

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA  
GERMINACIÓN *in vitro* e INDUCCIÓN A CALLO  
EMBRIOGÉNICO DE CEDRO (*Cedrela montana*) A  
PARTIR DE EMBRIONES ZIGÓTICOS.**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DE TÍTULO DE:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**ANA LUCÍA SANTAMARIA JIMÉNEZ**

**Sangolguí, 14 de Junio 2012**

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR:**

---

**ANA LUCÍA SANTAMARIA JIMÉNEZ**

**DIRECTORA DE LA CARRERA EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

---

**Ing. Grace Tatiana Páez. M. C**

**SECRETARIO ACADÉMICO**

---

**AB. Carlos Orozco**

**Sangolguí, 14 de Junio 2012**

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Sra. Ana Lucia Santamaria Jiménez como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

**Sangolquí, 14 de Junio del 2012**

---

**DIRECTORA**

**Ing. Tatiana Páez. M. C**

---

**COORDIRECTOR**

**Ing. Norman Soria. M. Sc**

# DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

**Ana Lucía Santamaria Jiménez**

## **Declaro que:**

El proyecto de grado denominado **ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA GERMINACIÓN *in vitro* e INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO DE CEDRO (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz) A PARTIR DE EMBRIONES ZIGÓTICOS**, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

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

Sangolquí, 14 de Junio 2012.

**ANA LUCÍA SANTAMARIA JIMÉNEZ**

## AUTORIZACIÓN

Yo, Ana Lucía Santamaria Jiménez

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA GERMINACIÓN *in vitro* e INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO DE CEDRO (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz) A PARTIR DE EMBRIONES ZIGÓTICOS**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolguí, 14 de Junio 2012

**ANA LUCÍA SANTAMARIA JIMÉNEZ**

## **DEDICATORIA**

A Gloria Jiménez y a Eduardo Santamaria, mis amados padres,  
quienes con su ejemplo de lucha, tenacidad y su gran amor,  
me han permitido culminar mi sueño.

**Ana Lucía Santamaria Jiménez.**

## AGRADECIMIENTO

“Cuanto mayor sea el esfuerzo, mayor es la gloria”. *Pierre Corneille*

No hay palabras que puedan describir mi profundo agradecimiento hacia mis amados Padres, quienes durante todos estos años han luchado constantemente, éste no es solo mi sueño es de ustedes Gloria Jiménez y Eduardo Santamaria ya que con toda su dedicación han sacado a sus tres hijos, lo único que quiero decirles en este momento es gracias por inculcarme todos esos grandes valores como la perseverancia, honestidad y la responsabilidad, entre otros, son los mejores padres que Dios me pudo haber dado.

A mi hermana Ritha, quien a lo largo de mi vida universitaria ha sido mi mejor amiga y mi confidente.

A mi amado esposo Edison, gracias por estar en todo momento conmigo siendo mi fuerza.

A mi pequeña Lucianita, tú estuviste conmigo desde que empezaste a crecer en mi vientre, fuiste mi motor para no fallar y no darme por vencida en mis momentos de debilidad.

A mis amigos Gabriela Ortega y Juan Jácome les agradezco muchísimo porque estuvieron conmigo viviendo y compartiendo buenos y malos momentos en el laboratorio, gracias por toda su ayuda y por hacer del laboratorio un gran lugar para trabajar.

A mis queridos profesores Ing. Norman Soria e Ing. Tatiana Páez, mil gracias, por ser unos grandes maestros, ya que me han dado las bases para mi futuro como profesional y grandes valores como la honestidad y la responsabilidad.

A Andrea, quien con todo su apoyo y conocimientos me ayudó con la parte experimental de la tesis.

Al Ing. Cristian Reyes, le agradezco por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de la EPMOP-Q, gracias por ayudarme a crecer en la parte laboral y darme este gran desafío.

A todos ustedes, gracias, sin ustedes no hubiese culminado mi meta.

**Ana Lucía Santamaria Jiménez**



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	3
1.3 OBJETIVOS .....	4
1.3.1 OBJETIVO GENERAL .....	4
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.4 MARCO TEÓRICO .....	5
1.4.1 Generalidades de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz.....	6
1.4.2 Taxonomía .....	8
1.4.3 Semilla .....	10
1.4.4 Germinación.....	14
1.4.5 Cultivo <i>in vitro</i> .....	18
1.4.6 Fitohormonas .....	24
1.5 HIPÓTESIS .....	28
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....	29
2.2 MATERIAL VEGETAL .....	29
2.3 PRE-GERMINACIÓN .....	30
2.4 ETAPA DE PRE- ENSAYOS DEL MATERIAL VEGETAL.....	31
2.5 ETAPA DE DESINFECCIÓN.....	33
2.6 ETAPA DE GERMINACIÓN .....	36
2.7 ETAPA DE INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO .....	40

2.7.1	Método de comprobación.....	43
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....		45
3.1	ETAPA DE DESINFECCIÓN.....	45
3.1.1	Porcentaje de Contaminación y Necrosis .....	46
3.2	ETAPA DE GERMINACIÓN .....	50
3.2.1	Análisis del mejor tratamiento para la germinación de los embriones maduros de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz.....	50
3.2.2	Cálculo de energía germinativa y porcentajes de germinación.....	61
3.3	ETAPA DE INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO .....	64
3.3.1	Porcentaje de Callo embriogénico. ....	73
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....		75
4.1	ETAPA DE DESINFECCIÓN.....	75
4.2	ETAPA DE GERMINACIÓN .....	78
4.3	ETAPA DE INDUCCIÓN A CALLO.....	81
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....		85
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....		87
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....		88

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1.-Tres concentraciones de hipoclorito de sodio 5.5%(v/v), para el proceso de desinfección de semillas maduras de cedro andino ( <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz).....	33
Tabla 2.2.-Tres concentraciones de peróxido de hidrógeno, para el proceso de desinfección de semillas maduras de cedro andino ( <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz) .....	35
Tabla 2.3.- Tres concentraciones ácido giberélico en medio básicos de Murashige y Skoog (MS), para la germinación de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz.....	38
Tabla 2.4.-Tres concentraciones de brasinolida en medio de Murashige y Skoog (MS), para la germinación de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz..	38
Tabla 2.5.-Medio de Murashige y Skoog (MS), suplementado con agua de coco en diferentes concentraciones, para la germinación <i>in vitro</i> de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz.....	38
Tabla 2.6.- Tres concentraciones 2,4-D (ácido 2,4-dichlorofenoxiacético) en medio MS, para la formación de callo embriogénico de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz. ....	41
Tabla 2.7.-Tres concentraciones ANA (ácido naftalenacético) en medio MS para la formación de Callo embriogénico de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz.....	42

Tabla 2.8.- Tres concentraciones de ácido 2,4-dichlorofenoxiacético y ANA en medio MS para la formación de Callo embriogénico de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz. ....	42
Tabla 3.1.- Análisis de Varianza ANOVA, para el mejor tratamiento de desinfección.....	45
Tabla 3.2.- Tabla Contingencia o medidas simétricas para las variables cualitativas Tratamiento vs contaminación. ....	46
Tabla 3.3.- Tabla de contingencia a los 15 días de establecido la desinfección de embriones maduros de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz. ....	47
Tabla 3.4.- Tabla de contingencia a los 30 días de establecido la desinfección de embriones maduros de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz. ....	48
Tabla 3.5.- Porcentaje de contaminación y necrosis a los 30 días de establecido el protocolo de desinfección. ....	49
Tabla 3.6.- Análisis ANOVA con respecto a la presencia de radícula y cotiledón. ....	50
Tabla 3.7.- Prueba HSD de Tukey para la presencia de radícula y cotiledón. ....	51
Tabla 3.8.- Análisis ANOVA con respecto a la elongación de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz ....	53
Tabla 3.9.- Prueba de confirmación HSD Tukey para la elongación. ....	53
Tabla 3.10.- ANOVA con respeto al tamaño final con un nivel de confianza del 95%.....	55

Tabla 3.11.- Prueba Tukey para el tamaño final del embrión de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz. ....	56
Tabla 3.12.-Análisis de Varianza ANOVA para la variable número de hojas.....	57
Tabla 3.13.- Análisis HSD Tukey para la variable número de hojas. ....	58
Tabla 3.14.- Tabla de Contingencia entre variables Presencia de radícula y presencia de hojas.....	59
Tabla 3.15.- Tabla Chi- Cuadrado para la presencia de radícula Vs presencia de hojas.....	60
Tabla 3.16.- Análisis de Medias entre presencia de radícula y número de hojas.....	60
Tabla 3.17.- Porcentaje de Germinación para los embriones de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz. ....	61
Tabla 3.18.- Tasa de energía germinativa de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz.....	63
Tabla 3.19.- Análisis de Varianza ANOVA para la presencia de callo embriogénico a los 15 días.....	65
Tabla 3.20.- Análisis post hoc prueba de Tukey para la presencia de callo embriogénico.....	65
Tablas 3.21.- Análisis de Varianza ANOVA para la variable tamaño del callo. ....	67
Tabla 3.22.- Análisis HSD de Tukey para la variable tamaño de callo. ...	67
Tabla 3.23.- Análisis de variables cualitativas por de la prueba Chi cuadrado para las variables tratamiento y brillo .....	68

Tabla 3.24.- Tabla de contingencia para la variable brillo.....	69
Tabla 3.25.- Análisis de coeficiente de contingencia para la variable uniformidad.....	69
Tabla 3.26.- Tabla de contingencia para la variable uniformidad. ....	70
Tabla 3.27.- Análisis de la prueba Chi cuadrado para variable cualitativa color.....	71
Tabla 3.28.- Tabla de contingencia para la variable color. ....	71
Tabla 3.29.- Prueba Chi cuadrado para variable Callo embriogénico y color.....	72
Tabla 3.30.- Tabla de contingencia para las variables callo embriogénico y color.....	72
Tabla 3.31.- Porcentaje de callos embriogénicos. ....	73

## LISTADO DE CUADROS

Cuadro 3.1.- Porcentaje de contaminación y necrosis a los 30 días del proceso de desinfección de los embriones de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz.....	49
Cuadro 3.2.- Representación gráfica del mejor tratamiento con respecto a la formación de radícula y cotiledón de los embriones de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz. ....	52
Cuadro 3.3.- Representación grafica del mejor tratamiento para la elongación de los embriones de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz. ....	54
Cuadro 3.4- Representación grafica del análisis de medias para el tamaño final del proceso de germinación de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz.....	56
Cuadro 3.5.- Representación gráfica de la prueba HSD de Tukey para la variable número de hojas. ....	58
Cuadro 3.6.- Representación gráfica del porcentaje de germinación de los embriones de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz. ....	62
Cuadro 3.7.- Representación gráfica de la energía germinativa de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz a los 30 días como fecha máxima de germinación. ....	64
Cuadro 3.8.- Representación grafica de del análisis estadístico HSD de Tukey para diferenciar el mejor tratamiento. ....	66

*Cuadro 3.9.-* Representación grafica de los callos embriogénicos formados en esta etapa por medio, demostrando que el mejor tratamiento es el I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-dichlorofenoxiacético)..... 74



## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Disposición de hojas, inflorescencia y fruto de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz (Prado y Valdebenito, 2000).....	7
Figura 1.2: Estructura de la semilla de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz, en el literal (A) se puede apreciar el ala de la testa, en el literal ( B) se observa la estructura interna de la semilla, el embrión cubierto por el endospermo y en el literal (C) se observa la estructura del embrión formado por dos, Cununyacu, 2011.....	11
Figura 1.3: Germinación epigea de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz (Ligia <i>et al.</i> , 2007).....	16
Figura 1.4: Etapas de Embriogénesis somática, Facultad de Agronomía- Universidad de Republica, 2011.....	22
Figura 1.5: Procesos morfogénicos en plantas (Loyola <i>et al</i> , 2011).....	23
Figura 2.1.- Recolección de cápsulas de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz en el Parque de Cumbayá 2011. ....	30
Figura 2.2: Semillas de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz colocadas en agua para su pre germinación a temperatura ambiente, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011.....	31
Figura 2.3: Semillas de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz colocadas en hipoclorito de sodio de concentración 5.5%, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011.....	34

Figura 2.4: Semillas de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz colocadas en peróxido de hidrógeno de concentración inicial 20% v/v, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011.....	35
Figura 2.5: Extracción de embriones maduros de <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011.....	37
Figura 2.6: Proceso de Inducción a callo embriogénico en fotoperiodo de oscuridad por dos meses y a temperatura controlada de 25°C, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011.....	41
Figura 2.7.- Imagen de medición de callo, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011.....	43

## RESUMEN

Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad, ésta riqueza está constituida por bosques húmedos Montano Bajo entre otros, lugar donde se aloja *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, el cual posee ciertas características importantes para la industria maderera, es por ello que es una especie vulnerable según la organización de los trópicos a nivel mundial, ya que existe una tala indiscriminada de éste forestal, aparte de ser explotado *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, tiene otro problema en el ámbito natural ya que posee una plaga, el barrenador de las meliáceas (*Hypsipyla grandella*), el cual destroza a las plantaciones. Es por ello que la presente investigación tiene como fin, el de generar plántulas viables a nivel de laboratorio, por lo cual se ha establecido un protocolo para la Germinación *in vitro* e Inducción a callo embriogénico de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, a partir de embriones zigóticos, especie de interés para el Distrito Metropolitano de Quito. A partir de este proyecto se pudo establecer medios idóneos para la desinfección los cuales fueron T2 que contiene una concentración de 0.5% v/v de hipoclorito de sodio y T7 que corresponde al uso de peróxido de hidrógeno en concentración de 3% v/v los cuales inhibieron el crecimiento de hongos exógenos, bacterias y aún mejor evitó la necrosis de los embriones. En la etapa de germinación los mejores tratamientos estuvieron suplementados con G3 (3mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico) y G5 (2mg.L<sup>-1</sup> de brasinolida) los cuales permitieron que los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz germinen a partir de los 6 días de introducidos en el medio. Los mejores medios para la inducción a callo embriogénico fueron I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-dichlorofenoxiacético) los cuales fueron identificados por el ácido acetocarmín, protocolo descrito por Portillo (2000), el cual permite la observación de células somáticas.

## ABSTRACT

Ecuador is one of the most biodiversity countries, this wealth is made up of lower montane rain forests among others, where you stay *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, which has some important features for the timber industry, which is why it is a vulnerable species under the organization of the tropics worldwide, since there is a felling of this forest, apart from being exploited *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, has another problem in the natural environment as it has a pest, the borer of the meliaceae (*Hypsipyla grandella*), which destroys plantations. That is why this research is aimed, to generate viable seedlings in the laboratory, so it has established a protocol for *in vitro* germination and embryogenic callus induction of *Cedrela montana* Moritz ex Turcz from zygotic embryos, sort of interest to the Metropolitan District of Quito. From this project was able to establish appropriate means for disinfection were T2 which contains a concentration of 0.5% v / v sodium hypochlorite and T7 which corresponds to the use of hydrogen peroxide at a concentration of 3% v / v of which inhibited the growth of exogenous fungi, bacteria and even better prevented necrosis of the embryos. At the stage of germination the best treatments were supplemented with G3 (3mg.l<sup>-1</sup> gibberellic acid) and G5 (2mg.l<sup>-1</sup> of brassinolide) which allowed the mature embryos of *Cedrela montana* Moritz ex Turcz germinating from 6 days of introduced into the medium. The best means of inducing embryogenic callus were I3 (4mg.l<sup>-1</sup> of 2.4-dichlorofenoxiacético) which were identified by the acetocarmine acid, protocol described by Portillo (2000), which allows the observation of somatic cells.

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad del continente y del mundo. En materia de plantas, cuenta con casi 25.000 especies diferentes en las distintas regiones del país. Parte de esta riqueza constituyen sus bosques, en los cuales crecen alrededor de 5000 especies de arbóreas. Se estima que el país tiene 14.4 millones de hectáreas de tierra con uso preferentemente forestal, es decir, más del 50% del territorio nacional (Guerra, 2009).

La pérdida de biodiversidad se ha producido históricamente a casusa de los impactos provocados por la intervención humana, una de las causas más importantes en este impacto, está dada por las industrias madereras, las cuales han provocado la deforestación de bosques esto se debe a que gran parte de éstas empresas, han operado fuera de las áreas de concesiones, irrespetando áreas protegidas las mismas que no han sido reforestadas (Guerra, 2009).

La industria de la madera ecuatoriana, es reconocida a nivel internacional por la excelente calidad de las maderas destinadas al mercado externo (CORPEI, 2005).

Dentro de esta industria se ha visto que existe una explotación masiva de maderas finas y duras como: Canela (*Cinnamomum zeylanicum*), Chanul (*Sacoglottis procera*), y Eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis Dehn*). Maderas semi-duras: Laurel (*Laurus nobilis*), Seique (*Cedrelinga catenaeformis*), Cuangare (*Otoba gracilipes*) y Sande (*Brosimum utile*). Y, maderas livianas como Higuerón (*Ficus citrifolia*) y Cedro (*Cedrela montana*,) (CORPEI, 2005).

La tala indiscriminada de los forestales provoca la pérdida de los recursos hídricos en los bosques montañosos (Carrere, 1999), dentro del Distrito Metropolitano de Quito este deterioro ha provocado una amenaza ecológica, poniendo en riesgo la calidad de vida de los habitantes (MECN, 2010).

Uno de los cultivos que integran este grupo de especies impactadas por las industrias de la madera en la zona del Distrito Metropolitano es *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, el cual es un forestal de alto valor económico a nivel mundial por su madera dura y puede llegar a durar años, por lo cual en el Ecuador su explotación ha sido masiva, estadísticamente en la Provincia de Pichincha se desconoce la cantidad de árboles de cedro existentes, pero según la organización de los trópicos a nivel mundial se cataloga a *Cedrela montana* Moritz ex Turcz como una especie vulnerable. Una especie es considerada vulnerable, cuando tiene a nivel nacional, una extensión de presencia inferior a 20.000 Km<sup>2</sup>, un área de ocupación inferior a 2.000 Km<sup>2</sup>, una población de individuos maduros menor a 1000, está presente únicamente en 10 localidades y presenta una reducción obvia (observada, estimada, inferida o sospechada) en los últimos 10 años o de tres generaciones, mayor al 50% (Cárdenas *et al.*, 2007).

En la provincia de Pichincha se puede encontrar árboles de cedro en 7 zonas boscosas, dentro de ellas está: el Bosque Protector Cambugán, el cual pertenece a bosques montañosos pluviales de los Andes. Siendo una zona explotada y deforestada, en donde se han reemplazado forestales por pastos desde los 1800 m.s.n.m. cuesta abajo (MECN, 2010).

*Cedrela montana* Moritz ex Turcz, además de ser explotado para el comercio de su madera, tiene otro problema en el ámbito natural el ataque de una plaga denominada el barrenador de las meliáceas (*Hypsipyla grandella*), el cual causa una ramificación excesiva y un

crecimiento atrofiado, suele descortezar la base del tronco, lo que puede causar la muerte de los plántones (Ligia *et al.*, 2007). Un segundo factor causante de retrasos en su crecimiento, es cuando se encuentran sembrados en suelos de baja fertilidad como suelos arcillosos o encharcados (Trujillo, 2011). Además tanto las semillas como los frutos de cedro pueden presentar infecciones fúngicas que se manifiestan en forma de “*moho*” el cual es provocado por altas humedades, provocando así una pérdida extensa de semillas viables (Ligia *et al.*, 2007).

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

El cedro es uno de los árboles más majestuosos y de mayor porte en los bosques de clima frío, en cuyas ramas suelen albergar auténticos jardines de bromeliáceas, helechos y orquídeas. Sin embargo, son muchos más los que han sido talados, ya que la madera del cedro es una de las mejores materias primas, empleadas en la construcción de viviendas y en ebanistería. Posiblemente las características de la madera fueron las que impulsaron a los conquistadores españoles a denominar “cedros” a estos árboles.

El cedro, además de poseer una madera fina, es una especie de alto valor potencial, por los múltiples beneficios que brinda al ambiente, captura bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), mejora el suelo, crecen en forma natural y en diversos pisos altitudinales (Guerra, 2009).

En Ecuador su explotación ha sido masiva siendo así una especie vulnerable dentro de la zona del Distrito Metropolitano de Quito. (Cárdenas *et al.*, 2007).

Nuevas investigaciones realizadas en forestales, determinan que la germinación de la semilla y la inducción a callo embriogénico son técnicas que permiten propagar plantas superiores, y el que mejor asegura el mantenimiento o incluso el aumento de la biodiversidad, el cual cumplirá

con el plan estratégico del Plan de Gestión de la Biodiversidad del Distrito Metropolitano, cuyo objetivo general es el de fortalecer la gestión municipal para la conservación de la diversidad biológica.

Es por ello que la presente investigación al tener presente ésta problemática de la tala indiscriminada y las plagas que atacan a *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, tiene como fin, el de generar plántulas viables a nivel de laboratorio para fomentar la restauración del capital natural y regeneración de la especie, permitiendo recuperar el hábitat de muchas especies nativas de las zonas vulnerables del Distrito Metropolitano de Quito. Además de conseguir ensayos para la producción masiva en lugares exclusivos de producción de cedro para tener mayor aporte económico para el Ecuador y así evitar la tala de bosques protegidos privados y en reservas ecológicas pertenecientes al Distrito Metropolitano de Quito.

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer un protocolo para la germinación *in vitro* e Inducción a callo embriogénico de cedro andino (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz) a partir de embriones zigóticos.

#### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer un procedimiento de desinfección para obtener embriones zigóticos libres de agentes contaminantes.
2. Establecer la composición adecuada de biorreguladores para el desarrollo de la germinación *in vitro* de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.



3. Determinar la tasa y energía germinativa de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.
4. Determinar la concentración apropiada de biorreguladores para inducir a callo embriogénico a los embriones zigóticos de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.
5. Verificar mediante tinción, células embrionarias obtenidas de los callos inducidos mediante biorreguladores.

#### **1.4 MARCO TEÓRICO**

Ecuador y Perú son países ricos en especies forestales, las cuales han sido aprovechadas principalmente como material de construcción, industria y combustible. El aumento de la demanda de tierras para la agricultura y la apertura de carreteras de diferente orden han acelerado la destrucción de los bosques naturales y la explotación de especies de valor comercial. De continuar este proceso, en un futuro, se producirán: escasez de madera destinada a satisfacer la demanda nacional; y la pérdida de una fuente genética importante para el desarrollo forestal (Ordoñez *et al.*, 2004).

A nivel del Distrito Metropolitano de Quito, podemos decir que posee un paisaje heterogéneo el cual es influenciado por su ubicación en el callejón interandino, entre los ramales de la cordillera occidental y oriental de los Andes, esta ubicación ha dado lugar a la formación de varios ecosistemas con diversas composiciones boscosas. De manera general la cobertura vegetal está confirmada por páramo, bosque natural (secundario y en buen estado), mosaicos de bosques con cultivo y pastizales, pastos, cultivos de ciclo corto y matorrales secos. Los bosques naturales representan la mayor superficie del Distrito Metropolitano de Quito (17% del total del territorio del distrito), según información recolectada se estima

que en el distrito existen 2330 especies de plantas vasculares. El 11% (254) del total registrado es endémico y 122 especies están en las siguientes categorías de amenaza: **Peligro crítico, en peligro y vulnerables**, estando considerada como una planta vulnerable a cedro andino según la organización de los trópicos (MECN, 2010).

Una de las pérdidas debido a la explotación irracional de los bosques nativos es la reducción de fuentes de semillas de muchas especies forestales, lo cual dificulta su regeneración tanto natural como artificial. De todo el germoplasma que se produce anualmente en los bosques, “*las semillas son la fuente de reproducción más importante, debido a las ventajas y posibilidades de utilización que nos ofrecen*” (Ordoñez *et al.*, 2004).

Como se mencionó anteriormente las semillas, son muy importantes para los procesos de reforestación, siendo de mucha importancia la calidad de las semillas, por lo tanto si es de mala calidad, la planta y el producto final también lo serán (Ordoñez *et al.*, 2004).

#### **1.4.1 Generalidades de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz**

*Cedrela montana* Moritz ex Turcz, conocido comúnmente como cedro andino o cedro de montaña, son árboles caducifolios, que crecen en los bosques húmedo- Montano Bajo (bh-MB) entre los 1800-3200 msnm (Prado y Valdebenito, 2000), con temperaturas media entre 10° y 20°C y con precipitaciones anuales de 500 a 2000mm, los cuales llegan a medir 25 m de altura con 35 cm. de diámetro de altura al pecho (Rodríguez *et al.*, 2003).

Su corteza externa es de color pardo grisácea el cual mide entre 6 mm de espesor, corteza interna posee un color crema con olor a ajo. Hojas

alternas paripinadas éstas hojas suelen despedir un olor a cebolla cuando se las estruja con mucha fuerza (Rodríguez, *et al.*, 2003).

Inflorescencia en panícula terminal, de 20 a 25 cm de largo, pedúnculo de 3 cm de largo, raquis de 20 cm de largo, pedicelos de 5 mm de largo. Flores con cáliz verde marrón, corola crema. Fruto capsular verde parduzco (Figura 1.1), lenticelado (Borja *et al.*, 1990).

Floración y fructificación, inicia en el mes de junio extendiéndose hasta el mes de noviembre. Esta duración de fenofase se debe principalmente a que no todos los árboles de cedro florecen al mismo tiempo. El mayor pico de fructificación alcanza en la estación más lluviosa del año (Ligia *et al.*, 2007).

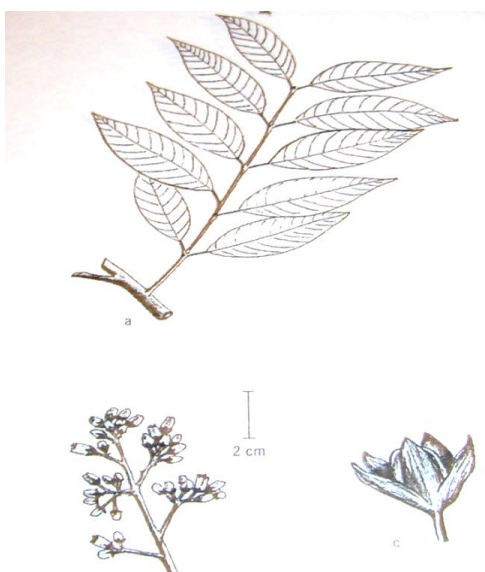


Figura 1.1: Disposición de hojas, inflorescencia y fruto de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz (Prado y Valdebenito, 2000).

### 1.4.2 Taxonomía

**NOMBRE CIENTÍFICO** : *Cedrela montana* Moritz ex Turcz

**NOMBRE COMÚN** : cedro, cedro andino, cedrillo, cedro de montaña, cedro blanco.

Borja y Lasso en 1990, describen al Cedro en la siguiente Taxonomía:

REINO	Plantae
DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Sapindales
FAMILIA	Meliaceae
GENERO	<i>Cedrela</i>
ESPECIE	<i>montana</i>

#### 1.4.2.1 Ubicación de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz en el Distrito Metropolitano de Quito

En la provincia de Pichincha se lo puede ubicar en siete áreas protegidas dentro de las cuales, el más representativo en porcentaje de áreas cultivadas de Cedro es el Bosque Protector Cambugán, el cual se encuentra conformado por 42% de especies arbóreas, dentro de las cuales podemos describir a las siguientes especies: Aguacatillo (*Nectandra* sp.); Ají de monte (*Chysochlamys* sp.); Aliso (*Alnus ferruginea*); Arrayán rojo (*Escallonia micrantha*); Canelo amarillo (*Licaria limbosa*); Canelo blanco (*Ocotea cernua*); Canelo negro (*Licaria limbosa*); Cascarillo (*Cinchona mycrophylla*); Cedrillo (*Guarea rugea*); Cedro (*Cedrella montana*); Chilca (*Baccharis quitoensis*); Chumbil (*Clusia alata*);

Colorado (*Mauria birringo*); Copal (*Dacryodes capularis*), entre otros (MECN, 2010).

Este bosque protector posee un riesgo, ya que cada hectárea a nivel de los 1800 m.s.n.m se encuentran explotados por los nativos, provocando el daño de la flora y fauna natural del bosque, ya que estos pobladores talan los árboles para dejar que la maleza crezca para el alimento de sus ganados (MECN, 2010), además se puede decir que esta zona no tiene datos específicos de cuantos árboles de *Cedrela montana* existentes hay en la zona, provocando un problema en la evaluación de especies en peligro de extinción.

Este forestal también se lo puede localizar a nivel de Ecuador en las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Azuay, Loja y Napo (Prado y Valdebenito, 2000).

#### **1.4.2.2 Importancia de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz**

*Cedrela montana* Moritz ex Turcz, es muy importante en los ecosistemas ya que este permite alojar una variedad de especies entre flora y fauna al ser una planta de gran tamaño, pero su principal importancia a nivel ambiental, es que este permite capturar el bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) con lo cual se mejora la calidad del aire permitiendo dar un equilibrio gaseoso en las zonas donde se encuentran plantados, este equilibrio se alcanza ya que el cedro incorpora en sus tejidos las sustancias venenosas que están flotando en el aire logrando purificarlo (Kómetter, sin año), además al tener sembríos de este forestal en los bosques permite mejorar el suelo (Guerra, 2009).

Cedro, posee la característica de ser de una madera fina y de alto valor económico, lo cual es muy importante para las industrias este tipo de recursos para generar muebles de alta durabilidad (Rodríguez *et al.*, 2003).

### **1.4.3 Semilla**

La semilla, es una unidad reproductiva compleja, se forma a partir del óvulo vegetal, generalmente después de la fertilización (Perissé, 2002).

Según Ordoñez define a la semilla, como la unidad de diseminación y de reproducción sexual de las plantas superiores, la cual está compuesta de uno o varios embriones, reservas nutritivas (albumen) y de una a varias capas protectora, originadas a partir de tegumentos del óvulo y de los tejidos de otras partes de la flor. Otro concepto define a las semillas, como el principal medio de generación de la mayoría de especies forestales. Es decir que la semilla es el germen de la vida, el principio y el fin de una serie de procesos fisiológicos que comienzan con la floración y fecundación de los óvulos y terminan con germinación de la semilla madura (Ordoñez *et al.*, 2004).

#### **1.4.3.1 Estructura de la semilla de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz**

La semilla de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, es una sámara de color café oscuro o claro (Figura 1.2), cuyas dimensiones van de 31 a 37 mm de largo por 10 a 15.5 mm de ancho (Ligia *et al.*, 2007). Son aladas, aplanadas y lisas, poseen una lámina que les sirve para ser dispersas por acción del viento y su embrión se localiza en uno de sus extremos. (Cárdenas *et al.*, 2007).



A

B

C

**Figura 1.2:** Estructura de la semilla de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, en el literal (A) se puede apreciar el ala de la testa, en el literal ( B) se observa la estructura interna de la semilla, el embrión cubierto por el endospermo y en el literal (C) se observa la estructura del embrión formado por dos, Cununyacu, 2011.

Estas semillas de cedro andino, se caracterizan por ser semillas ortodoxas<sup>1</sup>, lo cual permite mantenerlas almacenadas a temperaturas que oscilan entre  $-4^{\circ}$  y  $-5^{\circ}\text{C}$  (Cárdenas *et al.*, 2007).

Todas las semillas están rodeadas por una cubierta llamada testa, generalmente es dura y está formada por una capa interna y una externa de cutícula y, una o más capas de tejido grueso que sirve de protección (García *et al.*, 2006).

Estas características, confieren a la testa cierto grado de impermeabilidad al agua y a los gases. Ello le permite ejercer una influencia reguladora sobre el metabolismo y crecimiento de la semilla (Martínez *et al.*, 2012).

El embrión, es el origen de la raíz, hojas y tallo de la nueva planta, por lo que resulta de interés entender con más detalle su funcionamiento. Los

<sup>1</sup> Semilla ortodoxa.- Son semillas que pueden secarse y almacenarse a bajas temperaturas por largos períodos sin perder viabilidad. (Infojardín, 2011).

<sup>2</sup> Estado de vida Latente: es un estado de reposo o de desarrollo suspendido, pero capaz de volverse activo en

cotiledones frecuentemente se conocen como las hojas de las semillas o las hojas cotiledonarias, debido a que son las primeras hojas en aparecer (González *et al.*, 2000).

Durante el proceso de germinación, la primera estructura en emerger de la semilla es la raíz del embrión, llamada radícula. Esta raíz rápidamente penetra en el suelo y permite que la planta inicie a absorber agua y nutrientes (Mercedes, 2008).

Con el paso del tiempo los cotiledones disminuyen de tamaño, se van secando y finalmente se desprenden. Una vez transcurridos varios días la plántula, que antes dependía de los cotiledones para obtener su alimento, ya es una planta idónea para obtener del suelo y del sol lo que necesita para sobrevivir. Absorbe elementos del suelo y lleva a cabo la fotosíntesis activamente. En este momento ya se le considera una planta independiente y establecida. Durante éste transcurso la planta sufre una cierta cantidad de daños, como enfermedades por hongos, depredación por insectos, sequía, entre otros. La mortandad en la etapa de plántula es enorme y sólo unos cuantos individuos llegan a establecerse (Mauseth, 2003).

#### **1.4.3.2 Composición de las semillas**

La mayoría de semillas presentan distintos tipos de compuestos secundarios, cuya presencia y tipo son variables. En general se puede decir, que las proteínas que se encuentran en las semillas difieren en composición química y propiedades con respecto a las proteínas presentes en otras partes de la planta; así mismo, hay gran cantidad de lípidos, lo cual no es frecuente en otros tejidos vegetales (Loyola *et al.*, 2011).



La composición química de las semillas está determinada genéticamente, pero las cantidades relativas pueden variar en función de factores ambientales como la presencia de nutrientes minerales o el clima (Martínez, 2012).

Las semillas contienen muchas proteínas que metabólicamente están inactivas y que funcionan como reservas, las cuales varían según la especie. También presentan proteínas que metabólicamente son activas, como las enzimas proteicas (Irizarry, 2009).

Pueden contener algunos minerales, y la composición de éstos es similar a la del resto de la planta. Además del nitrógeno que está presente en las proteínas, las semillas contienen cierta cantidad de aminoácidos y de amidas y algunas vitaminas (Irizarry, 2009).

#### **1.4.3.3 Calidad de la semilla**

En todo cultivo es imprescindible tener en cuenta la calidad de la semilla para el éxito del mismo, con ello se producirá una plántula vigorosa (Borrajo, 2006).

Desde un punto de vista sustentable, es imposible obtener una buena cosecha si no se parte de una semilla de calidad, ya que un cultivo puede resultar de una calidad inferior a la semilla sembrada (Perissé, 2002).

Dentro de las principales propiedades que deben reunir las semillas son:

- ✓ Pureza: estar libre de semillas extrañas, de semillas de malezas u otros cultivares o especies.
  
- ✓ Limpieza: las semillas deben estar libres de materias extrañas como palillos o tierra.

- ✓ Sanidad: estar libre de plagas y enfermedades.
- ✓ Viabilidad: las semillas deben ser capaces de germinar y desarrollar una plántula normal en condiciones óptimas de siembra.
- ✓ Vigor: las semillas deben germinar y desarrollar una plántula normal en situaciones de siembra desfavorables.

#### **1.4.4 Germinación**

Se llama germinación, al acto por el cual la semilla en estado de vida latente<sup>2</sup> entra de pronto en actividad y origina una nueva planta. Para que el proceso de germinación, tenga lugar, es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos para el desarrollo de la plántula (González *et al.*, 2000).

La absorción de agua, por la semilla, desencadena una secuencia de cambios metabólicos, que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas, además que permite la división y el alargamiento celular provocando la rotura de las cubiertas seminales, que generalmente producen la emergencia de la radícula (González *et al.*, 2000).

Gracias a los avances tecnológicos como es el caso de la Biotecnología vegetal, la germinación de embriones se ha visto favorecida, ya que ésta técnica *in vitro* permite el aislamiento de un embrión y su germinación *in vitro*, con el fin de obtener una planta viable, pudiendo tener varias utilidades como el acortamiento del ciclo, prevención de aborto

---

<sup>2</sup> Estado de vida Latente: es un estado de reposo o de desarrollo suspendido, pero capaz de volverse activo en condiciones favorables (Diccionario Enciclopédico Vol 1. © 2009 Larousse Editorial, S.L.).

embrionario, superación de la incompatibilidad, producción de haploides, entre otros (Sánchez *et al.*, 2004).

Ésta técnica es útil para inducir la germinación de semillas maduras en letargo, superando las restricciones ocasionadas por la cubierta de la semilla o del endospermo (Sánchez *et al.*, 2004).

#### **1.4.4.1 Tipos de germinación**

Las semillas atendiendo a la posición de los cotiledones respecto a la superficie del sustrato pueden diferenciarse en la forma de germinar, es por ello que se distinguen dos tipos de germinación (Mauseth, 2003).

#### **1.4.4.2 Germinación Epigea**

Se trata de germinación epigea cuando los cotiledones emergen del suelo debido a un considerable crecimiento del hipocótilo. En sus cotiledones se diferencian cloroplastos, transformándolos en órganos fotosintéticos y actúan como hojas. Finalmente se desarrolla el epicótilo (porción del eje comprendida entre el punto de inserción de los cotiledones y las primeras hojas) (Mauseth, 2003).

En el caso de cedro andino, germina de manera epigea (Figura 1.3), a partir de los 15 a 30 días de ser colocadas las semillas en suelos adecuados (Cárdenas *et al.*, 2007).



**Figura 1.3:** Germinación epigea de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz (Ligia *et al.*, 2007).

#### 1.4.4.3 Germinación Hipogea

Es cuando los cotiledones permanecen enterrados, únicamente la plúmula atraviesa el suelo, el hipocótilo es muy corto, casi nulo, el epicótilo se alarga, apareciendo las primeras hojas verdaderas, que son los primeros órganos fotosintéticos de plántula (Mauseth, 2003).

##### 1.4.4.3.1 Factores que afectan la germinación

Los factores que afectan son:

- ✓ **Humedad**, para que las semillas recuperen su metabolismo es necesario la rehidratación de los tejidos. La disponibilidad del agua para la rehidratación, lo cual le permite el crecimiento del embrión, esto dependerá del aumento en el grado de hidratación de los tejidos. Un tipo de difusión ocurre cuando las semillas absorben agua debido a las

propiedades coloidales, esto se caracteriza por el aumento de la semilla y la liberación de calor (Irizarry, 2009).

Aunque es necesaria el agua para la rehidratación de las semillas, un exceso de la misma actuará desfavorable para la germinación ya que dificultará la llegada de oxígeno al embrión (Stern *et al.*, 2003).

Al aumentar la humedad se provoca el aumento de enfermedades como la proliferación bacteriana o fúngica en las semillas provocando un menor consumo de oxígeno y la latencia de la semilla (Maier, 2012).

✓ **Temperatura**, es un factor importante en el proceso de la germinación, ya que influencia la ruptura de latencia de las semillas (Villalobos *et al.*, 2006).

Por otra parte, se conoce que la alternancia de las temperaturas entre el día y la noche actúa positivamente sobre las etapas de germinación, por lo que el óptimo térmico de la fase de germinación y la fase de crecimiento no tienen por qué coincidir. Así unas fases estimularán la fase de germinación y otras estimularán la fase de crecimiento (Mauseth, 2003).

Al aumentar la temperatura menor será la absorción de oxígeno por parte de la semilla (Maier, 2012).

✓ **Gases** la mayor parte de las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. El oxígeno es necesario ya que es un suplemento de energía, originado por las reacciones oxidativas llevadas durante el proceso germinativo. El O<sub>2</sub> activa una serie de enzimas para transformar el almidón de la semillas en productos aprovechables para el

crecimiento de la planta, normalmente las plantas necesitan de un 22% de oxígeno frente a un 3% de dióxido de carbono (Maier, 2012).

✓ **Luz** tiene efectos múltiples en las semillas tanto su calidad como su intensidad afectan según la especie. Mediante los fotorreceptores como los fitocromos, las semillas perciben las condiciones de luz (Villalobos *et al.*, 2006).

La forma de los fitocromos estimulan la germinación e incrementa el potencial de crecimiento del embrión y reduce las restricciones impuestas por el endospermo (Villalobos *et al.*, 2006).

#### **1.4.5 Cultivo *in vitro***

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, entre otros.), y el control de los factores que afectan el crecimiento (Segretín, 2004).

El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas. Haberlandt, un científico alemán, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas. Sin embargo, éste investigador no pudo demostrar en forma práctica su hipótesis, debido a que la mayoría de los componentes complejos que integran los medios de cultivo actuales todavía no habían sido descubiertos. Sería recién en la década de los

cincuenta, cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales más usadas en la actualidad (Castillo, 2004).

Reproducir en condiciones de laboratorio es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados. Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo sino con solamente una parte del mismo, se utiliza el término explante para indicar la parte del órgano ó tejido vegetal que se cultiva *in vitro*. A la dificultad de reproducir las condiciones naturales en condiciones de laboratorio, se debe añadir en este caso la dificultad de suministrar al explante todo aquello que antes obtenía del sistema completo (García, 2002).

Dentro del cultivo *in vitro* existen varias técnicas para obtener plantas viables, dentro de estas se encuentran la micropropagación y la morfogénesis.

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21° y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas y reguladores de crecimiento (Castillo, 2004).

#### **1.4.5.1 Morfogénesis**

Esta técnica causa que se formen embriones generados desde el tejido en cultivo, proceso que por otra parte sólo ocurre en la formación de una semilla, bajo el control de ciertas mezclas hormonales se forman los embriones dentro de una masa aparentemente desorganizada de un callo, en el cual nódulos de células comienzan a desarrollarse en forma que recuerda la estructura de un embrión de semilla. Si estos embriones se trasladan a otros medios, desde los callos, medios que están diseñados para permitir que el embrión germine, entonces desarrollará una estructura de planta completa, esto es una plántula, un talluelo enraizado que no difiere mayormente de la obtenida desde semilla. Como las plantas obtenidas por caulogénesis axilar o adventicia, estas plántulas también pueden aclimatarse para transformarse en una planta viable con capacidad de fotosíntesis (Morgan, 2011).

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos muy frecuentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales.

La embriogénesis somática, es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar al embrión zigótico, sin que medie la fertilización de las gametas, mientras que por organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces o flores. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células, que según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división. En condiciones de cultivo *in vitro*, las células somáticas pueden regenerar embriones o brotes, raíces y/o flores como respuesta a un determinado estímulo. Esta regeneración está dada por un proceso que comprende diferentes fases que suceden de manera similar para los tres tipos de morfogénesis citadas. De Klerk y colaboradores en 1997 denominaron a estas diferentes fases como fase de adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización (Radice, 2004).



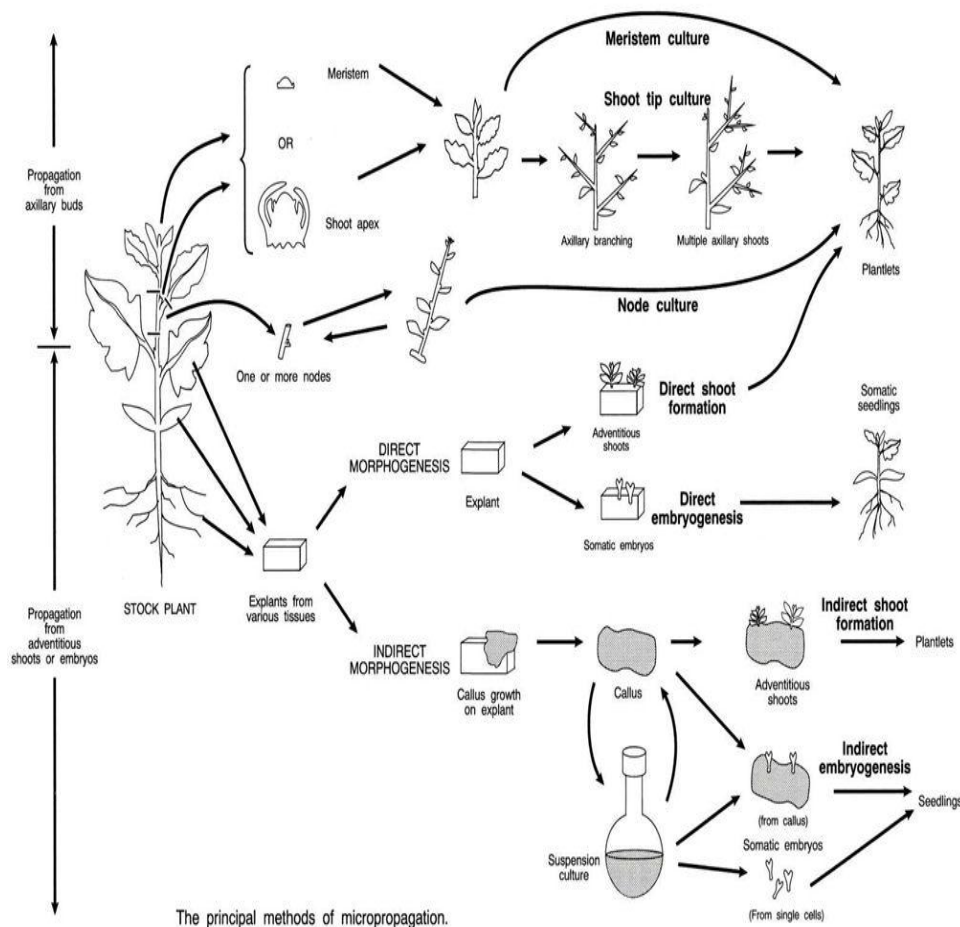
#### 1.4.5.1.1 Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática, es la formación de un embrión a partir de una célula o grupo de células no sexuales. Son estructuras bipolares con un eje radial-apical que no poseen conexión vascular con el tejido madre, el cual es capaz de crecer y formar individuos totalmente normales. Los embriones somáticos poseen un tejido organizado que tienen pequeñas células periféricas de 10 – 20  $\mu$  de diámetro que se dividen activamente. Estas células tienen la característica de tener núcleos basófilos y prominentes (Muñoz, 2003).

En condiciones *in vivo* la embriogénesis somática puede ocurrir en los integumentos del óvulo o a partir de la nucelas, dentro del ovario como el endospermo y las antípodas o el cigoto. En ciertas especies se puede dar en los ápices de las hojas como es el caso de las orquídeas (Roca *et al.*, 1991).

La embriogénesis somática se puede dar por dos vías: embriogénesis somática directa y embriogénesis somática indirecta. La vía directa, involucra la formación de los embriones somáticos en una parte del tejido sin la formación de callos o un mínimo de proliferación de este. Antes de formar los embriones todas o algunas de las células están predeterminadas como células embriogénicas, por haber retenido alguna de las propiedades de las células meristemáticas parentales de las que derivaron embriones y semilla. Éstas se conocen como células embriogénicas predeterminadas (Roca *et al.*, 1991).

Mientras que la embriogénesis indirecta, requiere de la formación de un tejido desdiferenciado y desorganizado al que se le denomina callo, a partir de este se diferencia el tejido (Roca *et al.*, 1991).



**Figura 1.4:** Etapas de Embriogénesis somática, Facultad de Agronomía- Universidad de Republica, 2011.

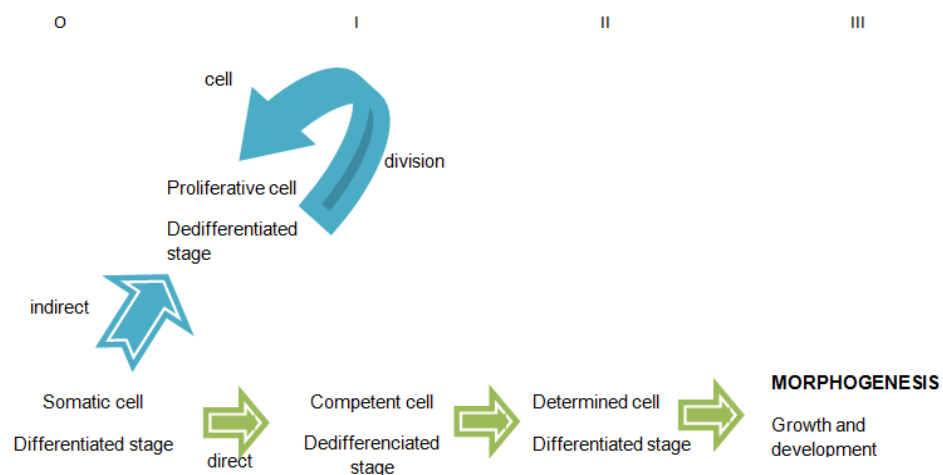
De Klerk y colaboradores en 1997, denominaron a estas diferentes fases como fase de adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización (Radice, 2004).

#### 1.4.5.1.1.1 Fase de Inducción

Es el proceso por el que las células del explante (porción de la planta donante cultivada *in vitro*) cambian su patrón de expresión y generan los embriones somáticos iniciales. Generalmente está condicionado por la

presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, fundamentalmente auxinas y citoquininas, pero se puede desencadenar, si el explante es inmaduro, en ausencia de los mismos, tanto en angiospermas como en gimnospermas. En la mayoría de las especies la embriogénesis somática se obtiene a partir de embriones cigóticos inmaduros (Loyola *et al*, 2011).

En esta fase de inducción, las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa entre el tipo, concentración y combinación de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar. En la fase de realización, la célula sufre las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado (Radice, 2004).



**Figura 1.5:** Procesos morfogénicos en plantas (Loyola *et al*, 2011).

El cultivo de tejidos ofrece un número de ventajas para la prevención de virus vegetales, estos cultivos tipificados por ausencia de virus podrán luego propagarse rápidamente en cultivo de tejido por distribución de nuevos stocks sin el temor de propagar virus que podrían haber estado incluidos en las plantas. Durante ésta rápida propagación en cultivo no hay riesgo de una reinfección con virus lo cual podría ser posible durante

la propagación de nuevos stocks saludables en el campo o en el invernadero (Morgan, 2011).

#### **1.4.6 Fitohormonas**

Las fitohormonas u hormonas vegetales son sustancias orgánicas, generalmente cristalizables, y de peso molecular medio, estas provocan señales químicas, producidas a concentraciones relativamente bajas, que son transportadas a otras partes de la planta para desencadenar una respuesta coordinada de los tejidos o células, estas hormonas vegetales son sustancias sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se transportan a otro, donde actúan regulando el crecimiento, desarrollo ó metabolismo del vegetal (Álvarez, 2011).

Las fitohormonas se producen en pequeñas cantidades en tejidos vegetales. Pueden actuar en el propio tejido donde se generan o bien a largas distancias, mediante transporte a través de los vasos del xilema y del floema.

Las hormonas vegetales controlan un gran número de procesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación. Una fitohormona interviene en varios procesos, y del mismo modo todo proceso está regulado por la acción de varias fitohormonas. Los efectos fisiológicos producidos no dependen de una sola fitohormona, sino más bien de la interacción de muchas de estas sobre el tejido en el cual coinciden (García, 2000).

Las fitohormonas pueden promover o inhibir determinados procesos. Dentro de las que promueven una respuesta existen 4 grupos principales de compuestos naturales, cada uno de los cuales con propiedades de regulación del crecimiento en plantas. Son: auxinas, giberelinas, citocininas y etileno (García, 2000).

Dentro de las que inhiben encontramos el ácido abscísico, los inhibidores, morfotinas y retardantes del crecimiento, cada uno con su estructura particular y activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta (García, 2000).

### ➤ **Auxinas**

El nombre auxina significa en griego 'crecer' y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. Aunque la auxina se encuentra en toda la planta, se puede encontrar concentraciones más altas en las regiones meristemáticas en crecimiento activo (González *et al.*, 1999).

La auxina es transportada desde el punto apical de la planta hacia su base. Este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece también prevenir la abscisión (González *et al.*, 1999).

La auxina se dirige a la zona oscura de la planta, produciendo que las células de esa zona crezcan más que las correspondientes células que se encuentran en la zona clara de la planta. Esto produce una curvatura de la punta de la planta hacia la luz, movimiento que se conoce como fototropismo (Vidales, 2008).

### ➤ **Giberelinas**

Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en las puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. Esta hormona no muestra el mismo transporte fuertemente polarizado como el observado para la auxina, aunque en algunas especies existe un movimiento basipétalo en el tallo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis) (González *et al.*, 1999).

Además de ser encontradas en el floema, las giberelinas también han sido aisladas de exudados del xilema, lo que sugiere un movimiento más generalmente bidireccional de la molécula en la planta (Vidales, 2008).

➤ **Citoquininas**

Las citoquininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemas en la punta de las raíces. Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, ambos sufriendo una rápida división celular. La presencia de altos niveles de citoquininas puede facilitar su habilidad de actuar como una fuente demandante de nutrientes. Las citoquininas también se forman en las raíces y son transportados a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles (González *et al.*, 1999).

➤ **Brasinolida**

Es una fitohormona de la familia de los brasinoesteroides, los cuales fueron encontrados en brotes apicales y tejidos vegetativos activos de plantas jóvenes como también en semillas de un gran número de especies herbáceas y arbustivas provocan crecimiento por elongación de hipocótilos y pedúnculos en dicotiledóneas, mientras que en monocotiledóneas se expresa en mesocótilos. Otros efectos de crecimiento relacionados corresponden a la reorientación transversal de microtúbulos, producción de metabolito secundarios, crecimiento del tubo polínico, inclinación y enrollamiento de las hojas. Básicamente, en ausencia de IAA, BRs pueden inducir además crecimiento por división celular y elongación vinculando también el mecanismo de extrusión de

protones, aunque se postulan mecanismos de activación diferentes a las atribuidas a auxinas y citocininas (Jordán *et al.*, 2006).

#### **1.4.6.1 Efectos provocados por las fitohormonas**

Según González (1999), las hormonas así como son una ayuda para el desarrollo de estructuras vegetales, también pueden provocar efectos en la planta, esto dependerá de la concentración en la que se utilice la fitohormona así tenemos:

- Dependiendo de la concentración en que se encuentren producen efectos dispares, beneficiosos o perjudiciales para el agricultor.
- Factores como el elevado precio, la dificultad de aplicación, todo esto limita mucho la utilización en la práctica de estos compuestos.

#### **1.4.6.2 Aplicaciones de las hormonas**

García (2000), explica que las aplicaciones más importantes de los reguladores vegetales podemos mencionar:

- ❖ Las fitohormonas son retardantes del crecimiento.
- ❖ Lo inducen sustancias como el ácido indolbutírico (IBA) y el ácido naftalénacético (NAA).
- ❖ Las giberelinas. El ácido giberélico (AG3) se emplea en la industria cervecera para acelerar la etapa de malteado de la cebada.
- ❖ El AG3 rompe también la dormición de los tubérculos de patata recién cosechados y conseguir así una brotación rápida y uniforme, entre otros.

## **1.5 HIPÓTESIS**

Existe un tipo de desinfectante y de fitohormona que al combinarse en concentraciones adecuadas actúan positivamente para la determinación del establecimiento de un protocolo de germinación *in vitro* e inducción a callo embriogénico de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.



## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA**

El proyecto de tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas de Quito (EPMMOP). Ubicado en la provincia de Pichincha, perteneciente al Distrito Metropolitano de Quito, con Latitud  $0^{\circ}13'59''S$  y Longitud  $78^{\circ}25'70''W$  a una altura de 2.300 m.s.n.m. La zona tiene una precipitación media anual de alrededor de 1500 mm, con temperaturas medias anuales de  $17.7^{\circ}C$  grados centígrados.

### **2.2 MATERIAL VEGETAL**

El material vegetal utilizado en el proyecto fue recolectado, en el banco de semillas del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas de Quito (EPMMOP).

Los embriones inmaduros obtenidos a partir de las cápsulas, fueron recogidas en los meses de febrero-marzo, debido a que las cápsulas poseen embriones inmaduros en estos meses, estos fueron recolectados en el Parque de Cumbayá.



**Figura 2.1.-** Recolección de cápsulas de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz en el Parque de Cumbayá 2011.

### **2.3 PRE-GERMINACIÓN**

Las semillas utilizadas en el presente trabajo fueron proporcionados por el Banco de Semillas del Vivero de Cununyacu, las mismas que fueron extraídas de árboles seleccionados por sus mejores características fenotípicas, provenientes de Yunguilla, Cantón Quito, Provincia de Pichincha. Las semillas utilizadas en el ensayo se encontraban tratadas con fungicida y conservadas en refrigeración a  $-5^{\circ}\text{C}$  para mantener su viabilidad.

En la etapa de pre- germinación, las semillas fueron colocadas en agua destilada por dos días a temperatura ambiente (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Semillas de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz colocadas en agua para su pre germinación a temperatura ambiente, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011.

Una vez obtenidas las semillas pre-germinadas y las cápsulas de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz se procedió a introducirlas en diferentes medios como una etapa de pre ensayos.

#### **2.4 ETAPA DE PRE- ENSAYOS DEL MATERIAL VEGETAL**

Ésta etapa inicio, con ensayos de diferentes soluciones para la desinfección y la evaluación de material vegetal, esto con la finalidad de realizar un descarte aquí se evaluó: i) soluciones para la desinfección ii) tipos de explantes como embriones con testa, embriones sin testa o embriones inmaduros iii) se valoró la posición de siembra de los embriones en los medios de cultivo, se colocó las semillas en forma vertical, horizontal e inclinada.

Dentro de esta etapa las soluciones utilizadas fueron:

<b>HIPOCLORITO DE SODIO</b>	
<b>CONCENTRACIÓN 1</b>	0.5% (V/V)
<b>CONCENTRACIÓN 2</b>	1% (V/V)

Estas concentraciones se las mantuvo por 10 minutos en agitación, seguidamente se los lavó con agua estéril.

Las semillas se las trató posteriormente con alcohol para que el proceso de desinfección sea el óptimo y se investigó con tres concentraciones de alcohol.

<b>ALCOHOL</b>	
<b>CONCENTRACIÓN 1</b>	30% (V/V)
<b>CONCENTRACIÓN 2</b>	70% (V/V)
<b>CONCENTRACIÓN 3</b>	90% (V/V)

En alcohol se las mantuvo por 30 segundos y se prosiguió a realizar tres lavados con agua estéril.

Otro proceso de desinfección usado en esta etapa fue peróxido de hidrógeno a una concentración del 3%(v/v), por 10 minutos en agitación, luego con alcohol al 30% y al 70% y al 90% por 30 segundos, lavados seguidamente con agua estéril.

Los embriones desinfectados fueron sembrados en medio básicos de Murashige y Skoog (MS) y colocados en la sala de incubación y en la incubadora a 25°C por 30 días.

Este período de ensayos preliminares tuvo una duración de tres meses.

## 2.5 ETAPA DE DESINFECCIÓN

Una vez realizada la etapa de pre ensayos, se tomó como explante para los ensayos a los embriones maduros, estos embriones fueron sometidos en hipoclorito de sodio de concentración 5.5% (v/v), a diferentes concentraciones (Tabla 2.1), por 10 minutos en agitación a 180 rpm, una vez transcurrido el tiempo se los llevaron hacia la cámara de flujo laminar para lavarlos tres veces con agua estéril (Figura 2.3), luego se los sumergirá en alcohol al 90 % por 30 segundos y se continuó con el lavado utilizando agua estéril.

**Tabla 2.1.-**Tres concentraciones de hipoclorito de sodio 5.5%(v/v), para el proceso de desinfección de semillas maduras de cedro andino (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz).

Semillas sin testa	Concentraciones de Hipoclorito de sodio 5% (v/v)		
	0.25%	0.50%	0.75%
	T1	T2	T3

**Unidad Experimental (UE): 30 tubos para cada tratamiento.**

Teniendo como tratamiento testigo T0 a la concentración 1% de hipoclorito de sodio.



**Figura 2.3:** Semillas de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz colocadas en hipoclorito de sodio de concentración 5.5%, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011.

*García (2008)*, establece al peróxido de hidrógeno como un buen desinfectante para semillas forestales, es por ello que se utilizó peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones (Tabla 2.2), lavados con agua estéril (Figura 2.4), y colocados en alcohol al 90% por 30 segundos, seguido de tres lavados con agua estéril.



**Figura 2.4:** Semillas de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz colocadas en peróxido de hidrógeno de concentración inicial 20% v/v, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011.

**Tabla 2.2.-**Tres concentraciones de peróxido de hidrógeno, para el proceso de desinfección de semillas maduras de cedro andino (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz).

Semillas sin testa	Concentración de Peróxido de Hidrógeno 20 % (v/v)		
	1%	2%	3%
	T5	T6	T7

**Unidad Experimental (UE): 30 tubos para cada tratamiento.**

Teniendo como tratamiento testigo T4 a la concentración 3% de peróxido de hidrógeno.

Las semillas una vez desinfectadas, se colocaron en medio básico de Murashige y Skoog (MS) al 100%, las cuales fueron llevadas a la sala de incubación y se las dejó por seis días a oscuridad, a temperatura controlada de 25°C, pasado este tiempo, se colocó a las semillas por un fotoperíodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad.

En esta etapa se evaluó a la presencia o ausencia de contaminantes como bacterias y hongos y a la necrosis del explante, se estableció un rango para la valoración:

**Valoración de contaminación:**

<b>Ausencia</b>	0
<b>Presencia</b>	1
<b>Necrosis</b>	2

Una vez realizada la valoración del proceso de desinfección se llevó a cabo el análisis estadístico de esta etapa, mediante el uso del software SPSS versión 19.

**2.6 ETAPA DE GERMINACIÓN**

En la etapa de germinación las semillas pre- germinadas, se colocaron en peróxido de hidrógeno al 3%, por un tiempo de 10 minutos en agitación a 180 rpm, después se las llevó a la cámara de flujo laminar para realizar los lavados correspondientes, una vez desinfectadas las semillas se procedió a retirar la testa y el endospermos de los embriones ( Figura 2.5), para retirar esta capa se utilizó un bisturí de punta fina y una pinza de punta delgada (previamente esterilizados en la autoclave horizontal por 40 minutos) para evitar dañar al embrión, con cortes suaves y exactos se retiró la capa delgada de la testa y la capa del endospermo, obteniendo los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, éstas fueron introducidas en medios básicos de Murashige y Skoog (MS), enriquecidos con biorreguladores con diferentes concentraciones, los biorreguladores utilizados: ácido giberélico (GA3) y brasinolida (BRA) (Tabla 2.3 y 2.4), además se usó como tercer tratamiento, al medio básico MS suplementado con agua de coco a diferentes concentraciones (Tabla 2.5).





**Figura 2.5:** Extracción de embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011.

Cada embrión fue colocado en un tubo de ensayo, éstos fueron llevados a la sala de incubación el cual se encontraba a una temperatura de 25°C, estos embriones cultivados *in vitro*, fueron sometidos a oscuridad por seis días y posteriormente se los colocó en un fotoperíodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad en la sala de incubación, hasta su germinación.

El tratamiento testigo (G0), para ésta etapa será medio básico MS al 100%, sin reguladores.

**Tabla 2.3.-** Tres concentraciones ácido giberélico en medio básicos de Murashige y Skoog (MS), para la germinación de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Semillas sin testa	Concentración de Ácido Giberélico GA3		
	1 mg.L <sup>-1</sup>	2 mg.L <sup>-1</sup>	3 mg.L <sup>-1</sup>
	G1	G2	G3

**Unidad Experimental (UE): 30 tubos para cada tratamiento.**

**Tabla 2.4.-**Tres concentraciones de brasinolida en medio de Murashige y Skoog (MS), para la germinación de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Semilla sin Testa	Concentración de BRA		
	1 mg.L <sup>-1</sup>	2 mg.L <sup>-1</sup>	3 mg.L <sup>-1</sup>
	G4	G5	G6

**Unidad Experimental (UE): 30 tubos para cada tratamiento.**

**Tabla 2.5.-**Medio de Murashige y Skoog (MS), suplementado con agua de coco en diferentes concentraciones, para la germinación *in vitro* de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Semillas sin testa	Concentración Agua de Coco		
	5%	10%	15%
	G7	G8	G9

**Unidad Experimental (UE): 30 tubos para cada tratamiento.**

Establecidas las semillas para la germinación se valoró los tratamientos:

### Valoración de los tratamientos:

Para la evaluación del proceso de germinación, se tomó datos a partir de los 6, 15 y 30 días como se detalla a continuación:

DÍAS	VARIABLE
6 días	Presencia de cotiledones y radícula
15 días	Elongación y presencia o ausencia de hojas verdaderas
30 días	Tamaño final y número de hojas

Para la toma de datos como la elongación y tamaño final que adquieren las semillas germinadas se usó una regla milimetrada.

Además se usó las siguientes fórmulas para el cálculo de la tasa germinativa y la energía germinativa, que se obtuvo con los tratamientos.

#### **Fórmula 1:**

$$\% \text{ de Germinación} = \frac{\text{número de semillas germinadas}}{\text{número de semillas sembradas}} * 100$$

#### **Fórmula 2:**

$$E.G = \frac{\text{total diario}}{\text{número de semillas sembradas}} * 100$$

**Total diaria:** sumatoria total de las semillas germinadas diariamente, hasta un período de energía definido o hasta el día de máxima germinación (Ordoñez *et al.*, 2004).

Finalizado la toma de datos se continuó con el análisis estadístico por medio del software SPSS versión 19.

## **2.7 ETAPA DE INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO**

En esta etapa se realizó ensayos para determinar la concentración de biorreguladores para la formación de callos embriogénicos.

Los embriones maduros, fueron sometidos al procedimiento de desinfección con hipoclorito de sodio al 0.5 %, por un tiempo de 20 minutos en agitación a una velocidad de 180 rpm, luego de este tiempo se los lavó con agua estéril, posteriormente a esto se los colocó en alcohol por 30 segundos seguidos de tres enjuagues con agua estéril, después se prosiguió a retirar la testa y el endospermo de los mismos y se los colocó en frascos de vidrio con el medio de cultivo estos embriones fueron puestos en posición vertical en cada medio introduciendo un 20% del embrión dentro del medio y el 80% restante fuera del medio para así evitar la muerte de las semillas, los frascos fueron completamente sellados, el medio de cultivo usado en esta etapa fue el medio básico de Murashige y Skoog (MS) al 100%, al cual se le adicionó diferentes concentraciones de auxinas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético (ANA) (Tabla 2.6, 2.7 y 2.8).

Realizada la introducción de los embriones, se prosiguió a llevarlos al cuarto de incubación a una temperatura controlada de 25°C, estos frascos que contenían los embriones fueron incubados por dos meses en oscuridad (Figura 2.6).



**Figura 2.6:** Proceso de Inducción a callo embriogénico en fotoperiodo de oscuridad por dos meses y a temperatura controlada de 25°C, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011

**Tabla 2.6.-** Tres concentraciones 2,4-D (ácido 2,4-dichlorofenoxiacético) en medio MS, para la formación de callo embriogénico de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Semilla sin testa	Concentración MS+ 2,4D (ácido 2,4-dichlorofenoxiacético)		
	2 mg.L <sup>-1</sup>	3 mg.L <sup>-1</sup>	4 mg.L <sup>-1</sup>
	I1	I2	I3

**Unidad Experimental (UE): 30 tubos para cada tratamiento.**

**Tabla 2.7.-**Tres concentraciones ANA (ácido naftalenacético) en medio MS para la formación de Callo embriogénico de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Semilla sin testa	Concentración MS+ ANA (ácido naftalenacético)		
	2 mg.L <sup>-1</sup>	3 mg.L <sup>-1</sup>	4 mg.L <sup>-1</sup>
	I4	I5	I6

**Unidad Experimental (UE): 30 tubos para cada tratamiento.**

**Tabla 2.8.-** Tres concentraciones de ácido 2,4-dichlorofenoxiacético y ácido naftalenacético en medio MS para la formación de Callo embriogénico de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

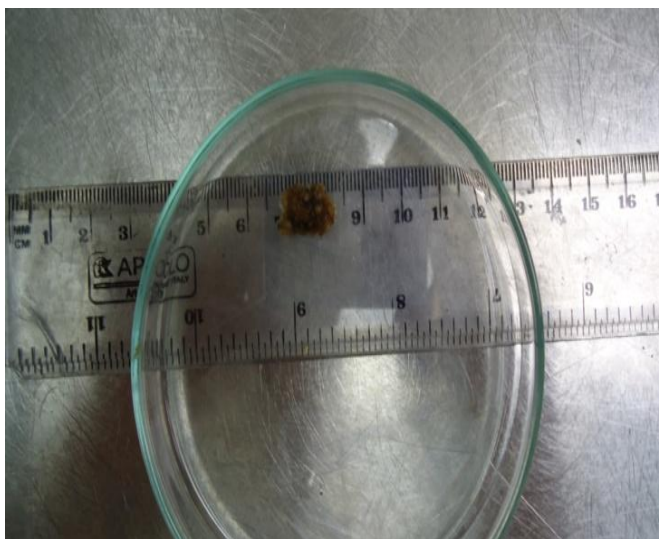
Semilla sin testa	Concentración MS+ ácido 2,4-dichlorofenoxiacético ( 2,4-D) +ANA (ácido naftalenacético)		
	0,5 mg.L <sup>-1</sup> + 1 mg.L <sup>-1</sup>	1 mg.L <sup>-1</sup> + 0,5 mg.L <sup>-1</sup>	1 mg.L <sup>-1</sup> + 1 mg.L <sup>-1</sup> <sub>1</sub>
	I7	I8	I9

**Unidad Experimental (UE): 30 tubos para cada tratamiento.**

Se recolectó los datos a partir de los 25, 30 y 50 días, después de transcurrida la introducción de las semillas, aquí se valoró:

DÍAS	VARIABLE
25 días	Presencia de callo
30 días	Color y uniformidad del callo
50 días	Tamaño y brillo

Para la recolección de datos para las variables presencia de callo, color, uniformidad y brillo se realizó mediante la observación a través de un estéreo microscopio, para el tamaño del callo se tomó una regla de 30 cm el cual permitió tomar las dimensiones del callo (Figura 2.7).



**Figura 2.7.-** Imagen de medición de callo, Laboratorio de Micropropagación Vegetal EPMMO-Q, Cununyacu, 2011

Además se estableció si son o no callos embriogénicos, mediante el uso de un reactivo detallado en el protocolo de tinción de cromosomas y embriones somáticos de plantas mono y dicotiledóneas (Anexo 1).

### **2.7.1 Método de comprobación**

Transcurrido los dos meses para la formación de callo, se valoró a estos callos por medio de la tinción de ácido acetocarmínico descrito por Portillo, (2000). Como principal tinte de células embriogénicas, para el uso de ésta tinción se realizó un frotis, el cual consistió en cortar el callo por medio de un bisturí, se colocó una fina capa de células en el portaobjetos

y se lo llevo al fuego para fijar la placa después de unos minutos se tiñó la placa con el ácido dejándolo reposar por 30 segundos, se lavó la placa con agua destilada y se lo cubrió con el cubre objetos y se prosiguió a la observación.

Para la observación se colocó las placas en la platina del microscopio óptico y se comenzó enfocando con el lente de menor aumento hasta llegar al de mayor aumento según las necesidades de la observación. El método de tinción nos permitió identificar las diferentes estructuras del tejido analizado (Anexo 4).

Finalizado la toma de datos se continuó con el análisis estadístico por medio del software SPSS versión 19.



## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1 ETAPA DE DESINFECCIÓN

En la etapa de desinfección se utilizaron dos tipos de agentes desinfectantes hipoclorito de sodio 5%(v/v) y peróxido de hidrógeno 20% (v/v), los cuales fueron observados por un período de 30 días para tener valores reales que nos permitió realizar un análisis de varianza.

Basándose en el análisis de varianza ANOVA para verificar el mejor tratamiento (Tabla 3.1), se puede decir que existe un tratamiento que es diferente ya que el nivel de significancia corresponde a un valor ( $p= 0.00$ ), permitiendo aceptar la hipótesis alternativa.

**Tabla 3.1.-** Análisis de Varianza ANOVA, para el mejor tratamiento de desinfección.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	63.262	7	9.037	22.634	<b>0.000</b>
<b>Intra-grupos</b>	92.633	232	0.399		
<b>Total</b>	155.896	239			

SPSS versión 19

\*gl: grados de Libertad

\*F: frecuencia

\*Sig.: significancia

En este caso al tratarse de variables cualitativas, se realiza una prueba Chi- cuadrado o un análisis de medidas simetrías, esto para establecer si

existe o no relación entre las variables tratamiento vs contaminación, al 95% de confianza.

**Tabla 3.2.-** Tabla Contingencia o medidas simétricas para las variables cualitativas Tratamiento vs contaminación.

		Valor	Sig. aproximada
Tratamiento vs Contaminación	Coefficiente de contingencia	0.581	<b>0.000</b>
Nº de casos válidos		240	

SPSS versión 19

+Sig.: significancia aproximada.

Realizado el análisis de coeficiente (Tabla 3.2), se puede establecer que entre las variables tratamiento y contaminación existe una relación de dependencia ya que el nivel de significancia es menor al establecido ( $p \leq 0.05$ ).

Para determinar que desinfección resultó mejor en este proceso se realizó, el análisis de porcentajes de contaminación y necrosis a los 15 y 30 días de establecidas las semillas de *Cedrelel montana* Moritz ex Turcz en la sala de incubación.

### 3.1.1 Porcentaje de Contaminación y Necrosis

Para el análisis de porcentajes de contaminación, se realizó el análisis de las variables cualitativas por medio de tablas de contingencia a los 15 días de establecido la desinfección, en la cual se muestra que los mejores tratamientos son: T2 (hipoclorito de sodio al 0.5%) y T7 (peróxido de hidrógeno al 3%).

También se puede observar que en el análisis (Tabla 3.3), que existió muy poca cantidad de embriones necrosados con los tratamientos T2 (hipoclorito de sodio al 0.5%) y T7 (peróxido de hidrógeno al 3%).

**Tabla 3.3.-** Tabla de contingencia a los 15 días de establecido la desinfección de embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

		TRATAMIENTO							
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Contaminación a los 15 días	ausencia de contaminante	26	14	27	10	30	15	15	27
	presencia de contaminante	4	5	3	2	0	3	3	1
	muerte o necrosis	0	11	0	18	0	12	12	2
<b>Total</b>		30	30	30	30	30	30	30	30

SPSS versión 19

Al examinar el proceso de desinfección a los 30 días de establecidos los embriones con los dos desinfectantes la tabla (Tabla 3.4), muestra que T2 (hipoclorito de sodio al 0.5%) y T7 (peróxido de hidrógeno al 3%) carecen de un alto porcentaje de contaminación y de necrosis de los embriones.

**Tabla 3.4.-** Tabla de contingencia a los 30 días de establecido la desinfección de embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

		TRATAMIENTO							
		T 0	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7
Contaminación a los 30 días	ausencia de contaminante	26	7	27	8	27	14	14	27
	presencia de contaminante	4	12	3	2	0	3	3	1
	muerte o necrosis	0	11	0	20	3	13	13	2
<b>Total</b>		30	30	30	30	30	30	30	30

SPSS versión 19

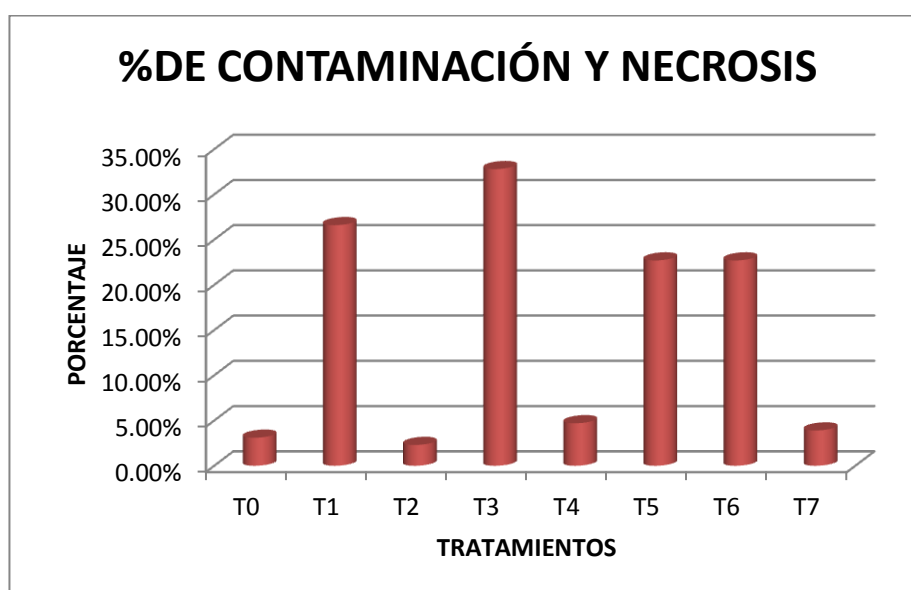
Obtenida la cantidad de contaminación necrosis y ausencia se realizó los porcentajes de contaminación (Tabla 3.5 y Cuadro 3.1), por medio de éste análisis se confirma que los mejores tratamientos para la etapa de desinfección son T2 (hipoclorito de sodio al 0.5%) y T7 (peróxido de hidrógeno al 3%).

**Tabla 3.5.-** Porcentaje de contaminación y necrosis a los 30 días de establecido el protocolo de desinfección.

TRATAMIENTO	Media	Varianza	% de Contaminación y Necrosis
T0	0.13	0.120	3.1%
T1	1.13	0.602	26.6%
T2	0.10	0.093	2.3%
T3	1.40	0.800	32.8%
T4	0.20	0.372	4.7%
T5	0.97	0.930	22.7%
T6	0.97	0.930	22.7%
T7	0.17	0.282	3.9%
<b>Total</b>	0.53	0.668	100.0%

SPSS versión 19

**Cuadro 3.1.-** Porcentaje de contaminación y necrosis a los 30 días del proceso de desinfección de los embriones de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.



En esta gráfica se puede observar que los tratamientos T1 (Hipoclorito de sodio al 0.25%), T3 (Hipoclorito de sodio al 0.75%), T5 (peróxido de hidrógeno al 1%) y T6 (peróxido de hidrógeno al 2%) poseen altos valores de contaminación y necrosis, por medio de esto se descarta el uso de estos tratamientos como parte del proceso de desinfección de los embriones maduros, para el proyecto de germinación e inducción a callo embriogénico.

### 3.2 ETAPA DE GERMINACIÓN

#### 3.2.1 Análisis del mejor tratamiento para la germinación de los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

En la etapa de germinación se puede observar que la tabla 3.6 del análisis de varianza ANOVA para el mejor tratamiento, permite descartar la hipótesis nula ya que se obtiene un ( $p= 0.006$ ) que es un valor menor al nivel de significancia por medio del cual se opta a aceptar la hipótesis alternativa la cual indica que un tratamiento es diferente, para establecer que tratamiento es diferente se ha realizado un Prueba confirmatoria de Tukey.

**Tabla 3.6.-** Análisis ANOVA con respecto a la presencia de radícula y cotiledón.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	5.600	9	0.622	2.651	<b>0.006</b>
<b>Intra-grupos</b>	68.067	290	0.235		
<b>Total</b>	73.667	299			

SPSS versión 19

\*gl: grados de Libertad

+F: frecuencia

+Sig.: significancia

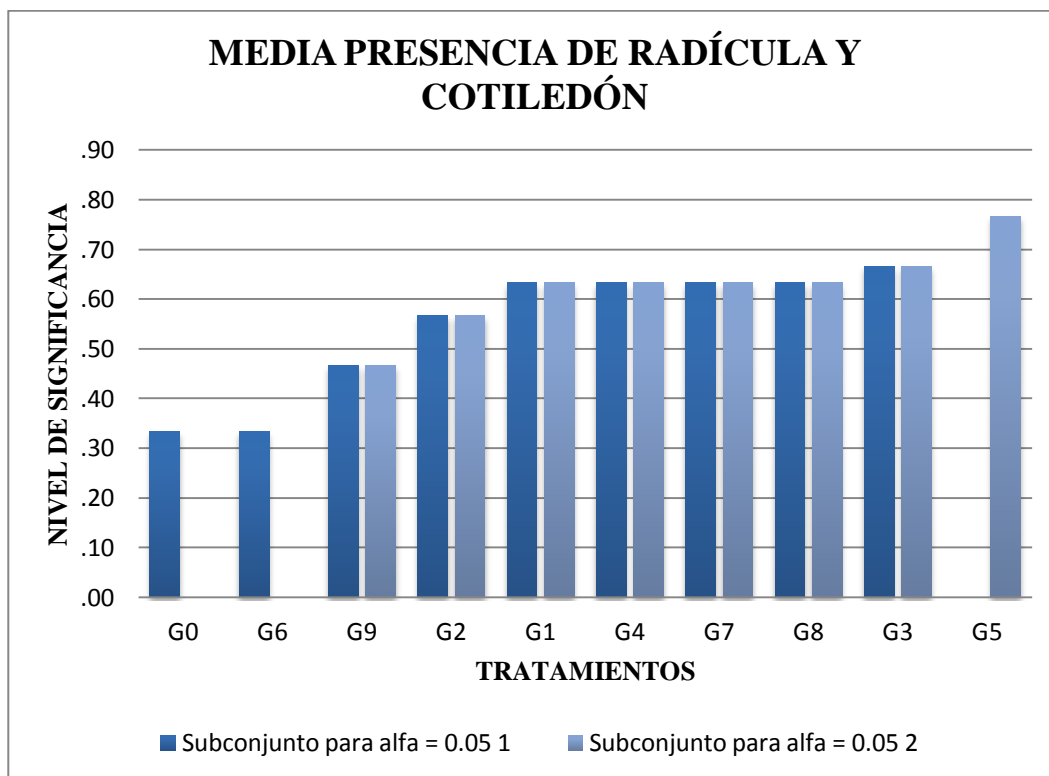
La prueba de Tukey nos indica que el mejor tratamiento para la germinación de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz es el G5 (2mg.L<sup>-1</sup> de brasinólida) con respecto a la presencia de radícula y cotiledón como se indica en la (Tabla 3.7 y Cuadro3.2).

**Tabla 3.7.-** Prueba HSD de Tukey para la presencia de radícula y cotiledón.

	TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Prueba confirmatoria de HSD de Tukey	<b>G0</b>	30	0.33		
	<b>G6</b>	30	0.33		
	<b>G9</b>	30	0.47	0.47	
	<b>G2</b>	30	0.57	0.57	
	<b>G1</b>	30	0.63	0.63	
	<b>G4</b>	30	0.63	0.63	
	<b>G7</b>	30	0.63	0.63	
	<b>G8</b>	30	0.63	0.63	
	<b>G3</b>	30	0.67	0.67	
	<b>G5</b>	<b>30</b>		<b>0.77</b>	
<b>Sig.</b>			0.193	0.331	

SPSS versión 19

**Cuadro 3.2.-** Representación gráfica del mejor tratamiento con respecto a la formación de radícula y cotiledón de los embriones de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.



Para Analizar si el tratamiento G5 (2mg.L<sup>-1</sup> de brasinolida), es el mejor se realizó otras pruebas de Tukey pero con respecto a la elongación, tamaño final y número de hojas que se obtuvieron como resultado del proceso de germinación.

A partir de estos análisis, se puede decir que el mejor tratamiento para la elongación es el tratamiento G5 (2mg.L<sup>-1</sup> de brasinolida), como se indica en la (Tabla 3.8), ya que dio un nivel de significancia (p= 0.009) el cual indica que existe un tratamiento diferente y con la prueba Tukey confirma que tratamiento es el diferente.



**Tabla 3.8.-** Análisis ANOVA con respecto a la elongación de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	13.839	9	1.538	2.506	<b>0.009</b>
<b>Intra-grupos</b>	177.979	290	0.614		
<b>Total</b>	191.818	299			

SPSS versión 19

\*gl: grados de Libertad

\*F: frecuencia

\*Sig.: significancia

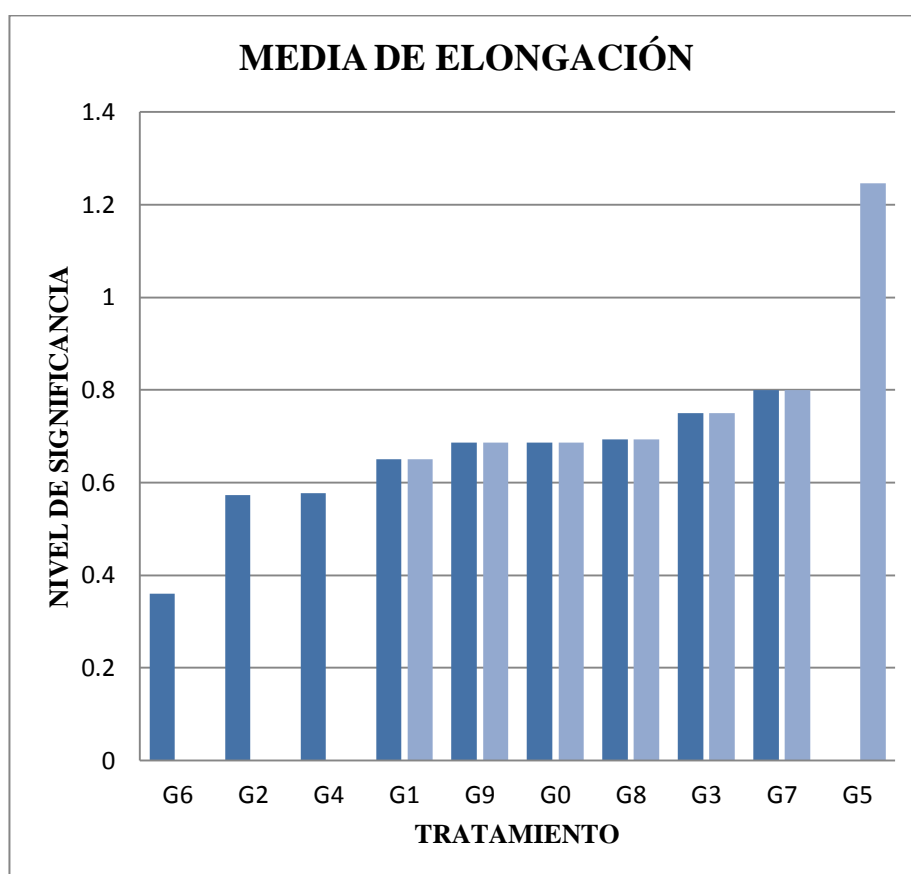
Para confirmar que tratamiento es el diferente se realizó un análisis confirmatorio para la variable elongación.

**Tabla 3.9.-** Prueba de confirmación HSD Tukey para la elongación.

.TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
<b>G6</b>	30	0.3600	
<b>G2</b>	30	0.5723	
<b>G4</b>	30	0.5767	
<b>G1</b>	30	0.6500	0.6500
<b>G9</b>	30	0.6867	0.6867
<b>G0</b>	30	0.6867	0.6867
<b>G8</b>	30	0.6933	0.6933
<b>G3</b>	30	0.7500	0.7500
<b>G7</b>	30	0.8000	0.8000
<b>G5</b>	<b>30</b>		<b>1.2467</b>
<b>Sig.</b>		0.476	0.097

A partir de estos datos (Tabla 3.9) se puede decir que el mejor tratamiento es G5 (2mg.L<sup>-1</sup> de brasinolida) con un (p= 1.24) ya que es el tratamiento que difiere de los demás del sub grupo analizado por medio de la prueba Tukey.

**Cuadro 3.3.-** Representación grafica del mejor tratamiento para la elongación de los embriones de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.



Con respecto al tamaño final el análisis de varianza ANOVA nos da un nivel de significancia (p= 0.014) que sigue siendo un valor menor al establecido con lo cual se indica que sigue existiendo un tratamiento diferente (Tabla 3.10).

**Tabla 3.10.- ANOVA con respecto al tamaño final con un nivel de confianza del 95%.**

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Inter-grupos</b>	19.261	9	2.140	2.349	<b>0.014</b>
<b>Intra-grupos</b>	264.242	290	0.911		
<b>Total</b>	283.502	299			

SPSS versión 19

\*gl: grados de Libertad

\*F: frecuencia

\*Sig.: significancia

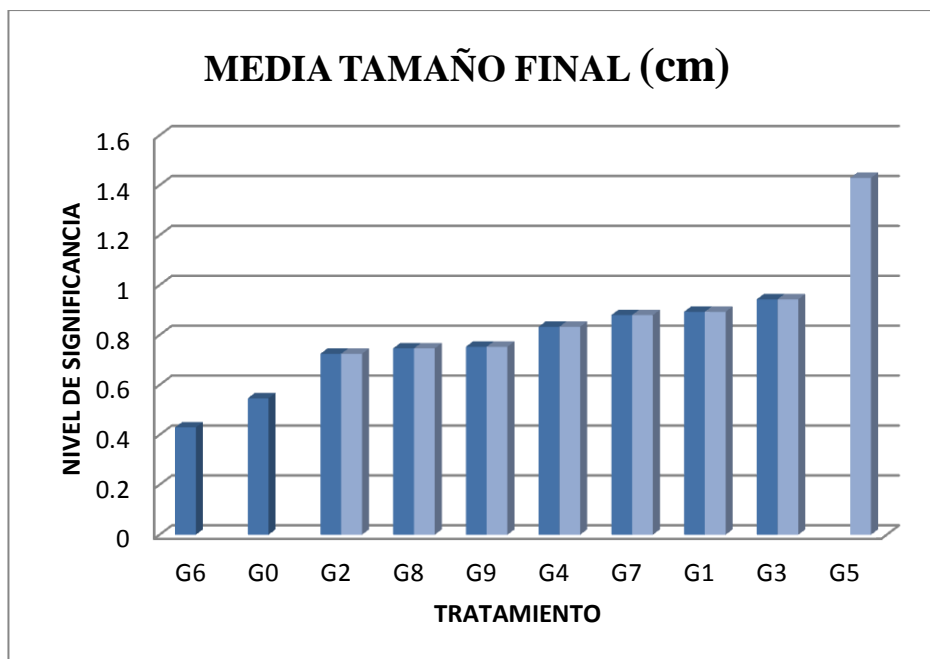
Por medio de la prueba Tukey se establece que el mejor tratamiento que se diferencia del grupo es el G5 ( $2\text{mg.L}^{-1}$  de brasinólida) como se indica en la (Tabla 3.10), para confirmar que se trata de ese tratamiento se realiza una prueba confirmatoria por medio del post hoc Tukey HD (Tabla 3.11 y Cuadro 3.4).

**Tabla 3.11.-** Prueba Tukey para el tamaño final del embrión de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

TRATAMIENTO	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
G6	0.4300	
G0	0.5467	
G2	0.7253	0.7253
G8	0.7467	0.7467
G9	0.7533	0.7533
G4	0.8333	0.8333
G7	0.8800	0.8800
G1	0.8933	0.8933
G3	0.9433	0.9433
<b>G5</b>		<b>1.4300</b>
Sig.	0.541	0.122

SPSS versión 19

**Cuadro 3.4-** Representación grafica del análisis de medias para el tamaño final del proceso de germinación de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.



En el análisis de varianza ANOVA, para la variable número de hojas tiene un nivel de significancia ( $p=0.010$ ), el cual indica que hay un tratamiento diferente (Tabla 3.12).

**Tabla 3.12.-**Análisis de Varianza ANOVA para la variable número de hojas.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	82.000	9	9.111	2.456	<b>0.010</b>
<b>Intra-grupos</b>	1075.667	290	3.709		
<b>Total</b>	1157.667	299			

SPSS versión 19

\*gl: grados de Libertad

\*F: frecuencia

\*Sig: significancia

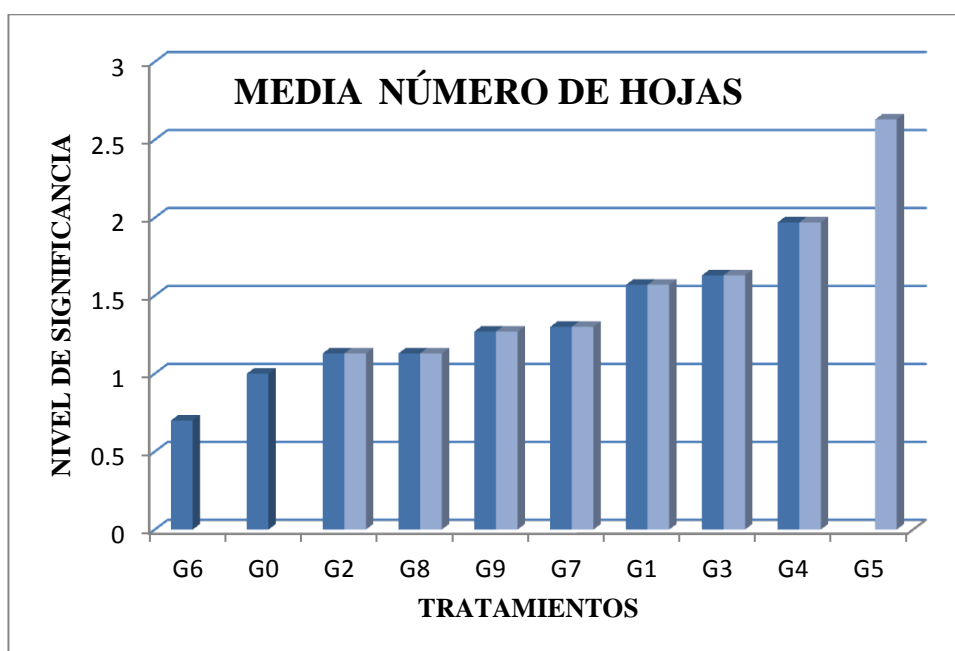
Obtenido el análisis de varianza se procede a verificar que tratamiento es más efectivo para la variable número de hojas por medio de la prueba Tukey, en donde el nivel de significancia del mejor tratamiento es ( $p=2.63$ ) (Tabla 3.13 y Cuadro 3.5).

**Tabla 3.13.-** Análisis HSD Tukey para la variable número de hojas.

TRATAMIENTO	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
G6	0.70	
G0	1.00	
G2	1.13	1.13
G8	1.13	1.13
G9	1.27	1.27
G7	1.30	1.30
G1	1.57	1.57
G3	1.63	1.63
G4	1.97	1.97
<b>G5</b>		<b>2.63</b>
Sig.	0.248	0.081

SPSS versión 19

**Cuadro 3.5.-** Representación gráfica de la prueba HSD de Tukey para la variable número de hojas.



Una vez obtenido el mejor tratamiento se realizaron pruebas estadísticas para ver si entre las variables estudiadas durante el proceso de germinación tenían o no relación directa.

Realizando el análisis estadístico comparando la presencia de radícula contra la presencia de número de hojas por medio del Chi- cuadrado podemos decir que estas dos variables no son independientes, es decir que se descarta la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis alternativa la cual nos indica que las variables se encuentran relacionadas (Tabla 3.14). La semilla que no presenta radícula y cotiledón, no presentará hojas y por lo tanto la semilla continuará en estado de latencia.

**Tabla 3.14.-** Tabla de Contingencia entre variables Presencia de radícula y presencia de hojas.

		Presencia de radícula y cotiledón	
		NO	SI
		Recuento	Recuento
Presencia de hojas verdaderas	NO	129	82
	SI	1	88

SPSS versión 19

Como se obtuvo un nivel de significancia menor al de 0.05 en la prueba Chi- cuadrado, podemos decir que la hipótesis alternativa se acepta, que la variable presencia de radícula y presencia de hojas se encuentran relacionadas (Tabla 3.15).

**Tabla 3.15.-** Tabla Chi- Cuadrado para la presencia de radícula vs presencia de hojas.

		Presencia de radícula y cotiledón
Presencia de hojas verdaderas	Chi cuadrado	91.813
	gl	1
	Sig.	<b>0.000*</b>

SPSS versión 19

\*gl: grados de Libertad

\*Sig.: significancia

Para finalizar el análisis estadístico de las variables observadas durante el proyecto se puede indicar que al momento de tener la presencia de radícula y cotiledones en los embriones de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz de forma *in vitro*, al transcurrir los 30 días de establecida la germinación el promedio de hojas verdaderas al finalizar el proceso es de tres hojas por planta germinada como se indica en el análisis de medias (Tabla 3.16).

**Tabla 3.16.-** Análisis de Medias entre presencia de radícula y número de hojas.

	Presencia de Radícula y Cotiledón					
	NO			SI		
	Media	Recuento	% de la fila	Media	Recuento	% de la fila
<b>Nº de Hojas</b>	0	130	43.3%	<b>3</b>	170	56.7%

SPSS versión 19



### 3.2.2 Cálculo de energía germinativa y porcentajes de germinación

Se realizó un análisis de la tasa germinativa de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, como respuestas a los biorreguladores utilizados durante el proyecto.

#### 3.2.2.1 Porcentaje de germinación

**Fórmula 1:**

$$\% \text{ de Germinación} = \frac{\text{número de semillas germinadas}}{\text{número de semillas sembradas}} * 100$$

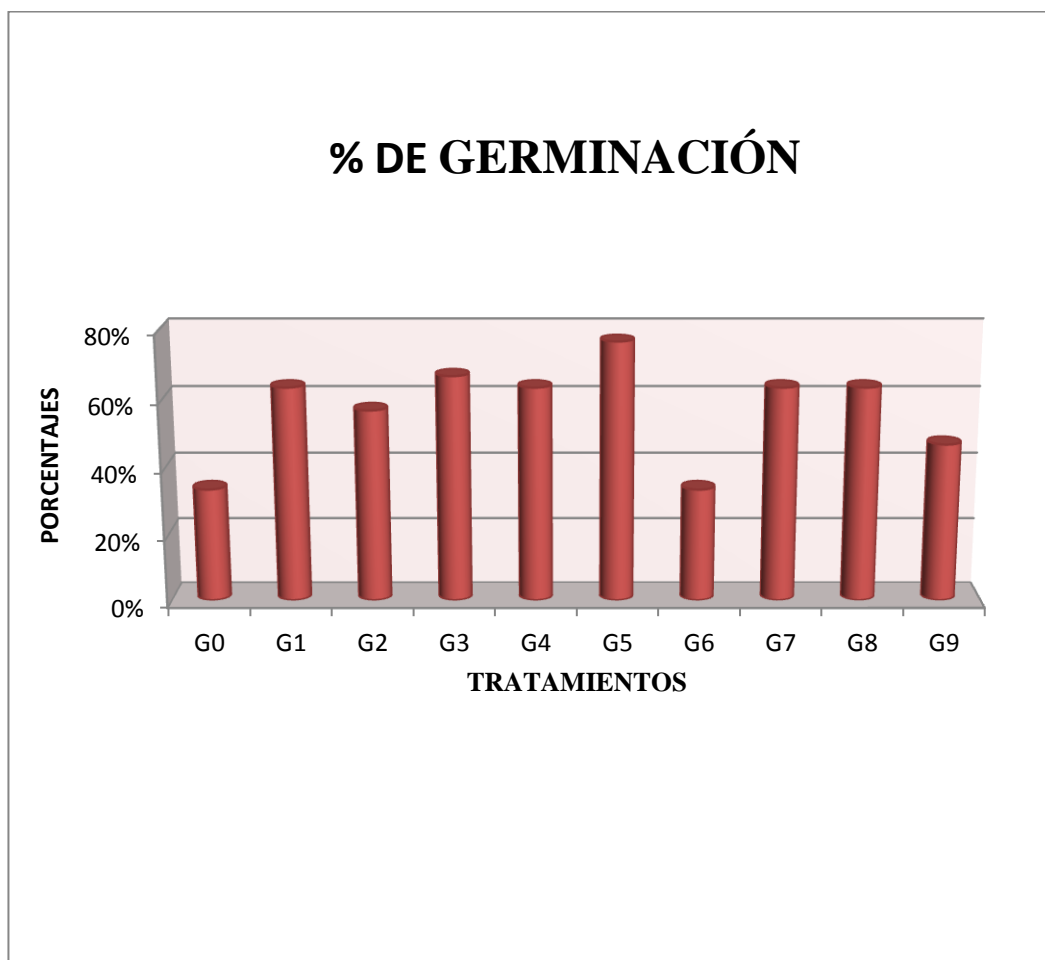
**Tabla 3.17.-** Porcentaje de Germinación para los embriones de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

TRATAMIENTOS	% DE GERMINACIÓN	% NO GERMINADOS	TOTAL
G0	33%	66.7%	100%
G1	63%	36.7%	100%
G2	57%	43.3%	100%
G3	67%	33.3%	100%
G4	63%	36.7%	100%
G5	77%	23.3%	100%
G6	33%	66.7%	100%
G7	63%	36.7%	100%
G8	63%	36.7%	100%
G9	47%	53.3%	100%

SPSS versión 19

Por medio de esta tabla se puede establecer que la mayor germinación obtenida durante el proyecto es con el tratamiento G5 (2mg.L<sup>-1</sup> de brasinolida) seguido del tratamiento G3 (3mg.L<sup>-1</sup> ácido giberélico) como se puede visualizar más detalladamente en el Cuadro 3.6.

**Cuadro 3.6.-** Representación gráfica del porcentaje de germinación de los embriones de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.



### **3.2.2.2 Tasa de energía germinativa de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.**

Para la obtención de la tasa de energía germinativa se puso como fecha máxima de germinación a los 30 días, con un total de 170 semillas sembradas correspondientes a la fecha máxima (Tabla 3.18 y Cuadro 3.7)

**Fórmula 2:**

$$E.G = \frac{\text{total diario}}{\text{número de semillas sembradas}} * 100$$

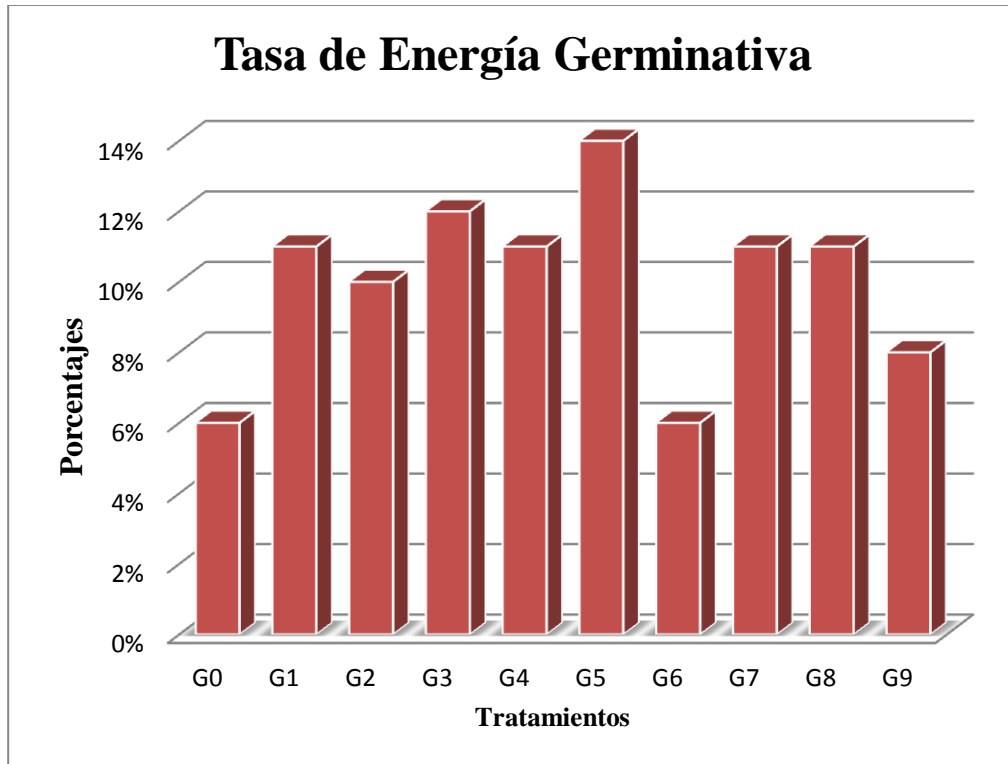
**Tabla 3.18.-** Tasa de energía germinativa de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

	<b>Energía Germinativa</b>		
<b>TRATAMIENTO</b>	<b>G0</b>	10	6%
	<b>G1</b>	19	11%
	<b>G2</b>	17	10%
	<b>G3</b>	20	12%
	<b>G4</b>	19	11%
	<b>G5</b>	23	14%
	<b>G6</b>	10	6%
	<b>G7</b>	19	11%
	<b>G8</b>	19	11%
	<b>G9</b>	14	8%
<b>Total</b>	170	100%	

SPSS versión 19

Obteniendo estos resultados se puede decir que la energía germinativa de los embriones de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, se obtuvo en mayor cantidad con el tratamiento G5 (2mg.L<sup>-1</sup> de brasinolida) y G3 (3mg.L<sup>-1</sup>ácido giberélico) con porcentajes iguales a 12% y 14% respectivamente.

**Cuadro 3.7.-** Representación gráfica de la energía germinativa de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz a los 30 días como fecha máxima de germinación.



### 3.3 ETAPA DE INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO

En esta etapa se analizó, dos tipos de biorreguladores para la formación de callo: ácido naftalenacético y ácido 2,4-dichlorofenoxiacético y un combinado entre estas dos auxinas, para lo cual se ha realizado un análisis de Varianza ANOVA (Tabla 3.19) con el cual se evalúa si existe un tratamiento diferente o todos son iguales.

**Tabla 3.19.-** Análisis de Varianza ANOVA para la presencia de callo embriogénico a los 15 días.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	17.852	8	2.231	13.147	<b>.000</b>
<b>Intra-grupos</b>	44.300	261	.170		
<b>Total</b>	62.152	269			

SPSS versión 19

\*gl: grados de Libertad

\*F: frecuencia

\*Sig.: significancia

A partir de este análisis se puede decir que existen tratamientos que son diferentes ya que presenta un nivel de significancia menor al establecido, para verificar que tratamiento difiere del grupo se realizó una análisis post hoc con la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95% (Tabla 3.20).

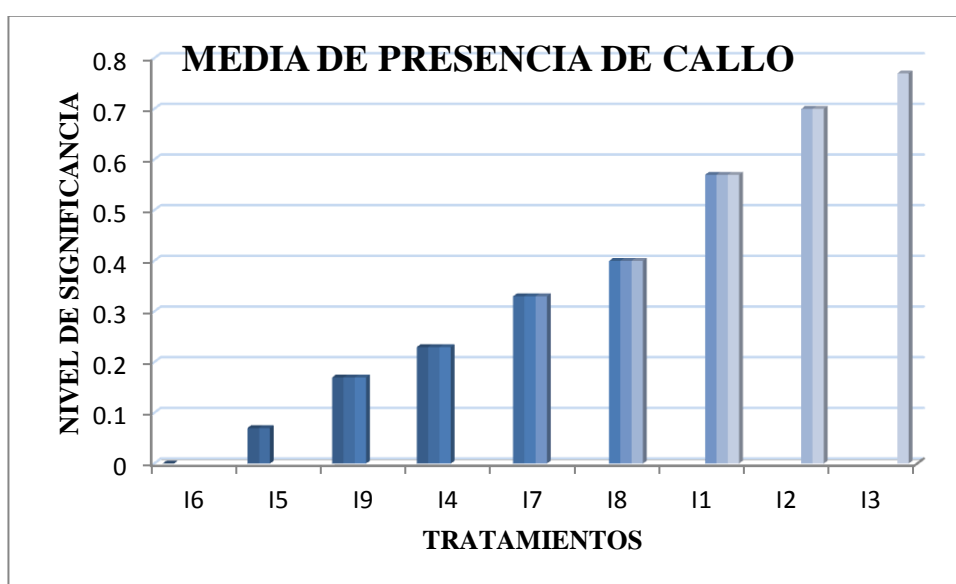
**Tabla 3.20.-** Análisis post hoc prueba de Tukey para la presencia de callo embriogénico.

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
I6	30	.00					
I5	30	.07	.07				
I9	30	.17	.17	.17			
I4	30	.23	.23	.23			
I7	30		.33	.33	.33		
I8	30			.40	.40	.40	
I1	30				.57	.57	.57
I2	30					.70	.70
<b>I3</b>	<b>30</b>						<b>.77</b>
Sig.		.413	.233	.413	.413	.114	.628

SPSS versión 19

Por medio de la tabla 3.20, se pudo identificar que tratamiento difiere del grupo, como se puede observar es el I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-dichlorofenoxiacético) con un nivel de significancia (p= 0.77), por lo cual se puede decir que I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-dichlorofenoxiacético) formó la mayor cantidad de callo (Anexo 4).

**Cuadro 3.8.-** Representación gráfica de del análisis estadístico HSD de Tukey para diferenciar el mejor tratamiento.



Para verificar si este tratamiento es el mejor, se realizaron pruebas estadísticas para las siguientes variables: tamaño de callo, y para variables cualitativas brillo, color y uniformidad de los callos obtenidos durante el proyecto.

El análisis estadístico para la variable, tamaño de callo, por medio del análisis de varianza ANOVA al 95% de confianza, indica que existe por lo menos un tratamiento que es diferente de los grupos, ya que se obtuvo un nivel de significancia estadística menor que el establecido (Tabla 3.21).

**Tablas 3.21.-** Análisis de Varianza ANOVA para la variable tamaño del callo.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	14.897	8	1.862	10.387	<b>0.000</b>
<b>Intra-grupos</b>	46.792	261	0.179		
<b>Total</b>	61.689	269			

SPSS versión 19

\*gl: grados de Libertad

\*F: frecuencia

\*Sig.: significancia

Por medio de la prueba confirmatoria HSD de Tukey (Tabla 3.22), proporciona que existe un tratamiento diferente del grupo.

**Tabla 3.22.-** Análisis HSD de Tukey para la variable tamaño de callo.

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
<b>I6</b>	30	0.0000				
<b>I5</b>	30	0.0577	0.0577			
<b>I9</b>	30	0.1477	0.1477			
<b>I4</b>	30	0.2180	0.2180	0.2180		
<b>I7</b>	30	0.3133	0.3133	0.3133	0.3133	
<b>I8</b>	30		0.3707	0.3707	0.3707	0.3707
<b>I1</b>	30			0.5290	0.5290	0.5290
<b>I2</b>	30				0.6400	0.6400
<b>I3</b>	<b>30</b>					<b>0.6907</b>
<b>Sig.</b>		0.102	0.103	0.108	0.074	0.087

SPSS versión 19

Una vez analizado por medio de las pruebas confirmatorias HSD Tukey, se puede explicar que el mejor tratamiento para inducir a callo es el tratamiento I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-dichlorofenoxiacético).

Obtenida esta información se realizó un análisis complementario de las variables cualitativas por medio de la tabla de contingencia y por la prueba Chi cuadrado, el cual indica si existe relación entre las variables y permite determinar cuál es el mejor tratamiento.

En el análisis por medio de Chi cuadrado (Tabla 3.23), se puede observar que las variables tratamiento y la variable brillo, las cuales se encuentran relacionadas ya que el nivel de significancia es menor a 0.05.

**Tabla 3.23.-** Análisis de variables cualitativas por de la prueba Chi cuadrado para las variables tratamiento y brillo.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
<b>Chi-cuadrado de Pearson</b>	43.322 <sup>a</sup>	8	<b>0.000</b>
<b>N de casos válidos</b>	270		

SPSS versión 19

\*gl: grados de Libertad

\*Sig: significancia

Para verificar cual es el mejor tratamiento entre esta prueba se realizó una tabla de contingencia el cual indica que el mejor tratamiento para la variable brillo es I6 (4mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético ), con este análisis se puede indicar, que el tipo de biorregulador influye directamente en el brillo de los callos formados (Tabla 3.24).



**Tabla 3.24.-** Tabla de contingencia para la variable brillo.

		BRILLO		Total
		no	si	
TRATAMIENTO	I1	17	13	30
	I2	22	8	30
	I3	14	16	30
	I4	23	7	30
	I5	28	2	30
	I6	30	0	30
	I7	20	10	30
	I8	22	8	30
	I9	29	1	30
<b>Total</b>		205	65	270

SPSS versión 19

Para las variables uniformidad se realizó el siguiente análisis estadístico:

En este análisis de medidas simétricas por la prueba de coeficiente de contingencia se puede decir que los tratamientos se encuentran relacionados entre las dos variables como se muestra en la tabla 3.25.

**Tabla 3.25.-** Análisis de coeficiente de contingencia para la variable uniformidad.

		Valor	Sig. aproximada
Tratamiento vs uniformidad	Coeficiente de contingencia	.354	0.000
<b>N de casos válidos</b>		270	

SPSS versión 19

Observando la tabla de contingencia (tabla 3.26) se puede mostrar que los mejores tratamientos para esta variable son I5, I6 (3 y 4 mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético respectivamente) e I9 (1+1 mg.L<sup>-1</sup> de la combinación de ácido 2,4-dichlorofenoxiacético + ácido naftalenacético) en donde se obtuvo mayor uniformidad de los callos formados con estos biorreguladores.

**Tabla 3.26.-** Tabla de contingencia para la variable uniformidad.

		UNIFORMIDAD		Total
		no	si	
TRATAMIENTO	I1	17	13	30
	I2	22	8	30
	I3	15	15	30
	I4	27	3	30
	I5	28	2	30
	I6	30	0	30
	I7	23	7	30
	I8	22	8	30
	I9	26	4	30
<b>Total</b>		210	60	270

SPSS versión 19

En este caso se prosiguió a analizar si el tipo de tratamiento se encuentra influenciando directamente al color de los callos formados, mediante la prueba Chi cuadrado, por medio de este análisis se verifica que tanto el biorregulador está directamente relacionado con el color que obtienen los callos, ya que el nivel de significancia es menor al establecido (Tabla 3.27).

**Tabla 3.27.-** Análisis de la prueba Chi cuadrado para variable cualitativa color.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
<b>Chi-cuadrado de Pearson</b>	146.692 <sup>a</sup>	64	<b>0.000</b>
<b>N de casos válidos</b>	270		

SPSS versión 19

- gl: grados de libertad

**Tabla 3.28.-** Tabla de contingencia para la variable color.

		TRATAMIENTO								
		I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9
COLOR	ninguno	13	10	6	23	28	30	20	18	25
	blanco	3	1	5	0	0	0	3	0	0
	café	5	6	4	2	0	0	3	3	3
	café y blanco	0	1	0	0	0	0	1	0	0
	café y crema	0	0	1	1	0	0	0	4	1
	café y verde	0	0	2	0	0	0	0	0	0
	crema	5	7	6	2	1	0	3	5	1
	crema y verde	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	verde	3	5	6	2	1	0	0	0	0
Total		30	30	30	30	30	30	30	30	30

SPSS versión 19

Por medio de la tabla de contingencia se verifica que cada tratamiento influye en el color de los callos formados, proporcionando una gama de colores (Tabla 3.28).

Para analizar qué color es el que proporciona mayor cantidad de callos embriogénicos se analiza mediante otra prueba Chi cuadrado para variables cualitativas (Tabla 3.29).

**Tabla 3.29.-** Prueba Chi cuadrado para variable Callo embriogénico y color.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
<b>Chi-cuadrado de Pearson</b>	53.029 <sup>a</sup>	8	<b>0.000</b>
<b>N de casos válidos</b>	270		

SPSS versión 19

Esta tabla expresa que existe correlación entre las dos variables callo embriogénico y color es decir que dependiendo del color sabremos cual es callo embriogénico (Tabla 3.30).

**Tabla 3.30.-** Tabla de contingencia para las variables callo embriogénico y color.

		CALLO EMBRIOGÉNICO	
		no	si
<b>COLOR</b>	<b>ninguno</b>	173	0
	<b>blanco</b>	9	3
	<b>café</b>	26	0
	<b>café y blanco</b>	2	0
	<b>café y crema</b>	7	0
	<b>café y verde</b>	2	0
	<b>crema</b>	27	3
	<b>crema y verde</b>	1	0
	<b>verde</b>	12	<b>5</b>

SPSS versión 19

Obtenido estos datos, se puede discutir que el tratamiento I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-dichlorofenoxiacético) proporcionó la mayor cantidad de callos pero de los cuales son embriogénicos los que presentaron callos de color verde.

### 3.3.1 Porcentaje de Callo embriogénico.

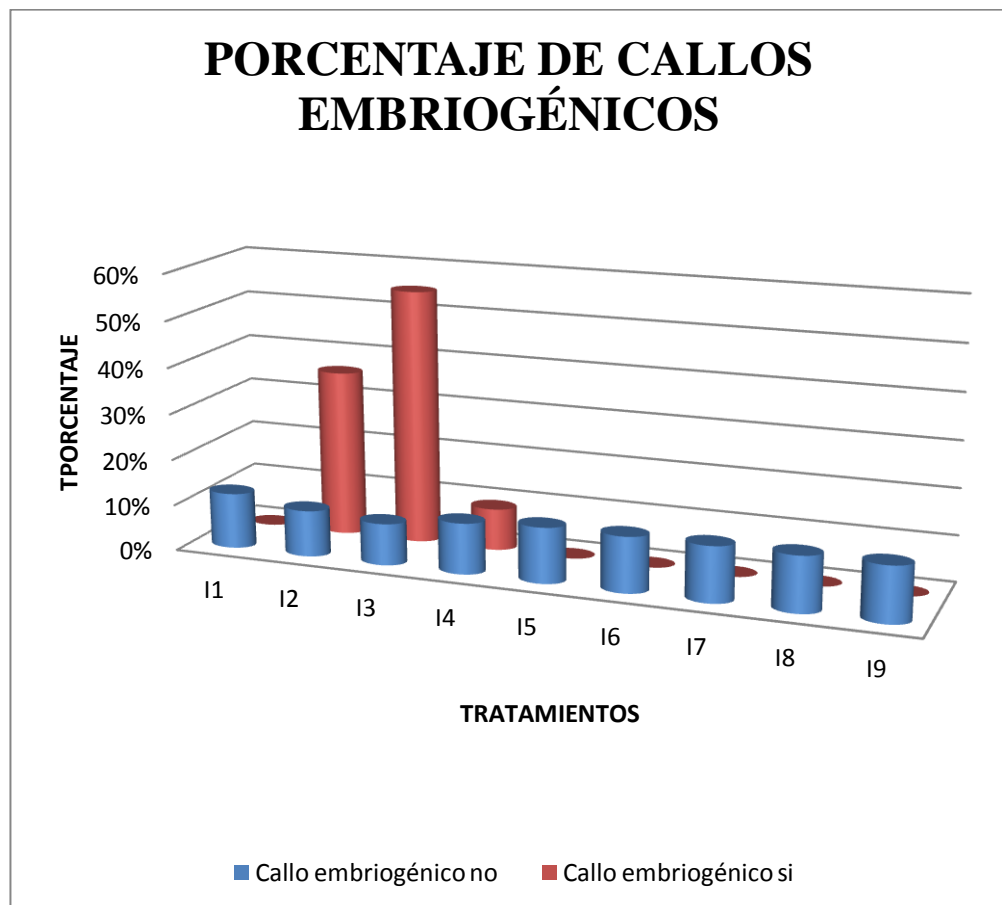
**Tabla 3.31.-** Porcentaje de callos embriogénicos inducidos con Auxinas.

TRATAMIENTO	Callo embriogénico	
	no	si
I1	12%	0%
I2	10%	36%
<b>I3</b>	<b>9%</b>	<b>55%</b>
I4	11%	9%
I5	12%	0%
I6	12%	0%
I7	12%	0%
I8	12%	0%
I9	12%	0%
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

SPSS versión 19

Una vez obtenidos los resultados de porcentajes más los análisis anteriormente realizados se puede establecer que el mejor tratamiento para la formación de callos embriogénicos es el tratamiento I3, el cual contiene medio MS suplementado con 2,4 D (ácido 2,4-dichlorofenoxiacético) en concentración de 4mg\*L<sup>-1</sup> (Cuadro 3.9).

**Cuadro 3.9.-** Representación grafica de los callos embriogénicos formados en esta etapa por medio, demostrando que el mejor tratamiento es el I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-dichlorofenoxiacético).



## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

### 4.1 ETAPA DE DESINFECCIÓN

En esta etapa se utilizó dos tipos de desinfecciones los cuales fueron hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno, por medio de estos se logró controlar la proliferación de hongos y bacterias en los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, para ello se necesitó realizar pre ensayos para definir con que porcentajes de hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno empezar a trabajar durante el proyecto.

Se utilizó como agente desinfectante al hipoclorito de sodio, ya que en cultivo de tejidos es muy utilizado, porque proporciona la muerte de microorganismos infecciosos como bacterias y hongos exógenos, permitiendo que exista un mayor índice de establecimiento en el material vegetal, a demás de ser efectivo éste producto es más económico y fácil de adquirir (Borges *et al.*, 2009).

El hipoclorito de sodio, debe ser usado a ciertas concentraciones ya que éste es un desinfectante muy fuerte es por ello que AMexBio, describe que la concentración máxima que se requiere para desinfectar material orgánico es al 1% v/v de hipoclorito de sodio.

Durante el proceso de investigación, el uso de diferentes concentraciones fue uno de los principales retos durante este proceso, para el cual se inició con concentraciones bajas de hipoclorito de sodio, al 0.25% v/v, siendo el tratamiento T1, el cual según los análisis estadísticos realizados en el capítulo 3 (etapa de desinfección), se verifica que no es un tratamiento idóneo para desinfectar embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, pero el tratamiento T2 que contiene una concentración de 0.5% v/v de hipoclorito de sodio, permitió que estas

semillas al ser sumergidas por 10 minutos en este desinfectante inhiban el crecimiento de hongos exógenos, bacterias y aún mejor se evitó la necrosis de los embriones, siendo el mejor tratamiento para desinfección, al usar 0.75% v/v de hipoclorito de sodio, se provocó la muerte de los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, en este caso se puede decir que para semillas de cedro andino este tratamiento no es efectivo, es por ello que se debe usar concentraciones de hipoclorito de sodio mayores a 0.5 y menores a 0.75% v/v.

El tratamiento T2 (0.5% de hipoclorito de sodio), fue utilizado en la etapa de inducción a callo embriogénico, ya que para la etapa de germinación el hipoclorito de sodio, provocó que las semillas de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz se mantuvieran en letargo, provocando la pérdida de material de investigación.

García *et al.*, (2008), explica que el uso de peróxido de hidrógeno como agente de desinfección da buenos resultados en semillas forestales. Esto se debe a que el  $H_2O_2$ , tiene más capacidad de oxidación que el cloro y que el dióxido de cloro, debido a sus fuertes propiedades oxidativas, por lo que se emplea como agente desinfectante (Sánchez, 2009).

Las moléculas del  $H_2O_2$ , son degradables en agua, ya que liberan oxígeno molecular y agua sin dejar residuos tóxicos. Este compuesto debe ser usado en concentraciones bajas ya que si se usa a concentraciones de 10% y 20% v/v este puede provocar quemaduras a los tejidos expuestos al  $H_2O_2$ , es por ello que en el proyecto se usó tratamientos con concentraciones de 1-3% v/v para verificar cual provoca la eliminación de microorganismos sin dañar los tejidos del embrión de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, se conoce que este compuesto es bactericida, virucida y fungicida; para que este químico funcione efectivamente se necesita de un factor importante, la agitación, este factor asegura que exista un suministro de oxígeno adecuado (Sánchez, 2009).



Cuando se utiliza la agitación bajo la presencia de un desinfectante se reduce los grados de infección por microorganismos (Riofrío, 2004).

Como se puede observar en el capítulo 3 (tabla 13), el mejor tratamiento para la desinfección es T7 que corresponde al uso de peróxido de hidrógeno en concentración de 3% v/v, el cual fue utilizado para la germinación *in vitro* de los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, esto se debe a que el peróxido de hidrógeno tiene la capacidad de esterilización de las semillas sin causar estrés ni la necrosis de los embriones, también ya que este puede ayudar a la germinación de algunas semillas forestales (García *et al.*, 2008).

Además dentro de ésta etapa de desinfección se utilizó, otro agente desinfectante, alcohol, el cual en cultivo de tejidos es muy utilizado por su gran eficacia para la eliminación de microorganismos patógenos, se cataloga a este compuesto como bactericida, fungicida y virucida (AMexBio, 2010).

García *et al.*, (2008), en su investigación sobre la germinación *in vitro* de *Nolina parviflora*, realizan tratamientos de desinfección con ayuda de alcohol a concentraciones de 70 y 80 %, favoreciéndoles en los resultados, pero en el caso de *Cedrela montana* al usar alcohol con estos porcentajes en la etapa de pre ensayos, se pudo evidenciar la presencia de contaminación es por ello que en cada uno de los tratamientos de desinfección, se usó alcohol etílico al 90% por un tiempo de 30 segundos seguidos de tres lavados con agua destilada, ya que si se los deja por más tiempo estos embriones pueden llegar a necrosarse, provocando pérdida de material de estudio.

## 4.2 ETAPA DE GERMINACIÓN

En la etapa de germinación se usó peróxido de hidrógeno como agente desinfectante, ya que tiene un efecto de estimulación en la germinación de las semillas especialmente de especies forestales (García *et al.*, 2008), el uso de este compuesto se debe realizar a concentraciones del 1% v/v (Willan, 2012), durante el proyecto, la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usada fue al 3% v/v, debido a que presentó mejor estabilidad en las semillas de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, esto se debe a que el peróxido de hidrógeno aumenta la permeabilidad del agua y oxígeno facilitando a nivel celular la oxidación de grasas y su conversión a carbohidratos, lo que promueve la activación de enzimas y reacciones sintéticas esenciales para la movilización de componentes celulares involucrados en el crecimiento de la raíz (FAO, 2012).

Cuando se habla de germinación, se está refiriendo al proceso que sufren las semillas, el cual implica el aislamiento del embrión que se encuentran en estado de latencia y su posterior germinación todo esto de manera *in vitro*, con el fin de obtener una planta totalmente capaz de desarrollarse y realizar los procesos fotosintéticos, se realiza este proceso *in vitro* con el principal objetivo de acortar los ciclos de germinación y para rescatar material que esté en peligro de extinción o vulnerables como el caso de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Ésta técnica es útil para inducir la germinación semillas en letargo, superando las restricciones ocasionadas por la cubierta de la semilla o por su endospermo (Sánchez *et al.*, 2004), en éste caso en *Cedrela montana* Moritz ex Turcz posee una testa muy fina pero su endospermo es grueso y es el que retarda su germinación lo cual provoca que este forestal empiece su ciclo a partir de los 15 a 30 días de su siembra, o a veces se interrumpe por completo el ciclo manteniéndolo en letargo permanentemente.

Dentro de ésta técnica es imprescindible saber el desarrollo de los embriones en el caso de la investigación se conoce que cedro andino posee una germinación de tipo epigea, ya que con esto se puede determinar los requerimientos necesarios del medio de cultivo a utilizar.

Uno de los medio de cultivo más conocidos hasta la actualidad, es el medio de Murashige y Skoog (MS), ya que este medio puede ser modificado según los requerimientos de los embriones, como por ejemplo: se puede modificar la concentración de sacarosa, concentración de hormonas vegetales e incluso vitaminas según las necesidades de cada especie (Roca *et al.*, 1991).

Es por ello que se ha usado como medio base al medio Murashige y Skoog (MS) al 100%, el cual fue suplementado con reguladores de crecimiento como el ácido giberélico (AG3), brasinolida (BRA) y agua de coco, dando como mejor resultado los tratamientos que poseían biorreguladores de AG3 y BRA, en un porcentaje de germinación igual al 67 y 77% respectivamente, con una tasa de energía germinativa que corresponde al 12% de AG3 y 14 % de BRA, con esto se puede decir que los tratamientos G3 (3mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico) y G5 (2mg.L<sup>-1</sup> de brasinolida) han demostrado ser los mejores tratamientos, permitiendo que los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz germinen a partir de los 6 días de introducidos en el medio de cultivo, lo cual favoreció a la germinación epigea de cedro andino, estas plantas germinadas fueron capaces de desarrollarse de manera *in vitro* con las condiciones de luz, oscuridad, temperatura y humedad proporcionadas por el laboratorio de investigación.

En ciertas investigaciones realizadas para la germinación *in vitro* para forestales, han utilizado al ácido giberélico como regulador de crecimiento en embriones maduros, permitiéndoles mejorar la energía germinativa de

estas especies, ya que este fitorregulador es conocido como la principal hormona para inducir la germinación (Vidales, 2003).

En este forestal de cedro el ácido giberélico dio buenos resultados como se puede evidenciar (Anexo 3), pero la cantidad de germinación no fue en un 100% es decir que se obtuvo pérdida de material, con lo cual se debe analizar si al medio MS suplementado con ácido giberélico se le debe adicionar otros componentes para que la germinación de esta semilla sea en un 100%.

En cambio la brasinolida conocida como BRA, es un regulador hormonal el cual ha sido utilizado en la micropropagación de especies forestales (Jordán, 2006) dando muy buenos resultados, pero en este caso tratándose de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, ésta hormona ha sido investigada en el proyecto para saber su efecto en la germinación el cual fue muy beneficioso ya que permitió los mejores resultados de germinación, permitiendo obtener una planta completa es decir con hojas, tallos, raíz primaria y raíces secundarias bien definidas.

Mientras que el agua de coco es muy rico en nutrientes y su composición específica depende de la madurez del fruto, a menor madurez mayor concentración de nutrientes éste producto contiene citoquininas que son las hormonas encargadas de promover la ruptura de la dormancia y la germinación de semillas además que estimulan la elongación de las células de los cotiledones (Quinto *et al.*, 2009), normalmente ésta agua deber ser esterilizada por medio de filtración ha sido benéfica en el cultivo de embriones (Roca *et al.*, 1991), en este caso durante la investigación el agua de coco fue autoclavado lo cual puede haber influenciado en el proceso ya que este producto no provocó ningún efecto en los embriones de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, en el estudio se puede evidenciar (Anexo3) que el agua de coco solamente permitió que las semillas de cedro formaran la radícula más no permitió la germinación epigea

esperada, se puede decir que este compuesto no es idóneo para este tipo de forestal.

El efecto de los reguladores vegetales en el crecimiento de embriones no es muy claro, pero se ha sugerido que el control hormonal se encuentra relacionado con el control físico (Roca *et al.*, 1991). Es por ello que la germinación en los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, ha dado una planta físicamente idónea capaz de desarrollar sus estructuras principales como raíz principal y secundaria, un tallo cuyo tamaño es mayor a 1 cm y la formación de hojas verdaderas, permitiendo a cedro andino ser una planta capaz de realizar por sí sola las reacciones de fotosíntesis.

#### **4.3 ETAPA DE INDUCCIÓN A CALLO**

En ésta etapa de investigación se realizó la inducción a callo embriogénico de los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, para la desinfección de éste forestal se usó al tratamiento de hipoclorito de sodio con concentración del 0.5% v/v, el cual fue evaluado en la etapa de desinfección y arrojó los mejores resultados, como se mencionó anteriormente el hipoclorito de sodio es muy buen desinfectante ya que es muy fuerte y elimina a todo tipo de microorganismos, es por ello que se usó en esta etapa ya que se debía esperar un período de 60 días para ver resultados satisfactorios, mientras que el peróxido de hidrógeno mostró tener efecto desinfectante, pero los embriones empezaron a formar hongos pasado los 30 días de establecidos los tratamientos.

Como dijo Haberlandt en 1902 “Teóricamente todas las células vegetales son capaces de dar origen a una planta completa” (Roca *et al.*, 1991). Durante la inducción la porción de la planta donante cultivada *in vitro* cambia su patrón de expresión y genera embriones somáticos, en la

mayoría de las especies la embriogénesis somática se obtiene a partir de embriones cigóticos inmaduros (Celestino *et al.*, 2001), en la presente investigación el uso de embriones inmaduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, no se llevó a cabo debido a la época en la que se inició el estudio, por ello se realizó con embriones cigóticos maduros de esta especie forestal.

La fase de inducción se ve relacionada directamente entre el tipo, concentración y combinación de reguladores de crecimiento agregados al medio de cultivo y al órgano a desarrollar. Es por ello que la organogénesis indirecta, está involucrada con el uso de ciertas hormonas, en algunas investigaciones han evidenciado que el uso de auxinas estimulan la iniciación del callo embriogénico (Litz, *et al.*, sin año), por lo que en la investigación fue llevada a cabo con el uso de auxinas como: ácido 2,4-dichlorofenoxiacético y ácido naftalenacético.

Durante el análisis de resultados se obtuvo que el mejor tratamiento fue I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-dichlorofenoxiacético) ya que produjo un 55% de callos los cuales fueron embriogénicos, se dice que es embriogénico siempre y cuando presente ciertas características a nivel celular como una gran cantidad de ribosomas, citoplasma denso, un nucléolo agrandado y pequeños granos de almidón, estas células por lo general se agrupan y varían de tamaño (Radice, 2004).

En el caso de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz se obtuvieron callos embriogénicos que presentaron estas características (Anexo 4) a partir del tratamiento I3 (4mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-dichlorofenoxiacético), siendo capaz de realizar la división celular a partir de los embriones maduros de cedro andino, mientras que al usar ácido naftalenacético a diferentes concentraciones, y la combinación de 2,4-dichlorofenoxiacético y ácido naftalenacético no se obtuvo callos embriogénicos o se formaron callos pero no embriogénicos, esto se debe a que no todas las especies

reaccionan de la igual manera así pertenezcan a la misma familia como en las investigaciones realizadas por Daquinta (2004), en cedro rojo.

La cantidad de callos formados con estos biorreguladores fue muy baja esto se debe a que no todas las especies pueden manifestarse con la presencia de auxinas para la división celular (Roca *et al.*, 1991) o se puede deber a otros factores que intervinieron en el desarrollo de los callos, como explica Radice (2004), el genotipo, el tipo de explante, condiciones físicas y químicas del cultivo.

Pero uno de los principales factores limitantes en la formación de callo embriogénico para *Cedrela montana* Moritz ex Turcz puede haber sido provocado por la atmósfera gaseosa ya que como explica Radice (2004), está condicionada por el tipo y tamaño de envase seleccionado así como también el sistema de cobertura del mismo. En condiciones *in vivo* la atmósfera contiene 78 % de nitrógeno; 21 % de oxígeno y 0,035 % de dióxido de carbono. En cultivos *in vitro* se han registrado, además, etileno y otros compuestos hidrocarbonados.

Otro factor que pudo haber influenciado en la inhibición de callo, son las condiciones de luz ya que al estar los embriones sellados y bajo oscuridad permanente promueven la concentración de CO<sub>2</sub> y al existir una gran cantidad de dióxido de carbono puede ser tóxico para los embriones y la división celular (Radice, 2004), en el caso de éste estudio la condiciones de luz fue totalmente nula ya que se colocó a los embriones bajo la oscuridad total, por lo que pudo haber influenciado a una baja formación de callo embriogénicos de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Es por ello que se necesita investigar con que otros tipos de hormonas vegetales se puede fomentar a la división celular, algunos autores describen que los brasinoesteroides tiene la capacidad promover a la división celular (Jordán *et al.*, 2006).

Sería de mucho interés utilizar los embriones de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz en presencia de estas hormonas acompañados de auxinas para promover la formación de callos embriogénicos de este forestal.



## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- ❖ Los embriones desinfectados con hipoclorito de sodio al 0.5 % v/v y con peróxido de hidrógeno al 3% v/v, presentaron un porcentaje de contaminación del 2.3% y 3.9% respectivamente, permitiendo la desinfección de los embriones maduros de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, sin provocar pérdida de material para investigar.
- ❖ El uso de etanol al 90% por 30 segundos permitió aun más la desinfección de los embriones, eliminando mayor cantidad de bacterias y hongos lo cual facilitó el cultivo *in vitro* de los mismos.
- ❖ La utilización de Brasinolida y Ácido Giberélico como biorreguladores en la etapa de germinación, permitió obtener un porcentaje de germinación del 67 y 77%, lo cual favoreció para la obtención de plantas completamente desarrolladas, con raíz primaria, secundaria, tallo y hojas, permitiendo ser una planta capaz de llevar a cabo su fotosíntesis.
- ❖ La hormona brasinolida en presencia del medio básico Murashige y Skoog (1962), dio los mejores resultados en la elongación, formación de hojas y presencia de raíces en la etapa de germinación de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.
- ❖ Los tratamientos G3 (3mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico) y G5 (2 mg.L<sup>-1</sup> de brasinolida) presentaron una energía germinativa del 12 y 14% respectivamente, lo cual permite que esta especie deje su estado de latencia a partir de los seis días de ser expuestos a estos biorreguladores.
- ❖ En los tratamientos de inducción a callo embriogénico las concentraciones de 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D conocido como ácido 2,4-dichlorofenoxiacético, fueron las que presentaron una mayor inducción y

proliferación de callo, a diferencia de los tratamientos que poseían ANA (ácido naftalenacético) y la combinación de las dos auxinas.

❖ El color, el brillo y la uniformidad del callo, permiten distinguir a simple vista si es o no callo embriogénico, el color que permite saber que se está formando la embriogénesis es cuando presenta un callo de color verde o blanquecino pero siempre con presencia de brillo.

❖ La tinción acetocarmín mostró que es una solución muy eficiente ya que con éste se distinguieron las células embriogénicas de los callos formados.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Se recomienda mantener todas las condiciones de asepsia durante la introducción de los embriones zigóticos en la cámara de flujo laminar para evitar fuentes de contaminación externa que alteren los resultados de la investigación.

En la fase de germinación se puede recomendar que una vez obtenidas las plantas éstas sean micropropagadas para tener plantas libres de patógenos y de pesticidas, y con esto tener un banco de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz el cual va a contribuir a preservar la especie.

Es importante continuar con la investigación de la embriogénesis somática en forestales como el caso de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, ya que se podría obtener una gran cantidad de individuos a corto de tiempo, favoreciendo así a la reforestación de especies vulnerables o en peligro de extinción.

En ésta investigación se obtuvo callos pero no todos fueron embriogénicos, por lo que se recomienda analizar las condiciones físicas y fisiológicas responsables para la obtención de callos embriogénicos y con qué combinaciones de hormonas vegetales se puede obtener mayor cantidad de callos, para que a futuro se pueda obtener una semilla artificial de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz.

Se recomienda investigar a la hormona brasinolida, como parte del proceso de callogenesis ya que ésta hormona sirve para la división celular según investigaciones, siempre y cuando este combinado con auxinas o citoquininas.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, Camila. (2011). Hormonas Vegetales. Extraído: 21 de Diciembre del 2011, de <http://mundodebiologos.blogspot.com/2011/03/hormonas-vegetales.html>

AMEXBiO. (2008). Seguridad biológica. Sociedad de Biología de México. Extraído: 28 de enero del 2012, de <http://seguridadbiologica.blogspot.com/p/asociacion-mexicana-de-biosecuridad-ac.html>

Borges, G.M., Estrada, A.E., Pérez, R.I., Meneses, R.S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de dioscorea alata l, clon caraqueño. Revista colombiana de biotecnología. Universidad nacional de Colombia- vol. xi, núm. 2. pp. 127-135.

Borrajo, Celina. Ing. (2006). Manual técnico de plantaciones forestales. Argentina. Extraído: 21 de diciembre del 2011, de <http://www.pnuma.org/manualtecnico/pdf/59.pdf>.

Cárdenas, L. D & Salinas N. R. (Eds.). (2007). Libro Rojo de plantas de Colombia. Volumen 4. Especies maderables amenazadas: primera parte. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI – Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Pp-232.

Carrere, Ricardo. (1999). Deforestación y monocultivos forestales en Ecuador. Extraído el 27 de enero del 2011, de <http://www.wrm.org.uy/paises/Ecuador/venas.html>.

Castillo, Alicia. Msc. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Investigadora, Unidad de Biotecnología. INIA. Extraído: 2 de enero del 2011, de [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf).

Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López- Vela, D., Jiménez, J., Legre, J., Vieira- Peixe, A., Zavattieri, A. & Toribio, M. (2001). La embriogénesis somática como vía de regeneración clonal de especies forestales mediterráneas. Extraído el 31 de marzo del 2011, de <http://www.scielo.oces.mctes.pt/pdf/rca/v30n1/v30n1a51.pdf>.

Chávez, Lucia. (2004). La Germinación In Vitro una Alternativa para Obtener Explantes en Cactáceas. Departamento de Biología celular y genética. Facultad de Ciencias Biológicas UANL. Monterrey –México.

CORPEI. (2005). La oferta del Ecuador. Extraído el 31 de marzo del 2011, de <http://www.cccuenca.com.ec/descargas/indicadores/indicadoresmadera.pdf>.

Daquinta, Marcos. (2004). Formación de callos a partir de inflorescencias inmaduras en Cedro y Caoba híbrida. Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Cuba.

FAO, (2012). Guía para la manipulación de semillas forestales con especial referencia a los trópicos. Compilado por Willan. R, para el centro de semillas forestales de DANIDA.

García, Breijo., Santamarina, Siurana., Pilar, María., Caselles, Josefa y Francisco, José. (2006). Histología Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia.

García, F.A., Álvarez, M.J., Rodríguez de la O, J.L., Corona, A.A. (2008). Germinación in vitro de semillas de Nolina parviflora (h.b.k.) hemsl. Universidad Veracruzana, vol. 10. núm. 2. pp. 27-33.

García, J.M. (2002). Introducción al cultivo de Tejidos. Versión 1.11. Extraído; 21 de diciembre del 2011, de <http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf>.

González, Ana María., Raisman, Jorge y Aguirre, Marisa. (1999). Hormonas de las plantas. Extraído: 21 de Diciembre del 2011, de <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm>.

González, Carlos., De Francesco, Virginia. (2000). Embrión y Plántulas de Monocotiledóneas y Dicotiledóneas. Trabajos Prácticos de Botánica. CNBA. Extraído: el 10 de mayo del 2011, de <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Trabprac/trab-prac.htm>.

Guerra, Darwin. (2009). Crecimiento inicial de cuatro especies forestales: Cedrela montana Moritz ex Turcz., Alnus acuminata Kuntz, Croton spp, y Pinus radiata D. Don, en y sin asocio con cultivos agrícolas, en el cantón Otavalo periodo 2008-2009. Facultad de ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Universidad Técnica del Norte.

Gutiérrez, Antonietta., Muñoz Tuesta, S. (2000). Avances en la transformación genética de especies maderables: Cedro (Cedrela odorata Linnaeus). Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.

Irizarry, Morales Juan. (2004). Las Semillas. Departamento de Tecnología agrícola. Universidad de Puerto Rico en Utuado.

Kómetter, Roberto. Sin año. Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Perú- ECOBONA. Extraído: 8 de marzo del 2012, de <http://es.scribd.com/doc/73036189/29/Cedro-de-altura-Cedrela>.

Ligia, Martha., Restrepo, Juan. & Toro, Murillo. (2011). Manejo de las semillas y la propagación de diez especies forestales del Bosque Andino. Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia- Corantioquia.

Loyola-Vargas, Víctor M., De La Peña, C., Galaz- Ávalos, R. M., and Quiroz-Figueroa, F. R. (2011). Plant Tissue Culture. Extraído: el 21 de marzo del 2011, de <http://es.scribd.com/doc/36593191/Plant-Tissue-Culture>.

Martínez, Bou Daniel & Maier, Camila. (2012). El mundo de las plantas, Botanical on line.

Mauseth, J.D. (2003). Botany and Introduction to plant Biology. 3 era Edición. Massachusetts.

Mercedes, María., González, Ana María. (2008). Morfología de plantas vasculares. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Ministerio del Ambiente. (2006). Ecuador Forestal. Extraído el 31 de marzo del 2011, de <http://ecuadorforestal.org/informacion-s-fe/ecuador-una-potencia-forestal/>.

Morgan, W.M. (2008). Cultivo de tejido vegetal. Traducción del trabajo del International Plant Laboratories, Baltonsborough, UK.



Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN). (2010). Áreas Naturales del Distrito Metropolitano de Quito: Diagnóstico Biotecnológico y Socio Ambiental. Secretaria del ambiente. Fondo Ambiental 2010.

Ordoñez, Luis., Arbeláez, María & Prado, Lenin. (2004). Manejo de Semillas Forestales Nativas de la Sierra del Ecuador y Norte del Perú. EcoPar- Fosefor- Samiri. Quito, Ecuador.

Portillo, Liberato. (2000). Plántulas de embriones somáticos de Agave tequilana Weber generadas en biorreactor (Orbitabion). Biotecnología Vegetal. Extraído: el 4 de mayo del 2011, de <http://www.modbioveg.go.to/>.

Prado, Lenin., Valdebenito, Hugo. (2000). Contribución a la fenología de especies forestales nativas Andinas de Bolivia y Ecuador. Fosefor. Quito-Ecuador. Programa Andino de fomento de semillas forestales Cosude/Intercooperation. pp. 62-64.

PROMABOS. (2001). Árboles melíferos para reforestar. Extraído el 31 de marzo del 2011, de [http://www.bio.uu.nl/promabos/arbolesmeliferos/pdf files/Cedro.PDF](http://www.bio.uu.nl/promabos/arbolesmeliferos/pdf_files/Cedro.PDF).

Quinto, L., Martínez P, A., Hernández, L., Pimentel, Bribiesca., Rodríguez D, A., Trejo. 2009. Alternativas para mejorar la germinación de semillas de tres árboles tropicales. Universidad Autónoma Chapingo. MÉXICO.

Radice, Silvia. (2004). Morfogénesis in vitro. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Extraído: el 10 de mayo del 2011, de <http://www.biblioteca.org.ar/libros/150404.pdf>.

Riofrío, M. (2004). Growing peppers in the homegarden. Chile. Extraído: 29 de enero del 2012, de [www.g6csy.net/chile/growing.htm](http://www.g6csy.net/chile/growing.htm).

Roca, W. & Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Colombia: CIAT. p. 296-299.

Rodríguez, J., Nieto, V. (2003). Cedrela montana Moritz ex Turcz. Corporación Nacional de Investigación Forestal. Bogotá-Colombia. Extraído: el 21 de marzo del 2011, de <http://es.scribd.com/doc/22409704/Caracteristicas-Cedrela-Montana>.

Rosth. (1997). Tipos de germinación de "Plant Biology". Wadsworth Publishing Company.

Sánchez & J.M. (2004). Producción de bioinsecticida a base de bacillus thuringiensis; mini revisión. Extraído: 3 de enero del 2012, de <http://monografias.com/trabajos15/bionsecticida/bioinsecticida.shtml>.

Sánchez, Manuel., Ríos, D., Pedraza, M., Pereira, G., Castellanos, H., y Escobar, R. (2004). Propagación in vitro de Nothofagus procera (Poepp. ET Endl.) Oerst. a partir de embriones aislados. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile.

Segretín, María Eugenia. (2004). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). INGEBI-CONICET - Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA. Extraído: 21 de diciembre del 2011, de <http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>.

Stern, K.R, Jansky S,y Bidlack, J.E. (2003). Introductory plant biology. 9<sup>th</sup> ed. Boston. McGraw- Hill.

Trujillo, Enrique. Msc. 2011. Cedro de Altura, Uno de los gigantes forestales de América. Extraído: 10 de marzo del 2012, de [www.revista-mm.com](http://www.revista-mm.com).

Vidales, Martín. 2003. Regulación hormonal en las plantas. Función de relación en el reino Metafitas. Biología y Geología. Argentina.