik, 1990), es por ello que al igual que la hormona BAP, de los 130 explantes introducidos utilizando varias concentraciones, solo 7 no desarrollaron brote (Figura 3.19) exhibiéndose así el efecto positivo que tiene sobre esta variable.

Las interacciones de ambos reguladores de crecimiento (ANA y BAP) presentan relativamente el mismo número de brotes, es decir que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 3.20), la función más importante del BAP es la de estimular la división celular cuando actúa junto a una auxina, ambos compuestos deben estar en balance ya que una alta relación auxina/citoquinina estimula la proliferación de raíces, mientras que una baja relación auxina/citoquinina estimula la proliferación de tallos (Zeiger y Lincoln, 2007).

4.2.2 Longitud de brotes y número de entrenudos

El trabajo realizado por Kaur *et al.* (2000) en *Valeriana jatamansi*, sugiere la utilización de 1 mg L^{-1} de BAP para lograr un mayor número de brotes por explante y mayor longitud de los mismos, sin embargo para *Valeriana scandens*, se encontró que los brotes evaluados después de 30 días de su cultivo, en un medio de cultivo que no posee suplemento hormonal, presentó la mayor cantidad de brotes de nivel cuatro y la producción de un mayor número de entrenudos (Figura 3.21 y 3.22), según Roca & Mroginski (1993) existen explantes que producen la cantidad suficiente de hormona y no precisan de ninguna adición exógena para su crecimiento y desarrollo *in vitro*; son capaces de biosintetizarlo y así autoabastecerse, cuando esto sucede se dice que es autótrofa para este tipo de sustancia (Pierik, 1990).

La investigación realizada por Pérez (1998), indica que los brotes jóvenes son una rica fuente de producción de auxinas, esto hace que no sea necesaria su adición, y que al existir esta hormona endógenamente, el aumento de la misma tiene un efecto inhibitor en los explantes, esto puede explicar porque los tratamientos utilizados con una mayor concentración de auxina (1 mg L^{-1}) no proporcionó explantes largos, ni un mayor número de entrenudos.

4.2.3 Formación de callo

La composición del medio de cultivo y más aún la concentración de los reguladores del crecimiento son factores determinantes para la formación de callos y regeneración de plantas en el cultivo *in vitro*, se observó mayor formación callosa, cuando se utilizó concentraciones de ANA de 0.5 y 1 mgL⁻¹ (Figura 3.23 y Tabla B.4.1) lo que es congruente con Pierik (1990) quien sugiere que las auxinas en altas cantidades promueven la división celular, además se debe tomar en cuenta el contenido auxínico propio de la planta, desencadena aún más la formación de callo, ya que como sugieren Hartmann y Kester, (1997), las hojas y yemas son grandes productores de auxinas debido a que esta hormona se transporta en forma basipétala dentro de la planta (citado por Henríquez, 2004, p. 29).

La formación callosa es una variable muy importante a analizar en esta etapa porque impide la generación de clones de la especie en estudio, ya que la organogénesis indirecta constituye una base para obtener variación genética e inestabilidad (Roca y Mroginski, 1993).

Se debe tomar en cuenta que los medios de cultivo contenían una concentración constante de 1mg L⁻¹de brasinolida y esto influyó en la formación de callo ya que como lo manifiesta Sakurai, Fujioka, Saimoto, Bellincampi y Morpurgo (1991) las brasinolidas en combinación con las auxinas actúan sinérgicamente promoviendo un crecimiento calloso en varias especies (citado por Lozada, 2010 p. 143)

4.3 Etapa de multiplicación de brotes

4.3.1 Presencia o ausencia de brotes

La interacción hormonal en los cuatro medios de cultivo aplicados fueron eficientes para la generación de brotes, obteniéndose un 100%, esto se puede deber a que los explantes absorbieron la hormona brasinolida aplicada en la etapa anterior y esta actuó sinérgicamente con la auxina y/o citoquinina que se encontraba en el medio de cultivo.

El objetivo más importante de esta etapa es lograr una micropropagación sin perder la estabilidad genética, no se observó un 100% de producción de brotes en el tercer subcultivo, por lo que se puede pensar que en este punto la capacidad de producir nuevos brotes de los explantes estaba disminuyendo, lo que se corresponde con Pierik (1990) quien sugiere que no se realicen repicados sucesivos ya que esto aumenta la posibilidad de que se produzcan mutaciones y se reduce la capacidad de regeneración de las plantas.

4.3.2 Número de entrenudos y longitud de los brotes

En cuanto al número de entrenudos generados y la longitud de los brotes, se observó la mayor cantidad en el tratamiento M1, para los tres subcultivos, esto debido a que como se había citado anteriormente existe la presencia de auxinas endógenas, además sumado a esto tenemos el efecto de la brasinolida residual absorbida por el explante, Nassar (2004) menciona el efecto positivo que tiene el uso de brasinolida en la elongación de brotes de banano (*Musa spp. Cv. Grande*). Además Mitchel y colaboradores encontraron el mismo efecto en frijol, donde la brasinolida causó elongación de todas las partes de la plantas, incrementando la longitud del tallo, la espiga, las raíces, el peso de la vaina y la cantidad de yemas (Citado por Rossi, 2005, p. 56).

La presencia de auxina endógena en los explantes limitó el crecimiento de brotes en los tratamientos con interacciones hormonales, ya que al desconocer este hecho y agregar una interacción hormonal BAP * ANA, quizá se estaba proporcionando de una mayor cantidad de auxina que de citoquinina, lo que ocasiona un inconveniente, debido a que en esta etapa es importante contar con una mayor concentración de citoquinina, porque estas inhiben la dominancia apical, permitiendo el desarrollo de brotes laterales (Pierik, 1990).

4.3.3 Vigorosidad

Esta variable es muy importante para evaluar la viabilidad de los explantes tanto después de la desinfección como de los subcultivos, ya que a más de estar vivos deben tener la capacidad de desarrollarse en condiciones *in vitro*.

Tanto el uso de BAP, ANA como las diferentes interacciones hormonales ANA*BAP fueron buenas para la sobrevivencia y viabilidad de los explantes como se evidencia en las figuras 3.29 3.35, 3.41 del primer, segundo y tercer subcultivo respectivamente, los explantes desarrollaron brotes vigorosos que permitieron continuar con el proceso de enraizamiento.

4.4 Etapa de enraizamiento

4.4.1 Alargamiento de brotes usando ácido giberélico (GA₃)

El ácido giberélico, es una giberelina, cuya función es la de inducir la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro*, a pesar de esto, los explantes sometidos a un tratamiento con este regulador de crecimiento, no mostraron ningún cambio en relación a su fisiología, lo que puede deberse a que este compuesto es altamente termolábil, se pierde el 90% de su actividad biológica, después del autoclavado; a pesar

de que los medios de cultivo se realizaron añadiendo ese componente cuando el medio estuvo a una temperatura baja, quizás no fue la adecuada y se perdió su capacidad.

Otra razón por la que no se vio ningún efecto en los explantes puede deberse a que en la mayoría de cultivos los niveles de GA₃ superiores a 1 mg L⁻¹ son tóxicos (Blakely, 1963) (citado por Roca y Mroginski, 1993 p. 68).

4.4.2 Longitud de brotes

Los brotes exhibieron un similar nivel de longitud en todos los tratamientos, el que presentó brotes de mayor tamaño fue el MS0 que no posee ninguna concentración de auxina (Figura 3.28, 3.34 y 3.40).

La longitud de los brotes exhibida puede deberse a la acción residual de la brasinólida aplicada en la etapa de inducción de brotes, Freire y colaboradores (2005) afirman que los brasinoesteroides tienen la capacidad de promover el crecimiento mediante dos vías, aumentando la división celular e incrementando en el tamaño celular.

4.4.3 Nivel de enraizamiento y tiempo de enraizamiento

El tratamiento MS0 presentó la mayor cantidad de plántulas con raíces largas (Figura 3.43), esto es congruente con los estudios realizados por Kaur *et al* (2000) quienes demostraron que la cantidad de auxina adecuada para la rizogénesis en *Valeriana jatamansi* es de 0,75 mg L⁻¹ y con Ozean *et al* (1992) quienes observaron que el desarrollo de raíces largas se produce a bajos niveles de auxina, mientras que raíces cortas se producen cuando se incrementa la concentración de auxina (citado por Kaur *et al*, 2000 p. 228).

Con respecto al tiempo de enraizamiento se observó que la no aplicación de auxina repercute en gran manera en el rápido desarrollo de raíces, aunque se observa que una baja concentración ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ANA) también presenta rizogénesis en un período aceptable de tiempo, esto es congruente con Pierik (1990) que nos dice que el uso de una baja concentración de auxina es suficiente para la generación de raíces, mientras que si se aplica altas concentraciones se da lugar a la formación de callo y con Gaspar y Couman (1987); Gaspar y Hofinger (1988) y Hartmann *et al* (1997) quienes nos indican que las auxinas son las que presentan mayores efectos en la formación de raíces adventicias ya que las yemas son la principal fuente de auxinas endógenas y permiten la rizogénesis en ausencia de auxina exógena (citado por Oberschelp y Marcó, 2010 p. 2)

En cuanto al uso del medio de cultivo B5, se observó que el nivel máximo de enraizamiento alcanzado por los explantes fue el nivel 1 (Figura 3.46) y el tiempo para lograrlo llevo más de 30 días, es decir que este medio de cultivo no es eficiente para la rizogénesis, esto puede deberse a que la reducción de la concentración de nitratos en la composición del medio afecta a este proceso, como menciona Pierik (1990), las necesidades totales de N varían entre $12 - 60 \text{ mmol L}^{-1}$ de los cuales de $6 - 20$ son NH_4^+ y de $6 - 40$ NO_3^- y es necesario encontrar la mejor proporción $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ para alcanzar un crecimiento y desarrollo adecuado en condiciones *in vitro*.

No haber alcanzado altos niveles de enraizamiento en los distintos tratamientos, puede deberse además a que los frascos estuvieron almacenados bajo luz, lo que no ayuda al desarrollo radical, porque la luz generalmente tiene un efecto negativo sobre la formación de raíces (Pierik, 1990).

4.4.4 Utilización de carbón activado

La adición de este compuesto al medio de cultivo, se derivó en una producción de raicillas en mayor cantidad y en un tiempo considerable (20 - 30 días) además una tasa media de crecimiento mucho mayor que la que se observó en aquellos tratamientos donde no se empleó carbón activado, esto es congruente con Klein y Bopp (1971) quienes sugieren que el uso de carbón activado es una herramienta adecuada para los procesos de enraizamiento ya que provee de oscuridad al medio de cultivo, reduciendo la incidencia de luz en la zona de crecimiento activo del sistema radicular (citado por Pierik, 1990 p.81).

La figuras 3.48, 3.49 y 3.50 evidencia que el carbón activado adicionado al medio de cultivo incide de manera positiva sobre la tasa de desarrollo de las yemas de *Valeriana scandens* bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

4.4.5 Utilización de medio líquido

A pesar de que Pierik (1990), sugiere medios líquidos para facilitar el enraizamiento ya que provee de mayor aireación a los explantes, esto no aplicó a la especie estudiada en este trabajo. El reemplazo del medio sólido por uno líquido, no resultó eficiente para el proceso de enraizamiento de las plántulas, ya que este fue casi nulo, solo una de las 10 plántulas evaluadas presento raicillas y el tiempo que tardó en presentarlas fue mucho mayor a un mes, tomando en cuenta la evidencia de que la especie investigada posee auxinas endógenas y en vista de que el corte estaba en contacto de mejor manera con el medio de cultivo, se dio lugar a callogénesis en lugar de la formación de raíces.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. Una concentración de 1.5% de hipoclorito de sodio por un tiempo de 5 minutos de inmersión en el proceso de desinfección permite obtener explantes viables y libres de contaminación.
2. La aplicación de fungicida en el protocolo de desinfección durante 10 minutos de inmersión es una herramienta eficaz para eliminar microorganismos de los explantes.
3. La aplicación de un tratamiento fitosanitario en el invernadero, permitió obtener éxitos en el protocolo desinfección logrando obtener solo un 10% de contaminación.
4. En base a los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que *Valeriana scandens* es capaz de biosintetizar auxina para autoabastecerse, es decir que es autótrofa para este compuesto.
5. El medio de cultivo que no posee suplemento hormonal, presentó la mayor cantidad de brotes largos y la producción de un mayor número de entrenudos en la etapa de inducción de brotes.
6. La adición de brasinolida en la etapa de inducción de brotes permitió un mejor desarrollo de los explantes, tanto en esa etapa como en las posteriores inducidas por la acción residual de este componente.
7. Al existir auxinas endógenas, el aumento de la misma tiene un efecto inhibitor en los explantes, por lo que los tratamientos utilizados con una mayor concentración de auxina, no proporcionaron explantes largos, ni con mayor número de entrenudos.

8. La mayor longitud de brotes y número de entrenudos en los tres subcultivos de la multiplicación se logró cuando no se adicionó hormona al medio de cultivo.
9. La realización de un tercer subcultivo, en la etapa de multiplicación, disminuyó la capacidad de producción de brotes en los segmentos nodales.
10. Las altas concentraciones de ácido giberélico aplicado en la etapa previa al enraizamiento, no produjeron ningún efecto sobre el alargamiento de brotes.
11. El uso de una baja concentración de auxina exógena o en su defecto, la no adición de la misma si existe la presencia de auxina endógena, es suficiente para la generación de raíces, si se aplica altas concentraciones se da lugar a la formación de callo.
12. El medio de cultivo B5 no es eficiente para la rizogénesis, debido a la reducción de la concentración de nitratos en su composición.
13. El uso de carbón activado provee de un ambiente de oscuridad al medio de cultivo, aumentando en gran manera la generación de raíces.
14. El uso de medio líquido en la etapa de enraizamiento dio lugar a callogénesis de en lugar de rizogénesis.
15. Se rechaza la hipótesis planteada al inicio de este trabajo, la misma que afirmaba que la aplicación de reguladores de crecimiento ANA, BAP y GA3 en las etapas de inducción, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Valeriana scandens* tiene un efecto positivo en la regeneración de plantas.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

1. Utilizar plantas jóvenes para iniciar con los procesos *in vitro* ya que estos tienen una mayor capacidad de regeneración que las plantas adultas.
2. Probar la utilización de otro componente para el alargamiento de tallos en la etapa previa al enraizamiento como la zeatina o el 2-iP.
3. Utilizar una auxina débil como el AIA o en su defecto una combinación de auxinas (IBA y ANA) en las etapas de inducción, multiplicación y enraizamiento para ver su respuesta *in vitro*.
4. Realizar más repeticiones en las diferentes etapas a fin de poder inferir los resultados obtenidos a nivel poblacional.
5. Continuar con la investigación, analizando más especies de esta familia, ya que este trabajo constituye una premisa para posteriormente crear bancos de germoplasma que permitan realizar estudios de genética poblacional e iniciar procesos de ingeniería genética.
6. Evaluar el comportamiento de los explantes después del tercer subcultivo y de ser necesario añadir suplemento hormonal al medio de cultivo, de manera que se mantenga su capacidad de regeneración.
7. Realizar análisis de modelos de regresión logístico binomial y multinomial, según corresponda, para los datos obtenidos.
8. Mantener las condiciones ambientales lo más uniformes posibles ya que estas influyen sobre el comportamiento tanto de los componentes del medio de cultivo, como de los explantes.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelnour-Esquivel A. y Vincent J. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Biblioteca Orton IICA/CATIE. Extraído 25 de mayo, 2010, de <http://books.google.com.ec/books?id=T9QOAQAIAAJ&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
2. Adam G. (1998). Recent progress in chemistry, biochemistry and application of brassinosteroids. Institute of Plant Biochemistry. Halle, Alemania. York meeting: brassinosteroids and gibberellins. Extraído el 12 de agosto, 2009 de http://192.129.24.144/licensed_materials/00898/free/meeting/york98/p08.pdf
3. Barrie F. (1989). Neotypification of *Valeriana scandens* L. (Valerianaceae). International Association for Plant Taxonomy (IAPT) Stable. [Electronic Version]. Extraído el 25 de mayo, 2010 de <http://www.jstor.org/stable/1220864>
4. Conicet. (2004). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina, Extraído el 25 de mayo, 2010 de <http://www.criba.edu.ar/agronomia/carreras/otras/materias/555/archivos/hormonas-fotosintesis-crecimiento-nutricion.pdf>

5. Contreras P., Faini F., y Rojas M. (2001). Obtención y separación de giberelinas lactónicas producidas por el hongo *Gibberella fujikuroi* para usarlas como estándares cromatográficos. Boletín de la Sociedad Chilena de Química. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0366-16442001000200014&script=sci_arttext
6. Choe, S. (2010). Brasinosteroid Biosíntesis and Metabolism. P. Davies (Edt.). Plan Hormones (pp.156-178)). Holanda: Springer Hetherlands
7. David D. y Vergara G. (2009). Utilización de Giberelinas en explantes vegetales. Seminario de Crecimiento y Desarrollo. Chile. <http://es.scribd.com/doc/35592184/Giberelinas>
8. Duarte-Silva E., Vanzela A. & Mariath J. (2009). Developmental and cytogenetic analyses of pollen sterility in *Valeriana scandens* L. Sexual Plant Reproduction, [Electronic Version], 23, Extraído el 19 de mayo, 2010, de www.springerlink.com/index/8vvp130235328574.pdf
9. Estopá M. (2005). El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. Extraído el 25 de mayo, 2010, de http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_hortint/hortint_2005_E_50_57.pdf
10. Fonnegra R. y Jiménez S. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. Segunda edición. Extraído

el 19 de mayo, 2010 de http://books.google.com.ec/books?id=K8el-7ZeFpsC&pg=PA257&lpg=PA257&dq=valeriana+scandens&source=bl&ots=6By2watQat&sig=wFjn_C1ai5atF4MrGwBTOWP6370&hl=es&ei=KOfxS9TdBMH78Ab5qNjnDQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=7&ved=0CDUQ6AEwBg#v=onepage&q=valeriana%20scandens&f=false

11. Fujioka S. & Sakurai A. (1997). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiologia Plantarum*, 100, 710 – 715
12. Fujioka S. & Yokota T. (2003). Biosíntesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 137-164
13. Houghton P. (1996). *Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profile: Chapter 1. An introduction to Valerian*. King's College London. Extraído el 25 de mayo, 2010 de http://www.dweckdata.com/Published_papers/Valerianaceae.pdf
14. Iglesias M., Leliebre V., Pérez C., y Coll F. (1997) Síntesis de Espirobrasinoesteroides análogos de la 6-desoxocastasterona. Habana-Cuba.
http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1997/vol20n4/v20_n4_03.pdf
15. Intermedicina (2003). Valeriana: evidencia sobre su uso en el tratamiento del insomnio. *Avances Médicos*. Extraído el 25 de mayo,

2010

de

http://www.intermedicina.com/Avances/Interes_General/AIG24.pdf

16. Kurina M. (2009) Reguladores de crecimiento. Universidad Nacional de San Luis Argentina.). [.unsl.edu.ar/download.php?id=745](http://www.unsl.edu.ar/download.php?id=745)
17. Mendenhall, W., Sincich, T. (1997), Probabilidad y estadística para Ingeniería y Ciencias, (4a Ed.). Prentice Hall.
18. Meyer F. (1951). Valeriana in North America and the West Indies (Valerianaceae). Annals of the Missouri Botanical Garden. [Electronic Version], 38, 377-503 Extraído el 25 de mayo, 2010, de <http://www.jstor.org/pss/2394571>
19. Mok, D.W.S. y Mok, M.C. (2001). «Cytokinin Metabolism and Action». Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52. ISSN, pp. 89-118.
20. Moran M., Caho M. (2003). Micropropagación, cultivo de células tejidos y órganos vegetales in vitro. Universidad de Salamanca, Revista Agricultura. http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Agri/Agri_1997_783_804_811.pdf

21. Morgan W. (2000). Cultivo de tejido vegetal. International Plant Laboratories. Extraído el 25 de mayo, 2010, de <http://www.criba.edu.ar/agronomia/carreras/ia/archivos/Materias/563/Apuntes/CultivoTejidosMorgan.pdf>
22. Pérez J. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Volumen 1. Villa Clara-Cuba
23. Pierik, R. (1990), Cultivo in vitro de las plantas superiores (L. M. S, Ayerbe, Trad.). España: Mundi-Prensa.
24. Piñeros A., Herreño N. y Pombo L. (2005). Análisis farmacognóstico y cromatográfico comparativo del contenido de valepotriatos y ácidos valerénicos entre *Valeriana officinalis* L. y *Valeriana pavonii* Poepp. & Endl. para establecer parámetros de calidad en la elaboración de fitoterapéuticos. Extraído el 19 de mayo, 2010, de <http://www.labfarve.com/tienda/pdf/Valeriana.pdf>
25. Raven Peter, Evert Ray, Eichhorn Susan (1992). Biología de las plantas. Reverte Editorial. Volumen 2
26. Rivera J. (2007). Guía del Patrimonio de Áreas Naturales Protegidas del Ecuador: Región Sierra: Parque Nacional Cajas. ECOLAP y MAE.

[Versión electrónica] Extraído el 7 de junio, 2010, de
www.ambiente.gov.ec/paginas_espanol/.../23-SS-PN%20Cajas.pdf

27. Roca W. & Mroginski L. (1993) Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Colombia: CIAT (Centro de Internacional de Agricultura Tropical)
28. Rossi L. (2005). Hormonas vegetales: desarrollo y crecimiento: brasinoesteroides (63p). Curso de Fisiología Vegetal, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía. Extraído el 189
29. Rzedowski J. y Rzedowski G. (2003). Valerianaceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 113. Instituto de Ecología, Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán.
30. Sabit. Servicios Agrobiotecnológicos. (2006) Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Quito: Laboratorio de Biotecnología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador. Módulo 2.
31. Salazar M., Concha R., y Ruiz P. (2009). Tratado de Psicofarmacología. Bases y aplicación clínica. 2a edición. Ed. Médica Panamericana.
32. Sánchez A. & Valverde R. (2006). Evaluación del proceso de multiplicación asexual de estacas de aliso (*Alnus acuminata*), utilizando

cuatro sustratos y tres hormonas en el Laguacoto I, provincia Bolívar.

<http://www.biblioteca.ueb.edu.ec/bitstream/15001/190/1/0047.Agro.pdf>

33. Zeiger E., y Lincoln Taiz (2007). Fisiología vegetal. Universitat Jaume I.

Tercera edición. Volumen 2 p. 967