



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORA: VILLAMAR FLORES LIZETH ANALÍA

**TEMA: ESTANDARIZACIÓN DE LAS ETAPAS DE
MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LA GUABA (*Inga
insignis*) ENDÉMICA DE LA PROVINCIA DE IMBABURA.**

DIRECTOR: ING. PEÑA PONTÓN, CRISTIAN.

CODIRECTOR: ING. – MAT. ROMERO SAKER, PEDRO.

SANGOLQUÍ, MAYO 2014

CERTIFICACIÓN

Ing. Cristian Peña Pontón

Ing. – Mat. Pedro Romero Saker

Certifican:

Que el trabajo titulado “Estandarización de las etapas de micropropagación *in vitro* de la guaba (*Inga insignis*) endémica de la provincia de Imbabura”, realizado por el Srta. LIZETH ANALIA VILLAMAR FLORES como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Lizeth Analía Villamar Flores que lo entregue a la M.Sc. María Augusta Chávez, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, mayo de 2014

Ing. Cristian Peña Pontón
DIRECTOR

Ing. –Mat. Pedro Romero Saker
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, LIZETH ANALÍA VILLAMAR FLORES

Declaro que:

El proyecto denominado “Estandarización de las etapas de micropropagación *in vitro* de la guaba (*Inga insignis*) endémica de la provincia de Imbabura”, ha sido desarrollado en base a una investigación científica exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente, este trabajo es de mi autoría.

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

Sangolquí, mayo de 2014

Lizeth Analia Villamar Flores

AUTORIZACIÓN

Yo, LIZETH ANALIA VILLAMAR FLORES

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, la publicación en la biblioteca virtual de la institución, del trabajo “Estandarización de las etapas de micropropagación *in vitro* de la guaba (*Inga insignis*) endémica de la provincia de Imbabura”, cuyos contenidos y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, mayo del 2014

Lizeth Analía Villamar Flores

DEDICATORIA

*A mis padres por todo su amor, y apoyo incondicional.
Y a mi pequeño hijo Martín por ser mi luz y mi alegría.*

Lizeth Analía Villamar Flores

AGRADECIMIENTO

A mis padres, Martha y César por todo su esfuerzo y sacrificio en mi formación personal y académica.

A mis hermanos, Marcelo, Diana, Xavier porque siempre han estado ahí para mí.

Al laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad Central del Ecuador, por permitir el desarrollo de esta investigación, especialmente a la Ing. Isabel Ordoñez, por su paciencia y guía durante la elaboración de este estudio, sin ella no sería esto posible.

Al Ing. Pedrito Romero e Ing. Cristian Peña por su ayuda en la elaboración de este proyecto.

A mi novio Gustavo, por ser mi amigo y mi confidente.

A mis amigos, especialmente a Mayte Salinas, por su apoyo y amistad incondicional durante la carrera, así como Stefy Peña ya que gracias a ella pude realizar hallar este tema de tesis.

A Fer Guano y Susi Araujo porque me brindaron su amistad sincera en el momento más importante de mi vida.

Lizeth Analia Villamar Flores

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE TABLAS	ix
LISTADO DE FIGURAS	xvi
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xx
CAPÍTULO 1:	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos de la investigación	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Marco teórico.....	4
1.4.1 Características generales de la especie en estudio	4
1.4.2 Suelos y topografía.....	7
1.4.3 Métodos de propagación convencional	8
1.4.4 Tecnología de cosecha y pos-cosecha	10
1.4.5 Principales plagas y enfermedades.....	10
1.4.6 Importancia de la especie.....	11
1.4.7 Usos y propiedades.....	12
1.4.8 Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	17

1.4.9 Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	25
1.4.10 Cultivo <i>in vitro</i> de forestales.....	31
1.5 Hipótesis de la investigación	33
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2.1 Ubicación geográfica de la investigación.....	34
2.2 Selección de plantas donadoras del material vegetal.....	34
2.3 Recolección del material vegetal.....	35
2.4 Etapa I: desinfección	35
2.5 Etapa II: establecimiento - inducción de brotes	40
2.6 Etapa III: multiplicación.....	42
2.7 Etapa IV: enraizamiento	45
2.8 Análisis Estadístico.....	47
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	49
3.1 Etapa I: desinfección	49
3.1.1 Contaminación.....	49
3.1.2 Viabilidad.....	54
3.2 Etapa II: establecimiento - inducción de brotes	58
3.2.1 Tiempo a la brotación	58
3.2.2 Número de brotes.....	63
3.3 Etapa III: multiplicación.....	68
3.3.1 Tiempo a la brotación	68
3.3.2 Número de brotes.....	72
3.3.3 Altura de brotes	77
3.4 Etapa IV: enraizamiento	83
3.4.1 Tiempo al enraizamiento	83
3.4.2 Longitud de la plántula	86

3.4.3 Longitud de la raíz promedio	88
3.4.4 Número de raíces	91
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	95
4.1 Etapa I: desinfección	95
4.1.1 Contaminación.....	95
4.1.2 Viabilidad.....	97
4.2 Etapa I: establecimiento - inducción de brotes	98
4.2.1 Tiempo a la brotación	99
4.2.2 Número de brotes.....	100
4.3 Etapa III: multiplicación.....	101
4.3.1 Tiempo a la brotación	102
4.3.2 Número de brotes.....	103
4.3.3 Altura de los brotes.....	105
4.4 Etapa IV: enraizamiento	108
4.4.1 Tiempo de enraizamiento	109
4.4.2 Longitud de la plántula	110
4.4.3 Longitud de la raíz promedio	110
4.4.4 Número de raíces	111
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	113
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	115
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	116
CAPÍTULO 8: ANEXOS	¡Error! Marcador no d

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1: Análisis del ecotipo 16 (<i>Inga insignis</i>) (Toaquiza, 2007).	12
Tabla 1.2: Valor nutricional del arilo de guaba (<i>Inga sp.</i>) (Bressani, 2010).	14
Tabla 1.3: Análisis químico proximal de las diferentes fracciones del fruto de guaba (<i>Inga sp</i>) (Bressani, 2010).	14
Tabla 1.4: Análisis de minerales de las diferentes fracciones del fruto de guaba (<i>Inga sp.</i>) (Bressani, 2010).	15
Tabla 1.5: Composición química y cinética de la fermentación de las partes vegetativas de <i>Inga sp.</i> (Rosales, 1997).	15
Tabla 2.1: Tratamientos de desinfección de los explantes de guaba (<i>Inga insignis</i>) en la fase de establecimiento empleando dos concentraciones de hipoclorito de sodio y dos tiempos de inmersión.	37
Tabla 2.2: Composición del medio Murashinge & Skoog (1962)	38
Tabla 2.3: Tratamientos a ser evaluados para el establecimiento - inducción de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>).	41
Tabla 2.4: Tratamientos para la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).	44
Tabla 2.5: Tratamientos para la fase de enraizamiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).	46
Tabla 3.1: Tabla de contingencia para la variable contaminación respecto a los tratamientos de desinfección de segmentos nodales de guaba (<i>Inga insignis</i>).	50
Tabla 3.2: Prueba de chi - cuadrado para la contaminación con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio.	52
Tabla 3.3: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los explantes no contaminados respecto los tratamientos de desinfección empleados en los explantes de guaba.	52
Tabla 3.4: Prueba de Kruskal-Wallis para la variable contaminación.	53

Tabla 3.5: Prueba de Kruskal-Wallis para los explantes contaminados en los tratamientos de desinfección de guaba (<i>Inga insignis</i>).....	53
Tabla 3.6: Regresión logística para los datos categóricos de contaminación en los tratamientos de desinfección de yemas de guaba (<i>Inga insignis</i>).	53
Tabla 3.7: Tabla de contingencia para la variable viabilidad, respecto a los tratamientos de desinfección para el factor medios de cultivo, para la variable número de brotes, durante la fase de inducción de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>).....	54
Tabla 3.8: Prueba chi – cuadrado para la viabilidad con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio- tiempo de inmersión.	56
Tabla 3.9: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los explantes viables respecto los tratamientos de desinfección empleados en los explantes de guaba.....	57
Tabla 3.10: Prueba de Kruskal–Wallis para la variable viabilidad.	57
Tabla 3.11: Regresión logística para los datos categóricos de viabilidad en los tratamientos de desinfección de segmentos nodales de guaba (<i>Inga insignis</i>).	58
Tabla 3.12: Tabla de contingencia de tiempo a la brotación promedio en la fase de inducción de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de BAP y medio de cultivo.	59
Tabla 3.13: Análisis de la varianza para la variable tiempo a la brotación en la fase de inducción de brotes guaba (<i>Inga insignis</i>).	61
Tabla 3.14: Prueba de Duncan al 5% para el factor medios de cultivo para la variable tiempo a la brotación, durante la fase de inducción de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>).	61

Tabla 3.15: Prueba de Duncan al 5% para el factor dosis de BAP en la variable días a la formación de brotes, durante la fase de establecimiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).	62
Tabla 3.16: Test de Duncan al 5% para el factor interacción medios de cultivo x dosis de BAP, para la variable en la variable días a la formación de brotes, durante la fase de inducción de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>).	62
Tabla 3.17: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los días a la brotación respecto los tratamientos de la fase de establecimiento empleados en la micropropagación de guaba.	63
Tabla 3.18: Tabla de contingencia de número de brotes promedio en la fase de establecimiento de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de BAP y medio de cultivo.....	64
Tabla 3.19: Análisis de varianza para la variable número de brotes; durante la fase de inducción de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>).	66
Tabla 3.20: Prueba de Duncan al 5% para el factor medios de cultivo, para la variable número de brotes, durante la fase de inducción de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>).	66
Tabla 3.21: Duncan al 5% para el factor dosis de BAP, para la variable número de brotes, durante la fase de inducción de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>).	67
Tabla 3.22: Test de Duncan al 5% para el factor interacción medios de cultivo x dosis de BAP, para la variable en la variable días a la formación de brotes, durante la fase de inducción de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>).	67
Tabla 3.23: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para el número de brotes respecto los tratamientos de la fase de establecimiento empleados en la micropropagación de guaba.	68

Tabla 3.24: Tabla de contingencia de tiempo a la brotación promedio en la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de BAP y dosis de GA ₃	69
Tabla 3.25: Análisis de varianza para la variable tiempo a la brotación, en la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).....	71
Tabla 3.26: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de BAP en la variable tiempo a la brotación, durante la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).	72
Tabla 3.27: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los días a la brotación respecto los tratamientos de la fase de multiplicación empleados en la micropropagación de guaba.	72
Tabla 3.28: Tabla de contingencia de número de brotes promedio en la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de BAP y dosis de GA ₃	73
Tabla 3.29: Número de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de BAP.....	73
Tabla 3.30: Número de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de GA ₃	74
Tabla 3.31: Análisis de varianza al 5% para la variable número de brotes, en la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).....	75
Tabla 3.32: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de BAP en la variable número de brotes, durante la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).	75
Tabla 3.33: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de GA ₃ en la variable número de brotes, durante la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).	76
Tabla 3.34: Test de Duncan al 5% para el factor subcultivo en la variable número de brotes, durante la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).	76

Tabla 3.35: Test de Duncan al 5% para el factor concentración de BAP – concentración de GA ₃ , en la variable número de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>).....	77
Tabla 3.36: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los días a la brotación respecto los tratamientos de la fase de multiplicación empleados en la micropropagación de guaba.....	77
Tabla 3.37: Tabla de contingencia de altura de brotes promedio en la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de BAP y dosis de GA ₃	78
Tabla 3.38: Análisis de varianza al 5% para la variable altura del brotes, en la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).....	80
Tabla 3.39: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de BAP en la variable altura del brote, durante la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).	81
Tabla 3.40: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de GA ₃ en la variable altura del brote, durante la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).	81
Tabla 3.41: Test de Duncan al 5% para el factor subcultivo, en la variable tiempo a la brotación, durante la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).	81
Tabla 3.42: Test de Duncan al 5% para el interacción concentración de BAP y dosis de GA ₃ en la variable número de brotes, durante la fase de multiplicación de guaba (<i>Inga insignis</i>).....	82
Tabla 3.43: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para altura de brotes respecto los tratamientos de la fase de multiplicación empleados en la micropropagación de guaba.....	82

Tabla 3.44: Tabla de contingencia del promedio del tiempo al enraizamiento de las plantas de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de IBA.....	83
Tabla 3.45: Análisis de varianza para la variable tiempo al enraizamiento, durante la fase de enraizamiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).....	84
Tabla 3.46: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA en la variable tiempo al enraizamiento, durante la fase de enraizamiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).	85
Tabla 3.47: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para tiempo al enraizamiento respecto los tratamientos de la fase de enraizamiento empleados en la micropropagación de guaba.	85
Tabla 3.48: Tabla de contingencia del promedio de la longitud de las plantas de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de IBA.	86
Tabla 3.49: Análisis de varianza para la variable longitud de la plántula, durante la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> para la micropropagación de guaba (<i>Inga insignis</i>).	87
Tabla 3.50: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA, para la variable longitud de la plántula, durante la fase de enraizamiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).	88
Tabla 3.51: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para longitud de la plántula respecto los tratamientos de la fase de enraizamiento empleados en la micropropagación de guaba.	88
Tabla 3.52: Tabla de contingencia de la altura promedio de las plántulas de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de IBA.	89
Tabla 3.53: Análisis de la varianza para la variable longitud de la raíz, durante la fase de enraizamiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).....	90

Tabla 3.54: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA, para la variable longitud de la raíz, durante la fase de enraizamiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).	90
Tabla 3.55: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para longitud de las raíces promedio respecto los tratamientos de la fase de enraizamiento empleados en la micropropagación de guaba.	91
Tabla 3.56: Tabla de contingencia del número de raíces promedio de plántulas de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de IBA.	92
Tabla 3.57: Análisis de la varianza para la variable número de raíces, durante la fase de enraizamiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).	93
Tabla3.58: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA, para la variable número de raíces, durante la fase de enraizamiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).	93
Tabla 3.59: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para número de raíces respecto los tratamientos de la fase de enraizamiento empleados en la micropropagación de guaba.	93

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Área de distribución en Ecuador de la guaba endémica (<i>Inga Insignis</i>) (Pennington y Revelo, 1997).....	5
Figura 1.2: Partes de la planta de guaba (<i>Inga insignis</i>): A. Ramo florido, B. Nectáριο foliar, C. Legumbre, D. Sección de la legumbre (Pennington y Revelo, 1997).	7
Figura 2.1: Plantas donadoras de explantes pertenecientes a la facultad de Agronomía de la Universidad Central del Ecuador Jerónimo Leiton y Sobral S/N, Latitud: 99°785'61,3606" (m), Longitud: 50°02'78,1484" (m). Altura elipsoidal: 2811.647 (m): A. Plantas en invernadero, B. Planta individual (Villamar, 2014).	35
Figura 2.2: Recolección y preparación del material vegetal: A. Hojas de guaba, B. Corte de hojas, C. Explante de segmento nodal, D. Enjuague de las yemas apicales en agua corriente, E. Lavado con detergente, F. Inmersión en fungicida (Villamar, 2014).	36
Figura 2.3: Proceso de desinfección y siembra del explante: A. Inmersión en etanol al 70%, B. Inmersión en hipoclorito de sodio, C. Corte del explante, D. Siembra del explante (Villamar, 2014).	38
Figura 2.4: Explante de guaba (<i>Inga insignis</i>): A. Sin contaminación, B. Contaminado (Villamar, 2014).	39
Figura 2.5: Explante de guaba (<i>Inga insignis</i>): A. Viable, B. Necrosado (Villamar, 2014).	40
Figura 2.6: Observación de las variables de la etapa de establecimiento: A. Primer brote, B. Número de brotes.....	42
Figura 2.7: Preparación de la giberelina GA ₃ : A. Filtración, B. Colocación en el medio de cultivo, C. Dispensación de los medios de cultivo (Villamar, 2014).....	43

Figura 2.8: Observación de las variables en la fase de multiplicación: A. Primer brote, B. Número de brotes, C. Altura del brote (Villamar, 2014).	45
Figura 2.9: Observación de las variables en la fase de enraizamiento: A. Primera raíz, B. Longitud de la plántula, C. Longitud raíz, D. Número de raíces (Villamar, 2014).	47
Figura 3.1: Grafica de interacción del número de explantes no contaminados en función de la concentración de NaClO para tiempo de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección.....	50
Figura 3.2: Grafica de interacción del número de explantes no contaminados en función del tiempo de inmersión para la concentración de NaClO empleados en los tratamientos de desinfección.....	51
Figura 3.3: Grafica de interacción del número de explantes viables en función de la concentración de NaClO para el tiempo de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección.....	55
Figura 3.4: Grafica de interacción del número de explantes viables en función del tiempo de inmersión para la concentración de NaClO en los tratamientos de desinfección empleados.	55
Figura 3.5: Tiempo a la brotación respecto a la dosis de BAP, para la variable tiempo a la brotación, durante la fase de inducción de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>).....	59
Figura 3.6: Tiempo a la brotación respecto a las concentraciones de BAP empleados en la fase de establecimiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).	60
Figura 3.7: Número de brotes respecto a la dosis de BAP, para la variable número de brotes, durante la fase de establecimiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).	64
Figura 3.8: Número de brotes respecto a las concentraciones de BAP empleados en la fase de establecimiento de guaba (<i>Inga insignis</i>).....	65

Figura 3.9: Tiempo a la brotación de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de BAP.	70
Figura 3.10: Tiempo a la brotación para los brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de GA ₃	70
Figura 3.11: Altura de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de BAP.....	79
Figura 3.12: Altura de brotes de guaba (<i>Inga insignis</i>), respecto a la concentración de GA ₃	79
Figura 3.13: Gráfica de interacción de dosis de IBA para la variable tiempo al enraizamiento, durante la fase de enraizamiento de la guaba (<i>Inga insignis</i>).	84
Figura 3.14: Longitud de la plántula para los diferentes tratamientos de enraizamiento utilizados, para la micropropagación de guaba (<i>Inga insignis</i>).	87
Figura 3.15: Longitud de la raíz para los diferentes tratamientos de enraizamiento utilizados de guaba (<i>Inga insignis</i>).	89
Figura 3.16: Número de raíces para los diferentes tratamientos de enraizamiento utilizados, para la micropropagación de guaba (<i>Inga insignis</i>).	92

RESUMEN

Inga insignis es una especie endémica de Imbabura, posee propiedades organolépticas importantes. Actualmente debido a las actividades antropogénicas, se ha reducido su población considerablemente, por cual es necesario impulsar su conservación. Las semillas de este género al ser almacenadas pierden viabilidad rápidamente, por lo cual el cultivo *in vitro* es una alternativa viable para su conservación. En el presente trabajo se desarrolló la micropropagación de *Inga insignis*, a partir de yemas. En la desinfección se aplicó: fungicida, alcohol al 70%, diferentes concentraciones de NaClO (1 y 1.5%v/v) y tiempos de inmersión (10 y 15 minutos); obteniéndose una descontaminación y viabilidad del 90% con NaClO al 1.5% v/v por 15 minutos. El medio de cultivo más efectivo en la fase de establecimiento fue el medio MS (Murashige & Skoog) ($p > 0.0001$) frente al medio MS/2, suplementado con BAP (0, 1, 2 y 3 mgL^{-1}); siendo la concentración de 2 mgL^{-1} de BAP ($p > 0.0001$) la que obtuvo el menor tiempo para la formación y número de brotes. En la etapa de multiplicación se empleó medio MS con concentración fija de ANA (0.1 mgL^{-1}) y carbón activado (1 gL^{-1}), variaciones en la concentración de BAP (0, 0.5, 1 y 1.5 mgL^{-1}) y GA₃ (0.5 y 1.0 mgL^{-1}); alcanzado influencia significativa del BAP a 1 mgL^{-1} combinado con GA₃ a 1 mgL^{-1} ($p > 0.0001$), con el menor tiempo para la formación, mayor número y longitud de brotes. Para la etapa de enraizamiento se empleó diferentes concentraciones de IBA (0, 0.5, 1 y 1.5 mgL^{-1}), siendo la concentración de 1 mgL^{-1} ($p > 0.0001$) la que obtuvo un menor tiempo al enraizamiento, mayor longitud de la plántula, mayor longitud y número de raíces.

Palabras clave: *Inga Insignis*,

ENDÉMICA,

MICROPROPAGACIÓN,

MEDIO MURASHIGE & SKOOG

ABSTRACT

Inga insignis, is endemic of Imbabura, it has important organoleptic properties. Currently as result of various anthropogenic activities that has considerably reduced its population, makes necessary to promote its conservation. This genus has seeds, which lose viability quickly when stored, for which the in vitro culture is a viable alternative for conservation. The present work was developed the micropropagation of *Inga insignis*, from nodal segments. In sterilization used: fungicide, 70 % alcohol, different concentrations of NaClO (1 and 1.5 % v / v) and time immersions (10 and 15 minutes) was used. We obtained decontamination and a viability of the 90%, applying 1.5 % v/v NaClO for 15 minutes. The culture medium more effective in the establishment phase was MS (Murashige & Skoog) medium compared with MS/2 medium, therefore it was used in the induction phase, supplemented with different concentrations of BAP (0, 1, 2, and 3 mgL⁻¹). The concentration of 2.0 mgL⁻¹ of BAP had the best vegetative response, shorter time for bud break and number of shoots. MS medium with ANA (0.1 mgL⁻¹), active charcoal (1 gL⁻¹), BAP (0, 0.5, 1, 1.5 mgL⁻¹) and GA₃ (0.5, 1.0mgL⁻¹) was used in the multiplication phase; showed that there was influence of BAP at doses of 1 mgL⁻¹ combined with 1 mgL⁻¹ of GA₃, obtained the smallest number of days for the formation of shoots, as well as largest number and length of shoots (mean=4.00 cm). In the rooting phase MS/2 and IBA (0, 0.5, 1 and 1.5 mgL⁻¹) was applied, it was found that the concentration of 1.0 mgL⁻¹ of IBA had significant influence in the variable: time rooting, length seedling, length and number of roots.

Key words: *Inga insignis*,

ENDEMIC,

MICROPROPAGATION,

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM

CAPÍTULO 1:

ESTANDARIZACIÓN DE LAS ETAPAS DE MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LA GUABA (*Inga insignis*) ENDÉMICA DE LA PROVINCIA DE IMBABURA.

1.1 Formulación del problema

Ecuador es uno de los países más plétórico en cuanto a biodiversidad, con tan solo el 0.2% de la superficie total del planeta, ostenta alrededor de 10% de todas las especies de plantas del mundo. En base a los patrones de distribución de la flora, se ha estimado que en total posee entre veinte y veinticinco mil especies de plantas vasculares, del cual aproximadamente el 20% de éstas son endémicas (Estrella, Manosalvas, Mariaca, & Rivadeneira, 2005).

Sin embargo de acuerdo a Gauchat, Rodriguez, Belaver, Bischoff (2003) producto de la urbanización, ha causado que la gran diversidad biológica a nivel mundial este desapareciendo rápidamente, originada principalmente por el aumento exponencial de la población y por el mejoramiento de las condiciones de vida en diferentes partes del globo.

Una muestra es el proyecto Ciudad del Conocimiento “YACHAY” (palabra quichua que significa conocimiento), que se desarrolla en el cantón San Miguel de Urucuquí, ubicado al noroccidente de la provincia de Imbabura, en un área de 4.270 hectáreas, el cual es famoso y reconocido a nivel nacional e internacional por su enorme variedad y agrupación de recursos naturales, por lo cual se encuentran amenazadas diversas especies debido al avance del área urbana y de la construcción de este proyecto (YACHAY, 2013).

Tal es el caso de la guaba (*Inga sp.*), arboles caracterizados por poseer un fruto apetecible, sin embargo no ha existido interés en su explotación como producto agro comercial. Su uso se limita como planta ornamental y

como fijadora de nitrógeno en plantaciones de cacao y café; siendo su fruto un producto adicional y en su mayoría de consumo local (de la Torre, 2008).

Dentro de la diversidad de especies de guaba que existen en nuestro país, la guaba *Inga insignis*, endémica de los Andes ecuatorianos, fue hallada relevante dentro del catón San Miguel de Urucuquí en la investigación realizada por Toquiza (2007), debido a que sus frutos presentan propiedades organolépticas importantes y resistencia a la mosca de la fruta, principal plaga de esta especie.

1.2 Justificación del problema

Las actividades de conservación de la diversidad génica se realizan *in situ* o *ex situ* según los requerimientos de la especie. La conservación *in situ* presenta problemas por la necesidad de establecer marcos legales de protección de las áreas, así como de los hábitats pertinentes, además de conflictos de interés con otras actividades humanas, de falta de una asignación continua y a largo plazo de recursos económicos a las instituciones encargadas de las labores de conservación (Iridonio, 2001). A esto agregado, la falta de información básica sobre la biología de las especies a conservar. Este tipo de limitaciones conlleva la necesidad de desarrollar métodos de conservación *ex situ*, o conservación fuera del hábitat natural, que sirvan para complementar las acciones tomadas en los hábitats naturales (Reid & Miller, 1989).

La conservación *ex situ* de germoplasma de especies inusuales y amenazadas está basada esencialmente en el manejo de los bancos de germoplasma, que consiste en; bancos de semillas, bancos de cultivo *in vitro*, bancos de polen y bancos de genes o bancos de ADN (Zarrans, 2009). Los bancos de semillas conservan el material vegetal en forma de semillas, los cuales constituyen uno de los procedimientos de conservación *ex situ* más empleados en la actualidad, pero está restringido por el tipo de semillas

a almacenar, siendo ideales para este método las denominadas semillas ortodoxas, debido a que resisten la desecación (Hernández, 2007).

Para las especies vegetales con semillas recalcitrantes o sensibles a la desecación, las cuales pierden viabilidad cuando se desecan por debajo de un límite crítico, usualmente entre un 12 a 30 % del contenido de humedad, tienen longevidades cortas porque al ser almacenadas sufren daños por frío, problemas de contaminación microbiana y germinación durante el almacenamiento asociado a su alto contenido en humedad, como en el caso del género *Inga*, que según Francis (2001) además puede germinar aún dentro de la misma vaina, las técnicas de cultivo *in vitro* son una alternativa viable que permite la conservación y perpetuidad del germoplasma de estas especies (Rojas, García, & Alarcón, 2004).

El cultivo *in vitro* es una de las biotecnologías más transferibles, puesto que a nivel básico requiere un equipo relativamente poco complejo. Se puede utilizar con varios fines; eliminación de virus, propagación de material clonal de plantación (micropropagación), que además resulta atractivo por las altas tasas de multiplicación que se consiguen y al reducido material de partida requerido (Hernández, 2007). El material vegetal inicial más empleado para la micropropagación son yemas, meristemos y ápices; debido a estos presentan cualidades de totipotencia celular que permiten la obtención de brotes y la formación de nuevas plantas (Rebolledo, Aparicio, & Cruz, 2006).

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Estandarizar las etapas de micropropagación *in vitro* de la guaba (*Inga insignis*) endémica de la provincia de Imbabura.

1.3.2 Objetivos específicos

- a) Estandarizar el protocolo de desinfección de segmentos nodales para la micropropagación *in vitro* de *Inga insignis*.
- b) Evaluar el medio de cultivo y las concentraciones adecuadas de citoquininas durante la fase de establecimiento *in vitro* de *Inga insignis*.
- c) Seleccionar la formulación adecuada de citoquininas y giberelinas para la fase de multiplicación *in vitro* de *Inga insignis*.
- d) Determinar la concentración de auxina apropiada para el enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Inga insignis*.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Características generales de la especie en estudio

1.4.1.1 Distribución geográfica y origen de la especie

El género *Inga* abarca aproximadamente 300 especies de árboles distribuidos en América tropical. Las especies de *Inga* son un elemento omnipresente en los bosques pluviales de llanuras y montañas a lo largo de las zonas húmedas de Latinoamérica tropical desde los 24° N en México hasta los 34° S en Uruguay, y la mayor diversidad de especies del género está vigente en los países Andinos de Colombia, Ecuador y Perú, hallándose un punto máximo de especies en las laderas bajas y medias de estos países (Pennington & Revelo, El género *Inga* en el Ecuador. Morfología, Distribución y Usos, 1997). Entre las especies nativas del Ecuador se encuentra *Inga insignis*, la cual es considerada como una planta endémica de los Andes ecuatorianos (figura 1.1) (de la Torre, 2008).

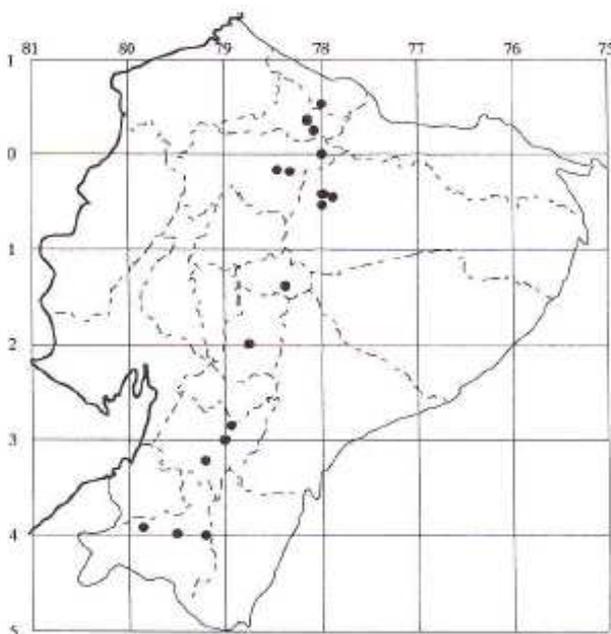


Figura 1.1: Área de distribución en Ecuador de la guaba endémica (*Inga Insignis*) (Pennington & Revelo, 1997).

1.4.1.2 Clasificación taxonómica

Según Pennington & Revelo (1997) la clasificación taxonómica para el género *Inga* es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Mimosoideae

Tribu: Ingeae

Género: *Inga*

Especie: *insignis*

Este árbol es comúnmente conocido como: guaba (Ecuador y Perú), inga-cipó (Brasil), guano (Colombia), guammo o bejuco (Venezuela), ice-cream bean tree (Estados Unidos e Inglaterra), pois sucre,ingá (Francia) (Sousa, 2008), pero según de la Torre (2008) en su estudio sobre plantas útiles del Ecuador establece los siguientes nombres comunes para la guaba *Inga insignis*: pakay (kichwa), guaba cuadrada, guaba de zorro, guaba lanuda, guaba musga, guabo.

1.4.1.3 Descripción botánica

La guaba *Inga insignis* es un árbol pequeño, de hasta 10 metros de altura y 36 centímetros de diámetro, habitualmente ramificado desde la base; corteza lisa de color gris; la copa es densa, a veces más ancha que alta, de follaje verde brillante; hojas compuestas, raquis alado (hasta 2 centímetros de ancho), con 4 – 6 pares de folíolos elípticos, folíolos más grandes 10 – 14 x 4 – 6 centímetros; envés del folíolo e inflorescencias con pelos cortos enredados (figura 1.2, literal A), aunque a veces las hojas no tienen pelos; nectarios foliares estipitados (1 – 2 mm de longitud) con cabeza en forma de copa o no expandida; inflorescencias axilares (figura 1.2, literal A, B), solitarias o en pares; cada inflorescencia de 6 – 10 centímetros de longitud, las flores dispuestas en un espiga compacta; flores 3.5 – 4.5 centímetros de longitud, poco fragantes, de color verde amarillento, con estambres blancos; legumbre 14-18 x 2-2.5 centímetros, verde o marrón verdosa, cuadrangular, recta o ligeramente curvada, los márgenes longitudinalmente surcados, con pelos enredados (Pennington & Revelo, El género *Inga* en el Ecuador. Morfología, Distribución y Usos, 1997).

Esta especie es distinta a las demás especies de guaba por su legumbre corta cuadrangular con márgenes surcados (figura 1.2, literal C, D). Cuando florece es similar a *I. ornata*, pero con el fruto grande y cilíndrico de la última es completamente diferente (de la Torre, 2008).

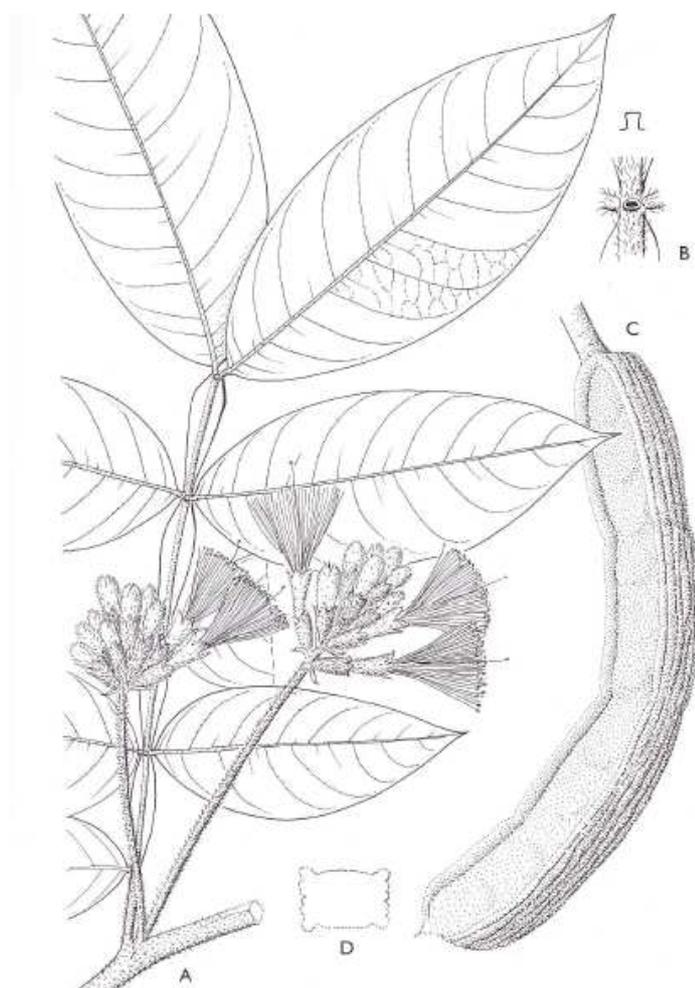


Figura 1.2: Partes de la planta de guaba (*Inga insignis*): A. Ramo florido, B. Nectárico foliar, C. Legumbre, D. Sección de la legumbre (Pennington & Revelo, 1997).

1.4.2 Suelos y topografía

La planta se adapta a diversos tipos de suelos, desde los más fértiles, hasta los más ácidos e infértiles e inclusive en suelos arenosos. Se desarrolla bien en terrenos no inundables, soporta hidromorfismo y período largos de sequía. Requiere un pH mínimo de 5. Los suelos pueden ser escasamente drenados, pero no pantanosos, o suelos poco profundos, o en lugares con una precipitación mínima, no son capaces de mantener la especie, la guaba crece en topografía empinada o llana, hasta elevaciones de más de 1.000 m (Francis, 2001).

1.4.3 Métodos de propagación convencional

Las técnicas de propagación convencional han sido los únicos métodos de cultivo empleado para la proliferación de guaba, siendo el principal método la propagación sexual por semilla, y recientemente empleado el método de propagación asexual por estacas.

1.4.3.1 Propagación por semilla

La propagación para *Inga sp.* más común es por semilla, la cual tiene más de 90% de eficiencia, germina cuando la fruta ha terminado su desarrollo y aún dentro de la misma vaina, siendo este una gran limitante debido a que las semillas pierden viabilidad muy rápidamente y no toleran el secado, comportándose como semillas del grupo recalcitrante (Orozco, Prado, & Ramírez, 2013).

La germinación se inicia a los tres días (si es que aún no se ha iniciado al cosechar la fruta) y alcanza el máximo en trece días. En vivero la semilla es germinada en camas de almácigo con diferentes sustratos, el más utilizado es tierra orgánica más arena gruesa en la proporción 2: 1, a distanciamientos de 4 por 4 cm ó 6 por 6 cm, dependiendo del tamaño de la semilla. Las plántulas alcanzan 28 cm en 40 semanas (Sousa, 2008).

Se trasladan las plantas a campo definitivo cuando tienen entre 40 y 60 cm de altura. Para uso como sombra en plantaciones de café o cacao se utilizan distanciamientos entre 10 y 15 m, mientras que para cultivos en callejones se utiliza 4 m entre hilera y 0.5 m entre plantas. No se tiene experiencia para establecer plantaciones para el cultivo puro de guaba, pero se espera que el distanciamiento esté entre 6 y 8 m entre plantas y entre hileras. Las plantas alcanzan 2.0 a 4.5 m de altura en 12 meses, dependiendo de la fertilidad del suelo (Francis, 2001).

La fructificación se inicia a los cuatro a cinco años del trasplante, aumentando hasta el año 8-10 en que alcanza el máximo. La vida útil de una

planta es estimada en 20 años. No se tiene datos de productividad por planta (Sousa, 2008).

1.4.3.2 Almacenamiento de semillas

Zuñiga, 1996, estableció un protocolo para lograr almacenar las semillas de guaba por un periodo más prolongado, pues al igual que las semillas carnosas de muchos árboles tropicales, las semillas de guaba poseen una viabilidad corta bajo condiciones naturales. La pulpa carnosa que rodea a las semillas se fermenta rápidamente al ser expuesta al aire, a temperatura ambiente las semillas conservan su viabilidad no más de 1 a 2 semanas al interior de la legumbre no abierta. Sin embargo es posible extender su periodo de viabilidad si se almacenan los frutos a una temperatura inferior a los 10 °C. Esto se ha evidenciado en diversas especies de guaba (Dias, Domingos, Barbedo, & Fratin, 2013).

Cuando la semilla ha sido removida de su fruto, las semillas con su fruta carnosa se deterioran rápidamente. Si se desea almacenar las semillas por algunos días es primordial remover la pulpa para impedir que el embrión se infecte de bacterias y hongos, además es altamente susceptible a la desecación y muere si el contenido de humedad es menor al 40%, por lo tanto se recomienda tratarlos con una solución de fungicida, enjuagarlos, secarlos y almacenarlos en frascos con una tapa que permita el intercambio gaseoso, así pueden ser conservados por aproximadamente tres meses (Zuñiga, 1996).

1.4.3.3 Propagación por estacas

Para la propagación por estacas de esta especie se aconseja utilizar ramas gruesas de aproximadamente 1 centímetro de diámetro y 15 centímetros de longitud, con dos hojas, las cuales deben ser extraídas. La base de la estaca debe ser tratada con alguna solución enraizadora (auxina), se las coloca a la sombra en un sustrato 50:50 arena gruesa y tierra negra,

una vez que las estacas han enraizado, generalmente este proceso se lleva a cabo a las tres o cuatro semanas después de la siembra, deben ser colocadas en un lugar bajo sombra, para luego ser expuestas gradualmente al sol. Este procedimiento tiene el 80% de efectividad (Pennington & Revelo, El género *Inga* en el Ecuador. Morfología, Distribución y Usos, 1997).

1.4.4 Tecnología de cosecha y pos-cosecha

La cosecha se produce cuando los frutos han alcanzado pleno desarrollo. Debido a que no se han realizado estudios profundos sobre la fenología de la especie *Inga Insignis*, no se ha determinado el momento de cosecha adecuado, para evitar la germinación de las semillas en las vainas, sin embargo de acuerdo a la mayoría de árboles de guaba (*Inga sp.*) en Ecuador mayormente florecen en los meses de julio a noviembre, obteniéndose frutos maduros en los meses de noviembre a febrero (Pennington & Revelo, El género *Inga* en el Ecuador. Morfología, Distribución y Usos, 1997).

Los frutos fermentan a los cuatro a cinco días de cosechados maduros, pero pueden durar hasta tres semanas si se las almacenan en cámaras frías (Francis, 2001).

1.4.5 Principales plagas y enfermedades

No existe un estudio exhaustivo sobre las plagas que atacan a la guaba, pese a que tiene problemas por ataque de varios insectos en los frutos. En Panamá; se ha observado con cierta frecuencia el ataque de los frutos por un *Chrysomelidae* (no identificado a nivel de especie) y de *Costalimaita ferruginea*, estos insectos no causan daños a las hojas. Diversos tipos de aves de igual manera, producen fuertes pérdidas por consumo de las frutas en el árbol (Barona, 2004).

En Ecuador en el género *Inga* se ha registrado que es hospedera de la mosca de la fruta; *Anastrepha fraterculus*, *Anastrepha striata*, *Anastrepha distincta* (Tigrero, 2009).

1.4.6 Importancia de la especie

Al ser una especie nativa de los Andes ecuatorianos, la importancia de preservación y conservación de ejemplares de guaba es trascendental debido a la vulnerabilidad de la especie en la actualidad. Además presenta propiedades medicinales que aún no han sido estudiadas a profundidad, las cuales podrían ser una fuente de estudio e investigación.

También cabe recalcar que esta especie se ha destacado dentro del estudio realizado por Toquiza (2007), en el que se determinó plantas élites para un futuro cultivo de guaba (*Inga sp.*), ver anexo A, en donde se encontró a la guaba *Inga insignis* (ecotipo E16) como una especie importante en el cantón San Miguel de Urcuquí, provincia de Imbabura, debido a que sus frutos presentan propiedades organolépticas y nutritivas muy importantes. En dicho trabajo también se determinó los grados brix (cociente total de sacarosa disuelta en un líquido) en extractos de sus frutos y se halló que esta especie tiene una alta concentración de las mismas, además presenta resistencia a la mosca de la fruta principal plaga para estos árboles en un 98.50%, así como mayor número de frutos por racimo y mayor porcentaje de arilo (tabla 1.1).

Tabla 1.1: Análisis del ecotipo 16 (*Inga insignis*) (Toquiza, 2007).

Ecotipo 16	E16
Largo (cm)	17.05
Ancho (cm)	2.72
Peso g/vaina	81.05
Nº de semillas	7.40
Nº de frutos/racimo	4.00
% de arilo	66.75
Ataque de mosca de la fruta	R
pH	5.5
Grados Brix	15.8

1.4.7 Usos y propiedades

Esta especie ha presentado diversos usos para el hombre, entre los cuales se destacó los más importantes a continuación.

1.4.7.1 Ambiental

Ha sido utilizado aproximadamente desde inicios del siglo XIX como un árbol de sombra para los cultivos perennes, en la zona andina, las especies de *Inga* tienen un larga historia de uso como arboles de sombra, originariamente empleados por pobladores precolombinos para proveer de sombra a los árboles de cacao y en el siglo XX para el mismo fin en el cultivo de café y té, esto debido a que presentan grandes beneficios que se describen a continuación (Pennington, 1996).

Estos árboles se pueden adaptar bien en los suelos infértiles y fuertemente ácidos, incluso prosperar en condiciones de pH muy bajo, que otras leguminosas no logran adaptarse. También crecen bien en suelos con drenaje pobre o periódicamente inundados, o en áreas de suelos

compactados, característicos de pastizales degradados y abandonados (Francis, 2001).

Además de acuerdo a da Silva & Rodríguez (2010), este árbol ha sido utilizada en recuperación de tierras degradadas, siendo una especie ideal por su abundante producción de biomasa y manejo bajo podas, pues demuestran una marcada habilidad para tolerar la poda desde una edad muy temprana, produciendo una alta cantidad de biomasa utilizable como abono verde o material para el control de la maleza en los cultivos establecidos en hileras entre las plantas de guaba.

Otro beneficio adicional es que los árboles de guaba producen nódulos radiculares que contienen bacterias fijadoras de nitrógeno, por esta razón los cultivos asociados con esta especie se benefician de este mecanismo de enriquecimiento natural del suelo a través de la producción de nitrógeno; la descomposición del follaje también aporta muchos nutrientes al suelo. La presencia de hojarasca bajo árboles de *Inga* ha demostrado ocasionar proliferación de raíces en los estratos superficiales del suelo, por encima de los horizontes donde se acumula aluminio, elemento tóxico y limitante en muchos suelos, también pueden mantener una asociación micorrítica con especies de hongos que promueven el reciclaje del fósforo, elemento que es de difícil disponibilidad para la mayoría de las especies que crecen sobre suelos ácidos (Quitiguiña, Oña, & Vargas, 2008).

El efecto de sombra de la copa de plantas puede tener una influencia positiva en el control de malezas y en la recuperación de suelos degradados, las hojas que se desprenden a lo largo de los meses, tienen descomposición lenta y forman rápidamente una cubierta permanente de hojarasca bajo el árbol, que combinada con el efecto de sombra inhibe el crecimiento de la maleza alrededor del árbol, favoreciendo la formación de un suelo forestal y rápidamente productivo (Pennington & Revelo, 1997).

1.4.7.2 Alimenticio

El arilo de la semilla de los frutos maduros es comestible; es pulposo, succulento y dulce y presenta un gran valor nutricional, ver tablas 1.2 y 1.3 y 1.4. Se consume directamente al estado fresco, se utiliza también en la preparación de refrescos, y tiene potencial en la producción de alcohol de buena calidad. Los frutos de estas especies son comercializados en los mercados locales, brindando a los agricultores un pequeño ingreso adicional por su cultivo (Pennington & Revelo, 1997).

Tabla 1.2: Valor nutricional del arilo de guaba (*Inga sp.*) (Bressani, 2010).

Componentes	100 g. de arilo
Energía	53,0 cal
Agua	84,9 g.
Proteína	1,0 g.
Lípidos	0,1 g.
Carbohidratos	13,6 g.
Fibra	0,8 g.
Ceniza	0,4 g.
Calcio	24,0 mg.
Fósforo	18,0 mg.
Hierro	0,4 mg.
Vitamina A (Retinol)	0,0 -
Vitamina	0,05 mg.
Riboflavina	0,10 mg.
Niacina	0,50 mg.
Vitamina C (A. ascórbico)	1,40 mg.

Tabla 1.3: Análisis químico proximal de las diferentes fracciones del fruto de guaba (*Inga sp*) (Bressani, 2010).

Característica	Vaina	Pulpa	Semilla
Humedad	48.85 ± 0.17	2.42 ± 0.17	6.44 ± 0.37
Proteína	8.68 ± 0.02	6.75 ± 1.21	23.05 ± 0.06
Grasa	0.56 ± 0.04	1.09 ± 0.08	0.96 ± 0.08
Fibra	39.32 ± 0.04	7.39 ± 0.12	2.37 ± 0.25
Cenizas	5.36 ± 0.12	4.78 ± 0.06	3.62 ± 0.01

Tabla 1.4: Análisis de minerales de las diferentes fracciones del fruto de guaba (*Inga sp.*) (Bressani, 2010).

Elemento (%)	Vaina	Pulpa	Semillas	Hojas
N (%)	1.62	1.23	2.95	3.23
P (%)	0.13	0.10	0.16	0.34
K (%)	1.29	2.14	0.91	1.02
Ca (%)	0.17	0.20	0.13	1.08
Mg (%)	0.10	0.10	0.14	0.20
Cu (ppm)	6.00	2.00	5.00	72.45
Fe (ppm)	18.00	43.00	20.00	314.20
Mn (ppm)	30.00	39.00	16.00	168.8
Zn (ppm)	13.00	21.00	23.00	15.51

Tradicionalmente, los frutos de segunda calidad son consumidos por el ganado vacuno, porcino, aviar y en piscicultura por presentar componentes importantes para la alimentación (tabla 1.5), la semilla contiene proteínas en cantidad importante, que le dan potencial como ingrediente en alimentación animal (Quitiguiña, Oña, & Vargas, 2008)

Tabla 1.5: Composición química y cinética de la fermentación de las partes vegetativas de *Inga sp.* (Rosales, 1997).

Componente	<i>Inga sp.</i>
Materia orgánica	909.1
Proteína cruda	225.8
Proteína soluble	30.1
Carbohidrato soluble	3.3
Almidón	192.5
Azúcares totales	84.4
Azúcares reductores	59.5
Fibra	630.8
Extracto etéreo	8.5
Capacidad de precipitar (proteína cm ² /g)	529.0
Taninos condensados DO*/g	595.4
Fenoles totales DO/g	151.9
Tasa de fermentación (h ⁻¹)	0.061
Fase inicial (h)	10.8
Producción de gas (mL)	31.9

1.4.7.3 Medicinal

En comunidades rurales, se utilizan las semillas y hojas con fines medicinales; antidiarreico, antireumático, antiinflamatorio, antiséptico y como cicatrizantes (Kosiol, Rios, Borgtoft, & Granda, 2007), esto gracias a su contenido de saponinas, fitolacina o ácido fitoláctico, ácido fórmico, glucósidos, triterpenos, oxalato de calcio y materias pépticas (Pennington & Revelo, 1997).

1.4.7.4 Materiales

Inga tiene importancia como fuente de leña y en la producción de carbón en zonas donde la foresta original ha sido talada, así como en la población rural del país que todavía depende de leña para cocinar, a menudo son referidas como uno de los combustibles favoritos, en virtud a su rápido ritmo de crecimiento; por lo general producen ramas de adecuado tamaño (3 - 4 cm de diámetro o más), además de su capacidad de resistir a la poda reiterada, y la buena calidad de la madera por arder bien, sin producir mucho humo (Pennington & Revelo, 1997).

Otro uso de la madera de estos árboles es en diversas construcciones rurales; aserríos, postes, muebles, cajas, construcción liviana y carpintería en general. Sin embargo, la madera se pudre fácilmente en el suelo y es susceptible a las termitas de la madera seca (da Silva & Rodríguez, 2010).

En Colombia algunos grupos indígenas utilizan la goma de ciertas especies para fijarlos colores destinados a pintar sombreros, canastas y otras artesanías (Pennington, 1996).

1.4.7.5 Interacciones biológicas

Todas las especies del género presentan pequeñas glándulas productoras de néctar en las hojas. Estas atraen especialmente a hormigas; el efecto de estos insectos visitantes es proteger a la planta contra los

herbívoros que la pueden atacar. Esto promueve un beneficio indirecto, pues los insectos visitantes pueden también controlar la presencia de plagas en los cultivos asociados con las especies de *Inga*, por ejemplo se ha demostrado excelentes resultados asociadas en el vivero a especies forestales maderables, tales como *Swietenia macrophylla*, la cual es normalmente parasitada por el insecto barrenador del brote (*Hypsipyla*) (Pennington & Revelo, 1997).

1.4.8 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se puede definir como una agrupación de técnicas de cultivo sobre un medio nutritivo, realizadas bajo estrictas condiciones de esterilidad, a partir de una planta madre, semillas, embriones, órganos, tejidos, células y protoplastos, cuyos métodos y fines pueden diferir (Pierik, 1997).

Se distingue porque todo este proceso sucede a microescala sobre un área pequeña, donde se optimizan las condiciones ambientales (físicas, nutricionales y hormonales), obteniéndose resultados con mayor eficiencia y plantas libres de microorganismos patógenos (Pierik, 1997)

La técnica general cultivo *in vitro* (del latín en vidrio) consiste en cultivar un inoculo o explante con capacidad de dediferenciación, en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas, para ejercer un control relativo sobre los procesos morfogenéticos, fisiológicos, y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio, con el propósito de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también una planta entera de mismas características fenotípicas y genotípicas de la planta madre (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales tiene varios objetivos y aplicaciones prácticas que se resumen a continuación;

- a) Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines.
- b) Generación de plantas libres de patógenos
- c) Conservación e intercambio de germoplasma
- d) Propagación de plantas
- e) Mejoramiento génico; y
- f) Producción de compuestos útiles (Roca & Mroginski, 1993)

1.4.8.1 La micropropagación

La micropropagación una de las técnicas del cultivo *in vitro*, que de igual manera se caracteriza por ser un procedimiento aséptico, este consiste en clonar plantas de interés masivamente a partir de porciones pequeñas (órganos, tejidos, o células) con potencial de desdiferenciación, en un medio nutritivo sintético, bajo condiciones controladas de luz, temperatura y un balance hormonal que permita regenerar el nuevo individuo (Roca & Mroginski, 1993).

Esta técnica es muy utilizada para la producción a escala comercial de plantas, porque presenta ventajas potenciales respecto a otros métodos de propagación vegetativa, por ejemplo puede producir gran número de plantas en un periodo más corto que en la propagación a través de estacas (Altaf, Iqba, Qarshi, Hummer, & Ikram, 2012). Además es de gran utilidad para la propagación de material vegetal manipulado genéticamente y en el caso de algunos genotipos de plantas, las técnicas de micropropagación podrían ser el único método disponible para la propagación vegetativa (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

Para las especies forestales las técnicas de micropropagación han indicado ser una importante alternativa para solucionar problemas de multiplicación y clonación como son: reducción en el tiempo de multiplicación, obtención de considerables cantidades de plantas con un mayor control sanitario (Roca & Mroginski, 1993).

1.4.8.2 Etapas de la micropropagación *in vitro*

En el transcurso del proceso de micropropagación se pueden establecer varias fases o etapas, que pueden diferir de acuerdo a las necesidades de la especie, pero que generalmente son comunes en todos los procesos de propagación *in vitro* (Roca & Mroginski, 1993).

Etapa 0: selección y preparación de la planta y/o tejido donante de explantes

Es la etapa de selección de la planta madre y de la parte de la planta que dará origen al material vegetal, esto dependerá del objetivo final de la investigación, así como de la especie con la que se esté trabajando. Si bien se puede emplear cualquier tipo de material vegetal, en general es más conveniente utilizar los órganos, tejidos o células de plantas jóvenes, porque se ha constatado que la edad fisiológica del explante presenta enorme influencia en la morfogénesis, debido a que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido se obtiene una mejor respuesta *in vitro* (Roca & Mroginski, 1993).

Así como seleccionar la planta donadora del material vegetal, aquella que presente mejores características fenotípicas como: número de brotes, vigorosidad, presencia de enfermedades, número de frutos, tamaño, crecimiento, desarrollo, entre otros. También se debe considerar que el material que se va utilizar sea homogéneo, es decir que los explantes sean recolectados en la misma época, se mantengan las mismas condiciones de cultivo (Roca & Mroginski, 1993).

Por otra parte, en esta etapa se puede emplear; plantas cultivadas bajo condiciones controladas (invernadero o cámara de ambiente controlado), o plantas cultivadas en campo. Sin embargo se recomienda el uso de plantas cultivadas bajo condiciones controladas, pues en la práctica se ha demostrado que los explantes provenientes de estas plantas, presentan menor porcentaje de contaminación (Pierik, 1997).

Etapas I: desinfección

La obtención de un cultivo completamente aséptico, es una parte importante del cultivo *in vitro* muy difícil de conseguir, puesto que el material a introducirse puede contener vitropatógenos, el cual es un término usado para denominar a aquellos microorganismos que no son necesariamente patógenos para las plantas en el campo, pero sí son perjudiciales para células, tejidos u órganos cultivados *in vitro*, entre estos se encuentran los virus, bacterias, levaduras y hongos, estos pueden provenir del ambiente de trabajo (aire, agua, superficies), o bien de la misma planta (Fonturbel, 2001).

Estos microorganismos en los medios de cultivo resultan perjudiciales, debido a que utilizan los nutrientes de éste y producen una fuerte presión de competencia con el explante, producen daños directos e indirectos por la colonización en tejidos o por segregación de metabolitos tóxicos, además pueden disminuir los coeficientes de multiplicación, inhibir el enraizamiento y finalmente causar la muerte del explante (Hernández, 2007). De ahí la trascendencia del procedimiento de desinfección superficial del material vegetal, pero hay que recalcar que este procedimiento debe causar el menor daño posible al explante, con el objetivo de mantener la viabilidad del explante y permitir su desarrollo (Roca & Mroginski, 1993).

Además se recomienda mantener en agitación las soluciones desinfectantes para que el agente químico se distribuya en todo el material vegetal homogéneamente, y a continuación realizar enjuagues con agua destilada estéril después de la exposición a cada desinfectante (Hartmann & Kester, 2002).

Por otro lado, se debe considerar que no es posible establecer un mismo protocolo de desinfección para todos los explantes, ni siquiera dentro de una misma especie, debido a que el mismo debe estar diseñado en base a los objetivos de la investigación (Roca & Mroginski, 1993). Sin embargo generalmente se establece un proceso de desinfección de explantes, en el

que se realizan inmersiones en soluciones desinfectantes como; etanol, hipoclorito de sodio, entre otros.

El etanol es un agente antiséptico, esterilizador superficial de acción rápida, su mecanismo de acción consiste en la desnaturalización de las proteínas plasmáticas, por lo que comprende un gran espectro antimicrobiano, desde bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, hasta hongos (Cruz, y otros, 2007), esto debido a que tiene una baja tensión superficial por la cual puede penetrar fácilmente entre las pilosidades foliares y mojar la superficie de la planta. La concentración más utilizada por su efectividad es al 70% ya que se ha comprobado que a esta concentración logra ingresar en el protoplasma bacteriano respecto a cuándo es usado al 90% - 100%. Frecuentemente es utilizada para un lavado breve (30') antes de aplicar otros tratamientos de esterilización de superficie (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

La superficie del material vegetal también puede ser esterilizada con soluciones acuosas de hipoclorito de sodio (NaClO), siendo las concentraciones más frecuentes de 1% al 3%. Aunque el hipoclorito de sodio es un agente favorable para la esterilización superficial del material vegetal también es un agente oxidante, sin embargo se puede eliminar los residuos oxidantes fácilmente mediante enjuague. Muchos laboratorios emplean cloro (hipoclorito de sodio) de uso doméstico. Estos productos comerciales contienen normalmente 5.25% de hipoclorito de sodio, la solución esterilizadora resultante debe contener no menos de 0.5% de hipoclorito de sodio, debido a que la disociación completa, del hipoclorito de sodio tiene una actividad relativamente baja a un pH superior a 8.0 y es más efectiva fijando la solución alrededor de pH 6.0 (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

La superficie del tejido sumergido completamente en la solución de hipoclorito de sodio queda esterilizada después de una exposición por varios minutos. Luego del tratamiento con hipoclorito, el material vegetal debe ser

lavado minuciosamente con varios cambios de agua destilada, para eliminar completamente el desinfectante (Abdelnour & Escalant, 1994).

Con menor frecuencia se recomienda el uso del hipoclorito de calcio (CaClO) aunque también es un germicida efectivo, es altamente tóxico y no se puede remover con facilidad del explante (Roca & Mroginski, 1993), por lo cual se puede reemplazar por la sal de calcio que es menos fitotóxica (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

Los bactericidas y fungicidas son agentes químicos usados para la prevención y eliminación de bacterias y hongos fitopatógenos respectivamente, dentro del cultivo de tejidos se recomienda la aspersión a las plantas donadoras con fungicidas o bactericidas, por varias semanas antes de su introducción *in vitro*, o incluirlos en el protocolo de desinfección cuando se procede de un material altamente contaminado. Debe recordarse, sin embargo, que este tratamiento no tiene efecto sobre infecciones sistémicas (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

Etapa II: establecimiento - inducción de brotes

Después de establecer el protocolo de desinfección más apropiado, en el cual los explantes hayan presentado menor porcentaje de contaminación y mayor porcentaje de explantes viables, se da inicio a la etapa de inducción de brotes donde se establece el medio de cultivo con los nutrientes necesarios, que permitan al explante desarrollarse *in vitro* (Roca & Mroginski, 1993).

Adicionalmente los medios de cultivo pueden necesitar reguladores de crecimiento (fitohormonas), que permitan obtener una respuesta vegetativa adecuada por parte del material vegetal, las concentraciones que se empleen serán de acuerdo al tipo de explante, pudiendo ser añadidas citoquininas, auxinas o giberelinas (Abdelnour & Escalant, 1994).

Etapa III: multiplicación de brotes

Los explantes inducidos en la fase II son multiplicados por medio de la inducción de brotes adventicios para aumentar el número de plantas que se derivan de una sola planta madre. Este proceso puede repetirse cada cierto periodo de tiempo (3 a 4 semanas) obteniéndose varias fases (fase IIIa, fase IIIb, fase IIIc) pero se debe evitar la variación somaclonal, es decir la pérdida de la estabilidad genética, la cual es ocasionada por excesivos subcultivos (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

Otro factor fundamental en esta etapa es el balance hormonal, se aconseja elegir una concentración de citoquininas altas, y una concentración de auxina baja; generalmente se emplea en proporción citoquinina/auxina de 10/1 (Pierik, 1997).

El éxito de esta etapa consiste en conseguir una interacción de las fitohormonas propicias para los procesos de diferenciación y multiplicación celular y que permita alcanzar altas tasas de proliferación, consiguiendo así aumentar la efectividad del método de micropropagación (Hartmann & Kester, 2002).

Etapa IV: enraizamiento

El objetivo de esta etapa es producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que puedan sobrevivir a las condiciones del suelo. En este punto los brotes deben tener las hojas bien desarrolladas, ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse adecuadamente (Rojas, García, & Alarcón, 2004).

Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo auxinas, además para que se de origen a la rizogénesis, se requiere de un medio de cultivo con menor concentración de sales por ejemplo, diluido al 50%, esto ha dado

resultados positivos en diferentes especies. Sin embargo se ha registrado especies que no se requiere pasar por esta etapa, pues emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Pierik, 1997).

Etapa V: aclimatación

Las plantas obtenidas *in vitro* requieren de un manejo especial al pasar a condición *in vivo*, esto con el propósito de lograr la máxima supervivencia. Se deben volver autótrofas, tienen que desarrollar raíces, brotes funcionales, incrementar su resistencia a la desecación y al ataque de organismos patógenos (Roca & Mroginski, 1993).

En el transcurso inicial de este periodo se debe considerar varias condiciones ambientales como; mantener la humedad relativa entre 50 al 100% durante las primeras dos a 5 semanas para proteger la planta de la desecación y permitir que genere nuevas raíces y brotes, se deben colocar las plantas en un medio bien drenado que permita desarrollar raíces rápidamente, se debe proteger contra organismos patógenos hasta que haya adquirido resistencia, además se recomienda llevar un control de crecimiento durante el transplante para superar o evitar el letargo o la falta de crecimiento (Pierik, 1997).

Los explantes recién enraizados son muy vulnerables a los cambios ambientales, de manera que el triunfo o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación, en el momento en que se extraen los explantes de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas perezosos para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte crecen en ambientes tan húmedos, que también suele implicar la falta de

una cutícula cerosa bien desarrollada, que evita la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta (Pierik, 1997).

1.4.9 Factores que influyen en el cultivo *in vitro*

El crecimiento de los explantes *in vitro* depende de diversos factores entre los que se destacan los factores químicos y ambientales, los cuales interactúan para producir una plántula con características similares a las que crecen en el campo (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

1.4.9.1 Factores químicos

Los denominados factores químicos, son los que están estrechamente relacionados con la composición del medio de cultivo.

Medios de cultivo

Los explantes se desarrollan dentro de los medio de cultivo *in vitro*, que se define como un conjunto de elementos abióticos (físicoquímicos) que conforman una sustancia nutritiva de diversa consistencia (sólida, semisólida o líquida) y le proporciona al explante, nutrición y estimulación de su desarrollo (Pierik, 1997).

En la actualidad existen diversas formulaciones, un medio de cultivo en forma general se caracterizan por contener los siguientes compuestos; fuente de carbono, sales minerales, reguladores de crecimiento, vitaminas, agente gelificante entre otros (Roca & Mroginski, 1993). Estos componentes pueden variar de acuerdo a la etapa en la que se encuentra el explante durante la micropropagación, o según sea la técnica que se va emplear y la finalidad, por esto existen diferentes fórmulas que deben ser ajustadas según las condiciones del laboratorio. La diferencia entre estas fórmulas está en la cantidad y concentración de los elementos que lo conforman (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

Agua

El 95% del medio de cultivo consiste en agua. De acuerdo al propósito de la investigación sea con células y protoplastos, meristemos, se debe determinar que agua se debe usar (destilado o bi-destilada). El agua puede ser purificada por osmosis inversa; esta purificación se combina con otros métodos; de-ionización, destilación, filtración) se puede almacenar en envases plásticos (Pierik, 1997).

Fuente de carbono

Al ser el explante una pequeña porción de una planta, esta no puede producir su propio alimento, por lo cual es importante agregar al medio una fuente de energía que suple sus necesidades. La sacarosa es la más empleada *in vitro*, pero puede ser reemplazada por glucosa o fructosa (Roca & Mroginski, 1993).

Nutrientes minerales

Es necesaria la incorporación de sales minerales, estas sales se encargan de dar el soporte nutritivo de las plántulas. Las sales contienen macronutrientes (N, K, P, Ca, Mg, S) y micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn, Cu, Mo, B) que son requeridos por cualquier planta para su desarrollo normal (Rojas, García, & Alarcón, 2004).

Carbón activado

El carbón activo es un agente adsorbente, que al ser añadido al medio de cultivo remueve los compuestos fenólicos, así como sustancias inhibitoras o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclavado del medio (5-hidroximetil-2-furaldehído) o liberadas por el explante (Pierik, 1997), también es utilizado como un suplemento regulador del crecimiento, estimula embriogénesis e inhibe el crecimiento morfogénico (Hartmann & Kester, 2002).

Vitaminas

Son sustancias orgánicas de naturaleza y composición variada, indispensables en el metabolismo de los seres vivos. Aunque las plantas son autótrofas y la mayor parte de estas sintetizan casi todas las vitaminas esenciales, aparentemente lo hacen en cantidades mínimas, puede ser necesario añadir al medio de cultivo algunas vitaminas con el fin de favorecer el crecimiento de cultivos *in vitro* (Roca & Mroginski, 1993).

Los más empleados son: tiamina (B1), piridoxina (B6) y ácido nicotínico. Otras vitaminas que suelen ser útiles son ácido pantoténico, biotina, riboflavina (B2), colina, cianocobalamina (B12) y ácido fólico. El ácido ascórbico (vitamina C) se estimaba benéfico en algunos casos, pero probablemente debido más a su capacidad reductora que a su papel como vitamina (Salisbury & Ross, 2000).

Reguladores de crecimiento

Son sustancias encargadas del desarrollo y metabolismo vegetal, estas son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se transportan a otro, desde donde producen determinados efectos a muy bajas concentraciones. Se han determinado los grupos principales de hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno (Rojas, García, & Alarcón, 2004).

• Auxinas

Fueron las primeras fitoreguladores en ser descubiertas en las plantas, presentan un núcleo indólico, este se sintetiza a partir del aminoácido triptófano por medio de la vía shikímica, usualmente son empleadas en el cultivo de tejidos vegetales y añadidas al medio de cultivo. Existen diversos tipos de auxinas algunas: de origen natural; ácido indol acético (AIA) es añadido en concentraciones de $0.01 - 10 \text{ mgL}^{-1}$ y otras sintéticas; ácido

naftalenacetico (ANA), ácido indolbutírico (IBA), ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2,4 D), ácido fenilacético (PAA), son usadas en concentraciones $0.001 - 10 \text{ mgL}^{-1}$ (Pierik, 1997).

In vitro interviene en los procesos de elongación de las células y tumefacción de tejidos (formación de callos), así como división celular, formación de brotes y raíces adventicias, usualmente es utilizado en embriogénesis y suspensiones celulares. Una alta concentración de auxinas hace predominante la formación de raíces adventicias, o posiblemente la aparición de callo (Roca & Mroginski, 1993).

ANA auxina que comercialmente se la puede encontrar como isómeros α y β son de igual manera válidos, pero el isómero α es siempre el más utilizado en los medios de cultivo. El β isómero es una auxina con poca actividad fisiológica. IBA es utilizado particularmente como un efectivo agente durante el enraizamiento (Pierik, 1997).

• Citoquininas

Las citoquininas son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina, se emplean frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo. Son inhibitorias de la rizogénesis a fuertes concentraciones, sin embargo ejercen acción positiva porque actúan en interacción con las auxinas en su efecto sobre la desdiferenciación y sobre la división celular. Por lo tanto es importante realizar un justo equilibrio auxinas/citoquininas (Roca & Mroginski, 1993). Se encuentran en forma natural y sintética, las más conocidas son: zeatina, thiadiazuron, kinetina y benzilaminopurina (BAP) (Rojas, García, & Alarcón, 2004).

BAP es una de las citoquininas más utilizadas es un compuesto muy activo y se encuentra disponible fácilmente, a un costo accesible. Se la añade al medio de cultivo para iniciar la formación de embriones somáticos de algunas especies leñosas. Por lo general, se suministra combinado con

auxinas en el medio de inducción para obtener un mejor desarrollo se por organogénesis o embriogénesis (Pierik, 1997).

• Giberelinas

Las giberelinas constituyen una gran familia de ácidos diterpenos. Se encuentran naturalmente en las plantas y existen varios tipos, siendo las más comunes: GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, GA₉. Las giberelinas intervienen en los procesos de germinación de semillas, inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas, rompen la inactividad de embriones aislados y habitualmente las giberelinas, especialmente el GA₃ han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices o meristemas caulinares de varias especies vegetales (Roca & Mroginski, 1993).

GA₃ es la más usada, es preparada disolviendo los cristales en agua y ajustando pH a 5.7 es muy sensible a la autoclave, el 90% de su actividad se pierde. Generalmente induce elongación de entrenudos y el crecimiento de meristemas o brotes (Pierik, 1997).

Agentes gelificantes

Los agentes gelificantes proporciona al medio de cultivo dureza y soporte para el explante, y su concentración depende del estudio ya sea para medios sólidos y semisólidos. Actualmente los agentes gelificantes más utilizados son: gelrite, phytigel y el agar. Existen diferentes variedades de los agentes gelificantes pero se debe considerar su pureza, concentración y la marca comercial debido a que pueden intervenir en la expresión morfogénica, porque pueden contener sustancias promotoras o a la vez sustancias inhibitoras del crecimiento (Roca & Mroginski, 1993).

Agar es un polisacárido no ramificado de alto peso molecular, se puede emplear en la mayoría de los medios nutrientes, proveniente de algas, especialmente del género *Gelidium*, es obtenida en forma de gránulos. Es un

producto natural y casi no presenta materiales tóxicos. Se mantiene estable durante el tiempo de cultivo, no interfiere en la absorción de nutrientes del medio y del cultivo, además no puede ser metabolizado por el explante. El pH depende del medio pero generalmente varía 5.4 a 5.7. En cultivo tejidos el agar es más utilizado es el Difco Bacto agar en concentración entre 0.6 a 0.8% (Pierik, 1997).

pH del medio

El pH inicial de los medios de cultivo se regula, en general entre pH 5.5 y 6.0, dado que afecta tanto el crecimiento como la producción. Por debajo de 5.5, al agar no gelifica correctamente y por encima de 6.0 el gel puede ser demasiado firme, además si el pH es menor a 4.5 o mayor que 7.0, generalmente frena el crecimiento y desarrollo de plantas *in vitro*. Si el pH es demasiado bajo, pueden presentarse las siguientes complicaciones: la auxina IAA y el ácido giberélico se hacen menos estables, algunas sales (fosfato o hierro) pueden precipitar, la vitamina B1 y el ácido pantoténico se hacen menos estables y se retarda la absorción de iones amonio. El pH varía con el autoclavado, si se parte de un pH en el rango 5.0 a 7.0, generalmente sufre un descenso de 0.3 a 0.5 unidades (Pierik, 1997).

1.4.9.2 Factores ambientales

Los factores ambientales que afectan al cultivo *in vitro*, son los que están relacionados con las condiciones de incubación, de los explantes inoculados en el medio de cultivo.

Fotoperiodo

Para la radiación suministrada se debe considerar su calidad, su intensidad y el periodo de suministro, debido a que influye en la diferenciación de los órganos los explantes, y en el efecto de los reguladores de crecimiento (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997). El ciclo de

luz/oscuridad de 16/8 horas, generalmente proveniente de lámparas fluorescentes del tipo «luz día» además la iluminación puede ser variable según las necesidades de entre 1000 a 5000 lux (Roca & Mroginski, 1993).

Temperatura

Para favorecer el crecimiento del explante durante el proceso de cultivo *in vitro*, y para que no se afecten los procesos fisiológicos, la temperatura es un factor clave, esta se debe controlar entre 20 a 28°C (Roca & Mroginski, 1993), sin embargo en el interior de los frascos de cultivo es ligeramente superior entre 1 y 2 grados debido al efecto invernadero, creando un termoperiodo suave, aun manteniendo la temperatura constante en la cámara de cultivo.

1.4.10 Cultivo *in vitro* de forestales

Las especies perennes han mostrado mayores obstáculos para su micropropagación, en comparación con especies anuales y bianuales. En la actualidad aun cuando se han logrado importantes avances, todavía se enfrentan dificultades que generan grandes pérdidas, tanto del material vegetal y económicas (Yasodha, Sumanthi, & Gurumurthi, 2004).

Por lo cual se debe considerar que la mayoría de las especies forestales se describen por presentar niveles de variación intrínsecamente altos y amplias zonas de distribución natural, así como un alto nivel de variación genética, esto con el objetivo de garantizar la adaptabilidad presente y futura a los cambios en las condiciones ambientales. Además la mayoría de las especies arbóreas forestales se caracterizan por prolongados intervalos entre generaciones y por una fase juvenil generalmente larga antes de la floración, ciclos estacionales amplios y ciclos de vida complejos (Brent & McCown, 2000).

Este comportamiento también aparece *in vitro*, pues en diversas investigaciones se ha registrado una tasa de crecimiento relativamente lento.

Este paulatino crecimiento, complica los procedimientos como la selección de los tejidos transformados (Yasodha, Sumanthi, & Gurumurthi, 2004).

Otro de los principales problemas más serios y habituales, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido forestal cultivado *in vitro* (George, 1996) es el oscurecimiento u oxidación de los explantes cultivados *in vitro*, fenómeno frecuente en varias especies, causados primordialmente por el efecto abrasivo de los agentes desinfectantes utilizados durante la asepsia del explante, así como por los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (Azofeifa A. , 2009).

Un principio básico en el cultivo *in vitro* de especies arbóreas es que mientras más joven es el tejido y se encuentre en crecimiento activo, mejores resultados se obtendrán en el proceso de diferenciación de órganos. En condiciones *in vitro* las células prácticamente son inducidas a condiciones meristemáticas. Por lo cual en la mayoría de los casos se han empleado tejidos jóvenes como fuente de inóculo, ya que los tejidos y órganos maduros son poco sensibles a las condiciones *in vitro* (Pierik, 1997).

Además, la micropropagación de plantas leñosas habitualmente, se presenta la desventaja que resulta difícil obtener productos uniformes, porque a menudo, es difícil inducir a los meristemas existentes, por ejemplo a los brotes axilares, para que se desarrollen uniformemente. Esto podría ser a que los meristemas son quiescentes o latentes y/o debidos a la elongación no uniforme y al desarrollo una vez que se ha iniciado el crecimiento. Para la producción comercial, la uniformidad del producto resulta extremadamente importante. Cualquier heterogeneidad en el desarrollo de los brotes o vástagos o brotes dispuestos para el desarrollo de raíces es aplicado habitualmente durante el desarrollo subsiguiente de las plantas (Vengadesan A. , Ganapathi, Amutha, & Selvaraj, 2002).

1.5 Hipótesis de la investigación

Existe influencia significativa del balance fitohormonal en las etapas de micropropagación *in vitro* de *Inga insignis*.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación geográfica de la investigación

La investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador (FCA-UCE) que se encuentra ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia Santa Prisca, Ciudadela Universitaria: Jerónimo Leiton y Sobral S/N, latitud: 99°785'61,3606" (m), longitud: 50°02'78,1484" (m), altura elipsoidal: 2811.647 (m).

2.2 Selección de plantas donadoras del material vegetal.

Se obtuvo el material vegetal de plantas de un año, previamente adquiridas por la facultad de Agronomía de la Universidad Central del Ecuador (figura 2.1), las cuales fueron obtenidas por semillas de plantas élites, determinadas durante el estudio realizado por Toquiza (2007), "Colección y establecimiento de una plantación piloto con germoplasma de guaba (*Inga sp.*) en el cantón Urcuquí", seleccionadas por presentar alto porcentaje de grados brix (cociente total de sacarosa disuelta en un líquido) y resistencia a la mosca de la fruta principal plaga para estos árboles, así como mayor número de frutos por racimo y mayor porcentaje de arilo (tabla 1.1).

La identidad taxonómica del material vegetal, fue determinada por el docente investigador del Instituto de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central, Ing. Valdano Tafur.

El tipo de explantes fueron yemas, debido a que poseen tejido meristemático idóneo para el proceso ya que mientras más joven y menos diferenciado es el tejido tendrá una mejor respuesta *in vitro*, por lo cual es muy utilizado en la micropropagación (Roca & Mroginski, 1993).



Figura 2.1: Plantas donadoras de explantes pertenecientes a la facultad de Agronomía de la Universidad Central del Ecuador Jerónimo Leiton y Sobral S/N, Latitud: 99°785'61,3606" (m), Longitud: 50°02'78,1484" (m). Altura elipsoidal: 2811.647 (m): A. Plantas en invernadero, B. Planta individual (Villamar, 2014).

2.3 Recolección del material vegetal

La obtención del material vegetal se lo realizó a través de una colecta manual, de plantas de guaba (*Inga insignis*) mantenidas en el invernadero de la misma facultad, de las cuales se seleccionaron aquellas plantas que presentan las mejores características fenotípicas, buen estado fisiológico y sanitario. Se recolectaron ramas de aproximadamente 5 a 10 centímetros y se las traslado al laboratorio.

2.4 Etapa I: desinfección

Una vez recolectadas las muestras (figura 2.2 literal A) se eliminaron las hojas con una tijera previamente desinfectada con alcohol al 70%, con el propósito de dejar la yema descubierta (figura 2.2 literal B), se obtuvo explantes de un tamaño de 2 a 3 centímetros (figura 2.2 literal C), a continuación se enjuagaron minuciosamente con agua corriente para retirar

tierra o cualquier tipo de insecto (figura 2.3 literal D), luego en un vaso de precipitación se colocaron los explantes en 0.6 % p/v de detergente. Se los mantuvo en agitación durante 20 minutos (figura 2.3 literal E). A continuación se realizaron lavados con agua destilada hasta eliminar todo el detergente.

Posteriormente se colocaron los explantes en fungicida como se indica en el protocolo de desinfección de Goyal, Kachwaha, & Kothari (2012) en *Pithecellobium dulce* (Roxb. especie perteneciente a la familia Fabaceae y similar a la guaba, se utilizó el fungicida sistémico Benomil-Benopac al 0.07% p/v, el cual se mantuvo en agitación por 20 minutos. Se realizó dos lavados con agua destilada (figura 2.2 literal F).



Figura 2.2: Recolección y preparación del material vegetal: A. Hojas de guaba, B. Corte de hojas, C. Explante de segmento nodal, D. Enjuague de las yemas apicales en agua corriente, E. Lavado con detergente, F. Inmersión en fungicida (Villamar, 2014).

Los explantes fueron sometidos a inmersión en etanol al 70% durante un minuto, y se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril (figura 2.3 literal A). A continuación los explantes fueron llevados a la cámara de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol, donde bajo condiciones completamente asépticas, se evaluaron la concentración de cloro 1 y 1.5% v/v (figura 2.3 literal B) a dos diferentes tiempos de inmersión (10 y 15 min) (tabla 2.1). Se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril con un tiempo de duración de un minuto cada uno.

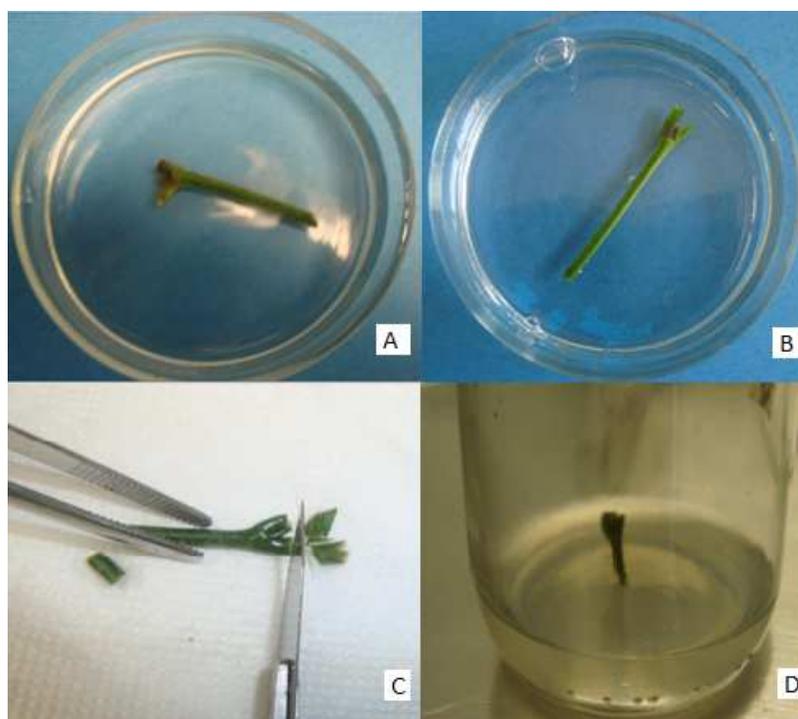
Tabla 2.1: Tratamientos de desinfección de los explantes de guaba (*Inga insignis*) en la fase de establecimiento empleando dos concentraciones de hipoclorito de sodio y dos tiempos de inmersión.

Tratamiento	NaClO (%)	Tiempo (min)
1	1	10
2	1	15
3	1.5	10
4	1.5	15

Completado el proceso de desinfección se colocaron los explantes sobre servilletas estériles, y conservando las condiciones de asepsia se ejecutaron cortes con el bisturí de la parte basal y de algunos folíolos, que fueron afectados por el proceso de desinfección (figura 2.3 literal C), los explantes fueron inoculados en medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) (tabla 2.2) enriquecido con 30 gL⁻¹ de sacarosa y 6 gL⁻¹ de agar (figura 2.3 literal D), donde se introdujo una yema por frasco de vidrio, en el que contenía 30 mL de medio de cultivo. Los cuales se incubaron a 24 ± 2° C de temperatura, 60% ± 2 de humedad relativa, 4000 luxes y bajo fotoperiodo de 16/8 durante 21 días.

Tabla 2.2: Composición del medio Murashinge & Skoog (1962)

Sales	Concentración mgL ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
MnSO ₄ .H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KI	0.83
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	0.2
NaMoO ₄ .2HO ₂	0.25
FeO ₄ .7H ₂ O	27.85
Na.EDTA	37.25
Acido nicotínico	0.5
Pirodoxina	0.5
Tiamina	0.1
Glicina	2.0
Mioinositol	100

**Figura 2.3:** Proceso de desinfección y siembra del explante: A. Inmersión en etanol al 70%, B. Inmersión en hipoclorito de sodio, C. Corte del explante, D. Siembra del explante (Villamar, 2014).

Repeticiones: diez repeticiones por tratamiento.

Unidad experimental: un frasco de vidrio de 250 mL que contenía 30 mL de medio de cultivo que se inoculó una yema.

Variables evaluadas:

Contaminación: la presencia de microorganismos (bacterias u hongos), esto se determinó mediante observación. Para lo cual se estableció un sistema de codificación; asignando un valor de cero (0) a los frascos que no presentaron contaminación y un valor de uno (1) a los que se halló contaminados (figura 2.4).

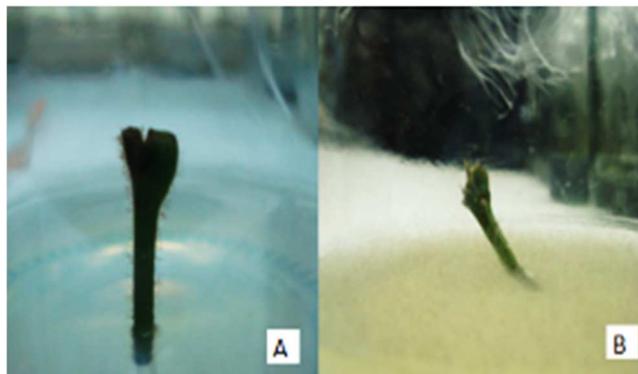


Figura 2.4: Explante de guaba (*Inga insignis*): A. Sin contaminación, B. Contaminado (Villamar, 2014).

Viabilidad: capacidad del explante de desarrollarse adecuadamente en el medio de cultivo, esto se determinó por inspección de los explantes y se asignó un valor de cero (0) en los frascos que se observó necrosis y un valor de uno (1) a los que mantuvieron sus tejidos sanos (figura 2.5).

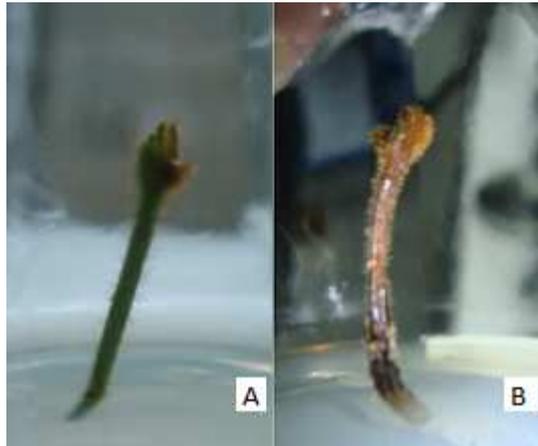


Figura 2.5: Explante de guaba (*Inga insignis*): A. Viable, B. Necrosado (Villamar, 2014).

Evaluación: a los 21 días, es decir a las tres semanas después de la siembra.

2.5 Etapa II: establecimiento - inducción de brotes

El medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) (m1), según Stein, Paiva, Pereira, & Nogueira (2008), lo reportó como idóneo en el cultivo *in vitro* de *Inga Vera*, y de acuerdo a Flor (2013) trabajo en la micropropagación de *Prosopis pallida* y Vengadesan, Ganapathi, Prem Anand, Ramesh y Anbazhagan (2008), en organogénesis de *Acacia sinuata*, especies pertenecientes a la familia Fabaceae se empleó con éxito el mismo medio de cultivo al 50% (m2), por lo cual se emplearon dichos medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de *Inga Insignis* con: 30 gL⁻¹ de sacarosa; 6 gL⁻¹ de agar; y diferentes concentraciones de 6 - Benzil Amino Purina (BAP) (0.0, 1.0, 2.0, 3.0 mgL⁻¹) (tabla 2.3), el pH se ajustó a 5.8 ± 0.01.

Tabla 2.3: Tratamientos a ser evaluados para el establecimiento - inducción de brotes de guaba (*Inga insignis*).

Tratamiento	Medio de cultivo	Concentración de BAP mgL ⁻¹
1	m1	0.0
2	m1	1.0
3	m1	2.0
4	m1	3.0
5	m2	0.0
6	m2	1.0
7	m2	2.0
8	m2	3.0

Se utilizó el protocolo de desinfección que presento los mejores resultados, es decir, menor porcentaje de contaminación y mayor número de explantes viables. Completado el proceso de desinfección, en la cámara de flujo laminar, previamente desinfectada con alcohol, bajo condiciones de asepsia se introdujo una yema por frasco de vidrio que contenía 30 mL de medio de cultivo. Todos los medios se autoclavaron durante 20 minutos a 121° C y 15 psi de presión y posterior a la siembra se incubaron 24 ± 2° C a de temperatura, 60% ± 2 de humedad, 4000 luxes y un fotoperiodos 16/8, durante 28 días.

Repeticiones: diez repeticiones por cada tratamiento.

Unidad experimental: frasco de vidrio de 250 mL, que contenía 30 mL de medio de cultivo con un explantes.

Variables evaluadas:

Tiempo a la brotación: tiempo expresado en días, a partir del día de siembra, en el que aparece el primer brote (figura 2.6 literal A).

Numero de brotes emitidos: número de brotes formados a partir de cada yema inoculada (figura 2.6 literal B). Esta variable se evaluará a los 28 días de transcurrida la siembra.



Figura 2.6: Observación de las variables de la etapa de establecimiento: A. Primer brote, B. Número de brotes (Villamar, 2014).

Evaluación: todos los días, hasta 28 días después de la siembra.

2.6 Etapa III: multiplicación

Posterior a los 28 días en la etapa de inducción de brotes, se seleccionó las yemas que presentaron mejor respuesta vegetativa, y se las empleó para la fase de multiplicación. Además se utilizó el mejor medio de cultivo de la fase anterior entre Murashinge & Skoog (1962) al 100% o 50% de concentración de sales, de acuerdo a los resultados obtenidos (mayor número de brotes y menor tiempo de brotación).

En cámara de flujo laminar, previamente desinfectada con alcohol y en condiciones asépticas, se extrajo los explantes de su medio, adicionalmente se seccionaron en yemas individuales, y se colocaron una yema con un entrenudo de un tamaño de 0.5 a 1.0 cm por frasco, que contienen medio de cultivo adicionado con: diferentes concentraciones de 6 – Benzil Amino Purina (BAP) (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 mgL⁻¹) (tabla 2.3), y de giberelina GA₃ (0.5, 1.0 mgL⁻¹), la cual fue esterilizada por filtración con filtro milipore de 0.22 μm, dentro de la cámara de flujo laminar y se añadió al medio de cultivo después de ser autoclavado durante 20 minutos a 121° C y 15 psi de presión, cuando este tenía una temperatura de 50-60°C (figura 2.7), se realizó este procedimiento debido a que es un compuesto termolábil, ya que el 90% de su actividad se pierde en el autoclave (Pierik, 1997); mientras que

permanecerá constante: la concentración de Ácido Naftalen Acético o ANA (0.1 mgL^{-1}), ya que se ha reportado resultados exitosos a esta concentraciones combinado con BAP ((Sancak, 1999; Abedini, Boeri, Marinucci, Ruscitti, & Scelzo, 2000; Joshi, Bisht, Sharma, & Uniyal, 2003; Agrawal & Sardar, 2006).

Por otra parte, a pesar que en las anteriores etapas no se presentó oxidación de los explantes en el medio de cultivo, mediante ensayos previos se determinó que el carbón activado es la sustancia más adecuada para contrarrestar la oxidación durante esta fase, por lo cual se añadió 1.0 mgL^{-1} carbón activado; además se adicionó 30 gL^{-1} de sacarosa; 6 gL^{-1} de agar, y se ajustó el pH se ajustó a 5.8 ± 0.01 .

Posterior a la siembra se incubaron a $24 \pm 2^\circ \text{C}$ de temperatura, $60\% \pm 2$ de humedad, 4000 luxes y un fotoperiodos 16/8, donde permanecieron por un periodo de 28 días.



Figura 2.7: Preparación de la giberelina: A. Filtración, B. Colocación en el medio de cultivo, C. Dispensación de los medios de cultivo (Villamar, 2014).

Tabla 2.4: Tratamientos para la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

Tratamiento	Concentración de GA ₃ mgL ⁻¹	Concentración de BAP mgL ⁻¹
1	0.5	0.0
2	1.0	0.5
3	0.5	1.0
4	1.0	1.5
5	0.5	0.0
6	1.0	0.5
7	0.5	1.0
8	1.0	1.5

Repeticiones: diez repeticiones por cada tratamiento.

Unidad experimental: un frasco de vidrio de 250 mL que contenía 30 mL de medio de cultivo inoculado una yema con un entrenudo de un tamaño aproximadamente de 0.5 a 1.0 centímetro.

Variables de respuesta:

Tiempo a la brotación de los entrenudos: es el tiempo expresado en días, a partir del día de siembra, en el que aparece la primera yema meristemática (figura 2.7 literal A). Esta variable se evaluó durante 15 días.

Numero de brotes: número de brotes obtenidos a partir del brote inicial (figura 2.7 literal B). Esta variable se evaluó a los 28 días de incubación.

Altura: longitud del brote desde su origen hasta la yema apical a los 28 días de incubación (figura 2.2 literal C).

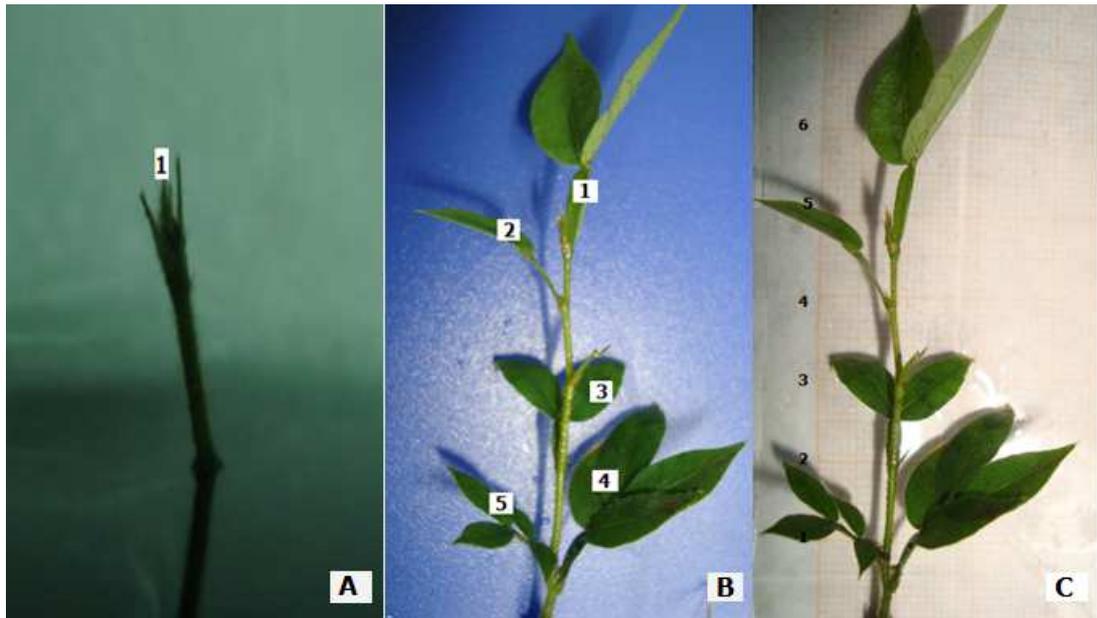


Figura 2.8: Observación de las variables en la fase de multiplicación: A. Primer brote, B. Número de brotes, C. Altura del brote (Villamar, 2014).

2.7 Etapa IV: enraizamiento

Una vez obtenidos los nuevos brotes, fueron colocados en el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) al 50% de sales con 1.0 gL^{-1} de carbón activado (Goyal *et al.*, 2012), y diferente balance hormonal, sin ninguna concentración de citoquininas pero con diferente concentración de auxina, que fue el Ácido Indol Butírico o IBA ($0.0, 0.5, 1.0, 1.5 \text{ mgL}^{-1}$) (Ortiz, Gonzáles, & Koch, 2007) (tabla 2.4), el pH se ajustó a 5.8 ± 0.01 .

Todos los medios de cultivo se autoclavaron durante 20 minutos a 121°C y 15 psi de presión y posterior a la siembra se incubaron a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $60\% \pm 2$ de humedad relativa, 4000 luxes y un fotoperiodo de 16/8.

Tabla 2.5: Tratamientos para la fase de enraizamiento de guaba (*Inga insignis*).

Tratamiento	Concentración de IBA mgL ⁻¹
1	0.0
2	0.5
3	1.0
4	1.5

Repeticiones: diez repeticiones por cada tratamiento

Unidad experimental: un frasco de vidrio de 250 mL que contenía 30 mL de medio de cultivo en el que fue inoculado con un brote con dos entrenudos de un tamaño aproximado de 2.0 a 3.0 centímetros.

Variables de respuesta:

Tiempo al enraizamiento: Son los días que demora la aparición de la radícula, esta variable se evaluó durante 42 días de incubación.

Longitud de la plántula: es la altura de la plántula expresada en centímetros a los 42 días después de la siembra.

Longitud de la raíz: longitud de las raíces en centímetros a los a los 42 días a partir de la siembra.

Número de raíces: número de raíces emitidas durante los 42 días, es decir a las cuatro semanas a partir de la siembra.



Figura 2.9: Observación de las variables en la fase de enraizamiento: A. Primera raíz, B. Longitud de la plántula, C. Longitud raíz, D. Número de raíces (Villamar, 2014).

2.8 Análisis Estadístico

Los datos se analizaron mediante: un análisis estadístico exploratorio, mediante gráficos exploratorios en base a tablas de contingencia realizados en EXCEL 2010, y un análisis estadístico inferencial se realizó con el programa estadístico InfoStat¹, para las variables cuantitativas se realizó

¹Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Cordova, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

análisis de varianza (ANOVA) utilizando simultáneamente la prueba de Duncan de comparación múltiple de medias considerando el coeficiente de variación; mientras que para las variables dicotómicas se efectuó prueba de chi-cuadrado dependencia, regresión logística y análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar diferencias estadísticas entre los tratamientos. La verificación de supuestos de normalidad se llevó a cabo mediante la prueba de Shapiro-Wilks (modificado). Todas estas pruebas estadísticas, se realizaron al 5% de significancia, por lo cual, se consideró el rechazo de la hipótesis nula si existen valores menores al nivel de significación ($p > 0.05$), mientras, que no rechazamos la hipótesis nula si existen diferencias significativas ($p > 0.05$).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

En la micropropagación *in vitro* de la especie *Inga insignis*, se realizó en diferentes fases; establecimiento del cultivo aséptico, inducción de brotes, multiplicación y enraizamiento.

3.1 Etapa I: desinfección

Durante esta etapa se evaluó la contaminación y la viabilidad, a partir de cuatro tratamientos de desinfección con variaciones en el tiempo de exposición y concentración de hipoclorito de sodio, descritos en la tabla 2.1. Los explantes desinfectados fueron sembrados en el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) con diez repeticiones por tratamiento y fueron evaluados a los 21 días de la siembra de los explantes.

3.1.1 Contaminación

Para el proceso de desinfección, se evaluó la unidad experimental, presentaba contaminación si existía presencia de bacterias u hongos o ambos en los explantes de yemas de guaba (*Inga insignis*) obteniendo los siguientes resultados.

3.1.1.1 Análisis exploratorio de datos

Se realizó una tabla de contingencia (tabla 3.1), en donde se indica el número de explantes no contaminados durante los tratamientos de desinfección. Se obtuvo el índice más bajo de contaminación en el tratamiento 4 (1.5% v/v hipoclorito de sodio y 15 minutos), y una elevada contaminación en el tratamiento 1 (1% v/v hipoclorito de sodio y 10 minutos). Además se muestra que a medida que se incrementa la concentración de hipoclorito de sodio, se reduce la contaminación (figura 3.1).

Tabla 3.1: Tabla de contingencia para la variable contaminación respecto a los tratamientos de desinfección de segmentos nodales de guaba (*Inga insignis*).

		Tiempo de inmersión	
		10 min	15 min
Concentración de hipoclorito de sodio, en %	1% v/v	2	5
	1.5% v/v	8	9

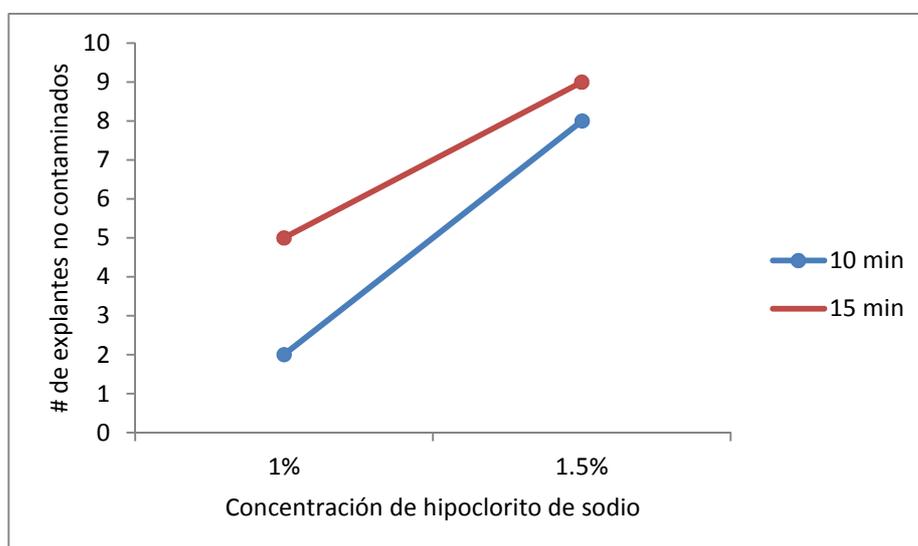


Figura 3.1: Gráfica de interacción del número de explantes no contaminados en función de la concentración de NaClO para tiempo de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección.

La mayor tasa de contaminación se observó en la concentración de 1% v/v de hipoclorito de sodio (figura 3.2), conjuntamente se observa que no existe interacción entre el tiempo de inmersión y la concentración de hipoclorito de sodio.

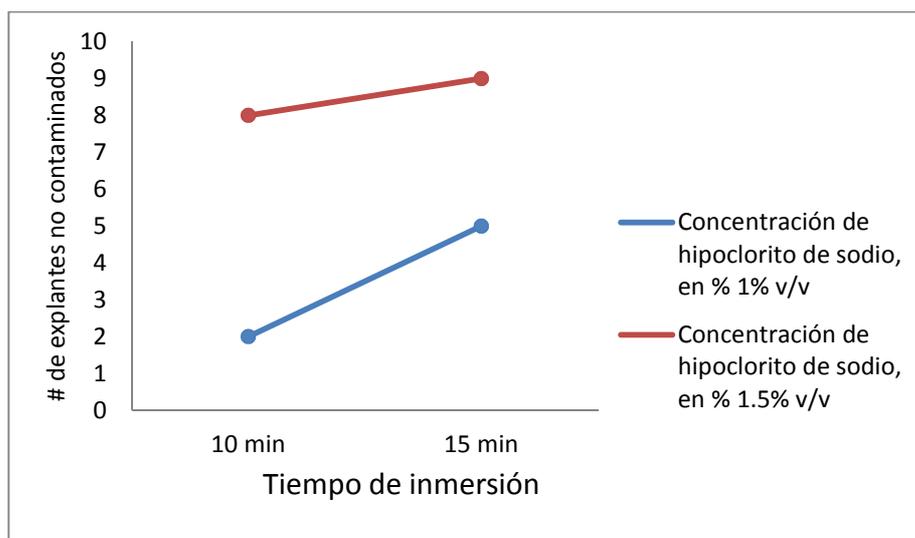


Figura 3.2: Grafica de interacción del número de explantes no contaminados en función del tiempo de inmersión para la concentración de NaClO empleados en los tratamientos de desinfección.

Adicionalmente, se analizó la relación de los factores aplicados (concentración y tiempo) y la variable contaminación, mediante una distribución de frecuencias de la interacción; se evidencia que la concentración de 1.5% v/v de hipoclorito de sodio es eficiente para el proceso de establecimiento del cultivo aséptico y al ser empleado durante un tiempo de inmersión de 15 minutos, resulto en un porcentaje de descontaminación alto (90%), por lo tanto la combinación de 1% de hipoclorito de sodio y 10 minutos es el menos eficiente para el protocolo de desinfección debido a que presento el porcentaje de descontaminación más bajo (20%), ver anexo B.1.

3.1.1.2 Análisis inferencial de datos

Se utilizó una prueba de hipótesis chi-cuadrado de dependencia empleando un nivel de significación de $\alpha = 5\%$ (tabla 3.2), para analizar la relación entre la contaminación frente la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión aplicado a los explantes, se obtuvo un valor de $p = 0.4037$, lo que indica que no existe significancia estadística, por lo

cual se acepta la hipótesis nula que sugiere que el porcentaje de contaminación no depende de la concentración de hipoclorito de sodio y del tiempo de inmersión.

Tabla 3.2: Prueba de chi - cuadrado para la contaminación con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0.70	1	0.4037
Chi Cuadrado MV-G2	0.72	1	0.3970
Irwin- Fisher bilateral	-0.16		0.6529
Coef. Conting. Cramer	0.12		
Coef. Conting. Person	0.17		
Coeficiente Phi	-0.17		

De acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) se estableció que la variable de explantes contaminados no posee una distribución normal ($p < 0.0001$), como se muestra en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los explantes no contaminados respecto los tratamientos de desinfección empleados en los explantes de guaba.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P(UnilateralD)
Explantes no contaminados	40	0.60	0.50	0.59	<0.0001

No se cumple el supuesto de normalidad requerido en un diseño experimental paramétrico, esto según la figura de cuantiles (anexo B.1.2) de explantes contaminados debido a que los residuos aparentan seguir una distribución normal.

Debido a que la contaminación es una variable dicotómica se realizó un análisis de varianza no paramétrico mediante la prueba de Kruskal-Wallis empleando un nivel de significación de $\alpha = 5\%$, el que revelo que existe significancia estadística $p = 0.0068$ afirmando que si hay diferencia en el efecto de los tratamientos de desinfección en cuanto a la variable

contaminación (tabla 3.3), por lo cual los tratamientos de desinfección generaron dos rangos, ver tabla 3.5.

Tabla 3.4: Prueba de Kruskal-Wallis para la variable contaminación.

Variable	Tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Contaminación	1(1%-10 min)	0.20	0.42	0.00	8.78	0.0068
	2(1%-15 min)	0.50	0.53	0.50		
	3(1.5%-10 min)	0.80	0.80	1.00		
	4(1.5%-15min)	0.90	0.90	1.00		

Tabla 3.5: Prueba de Kruskal-Wallis para los explantes contaminados en los tratamientos de desinfección de guaba (*Inga insignis*).

Tratamiento	Rank.	Grupo
1 (1% - 10 min)	215.50	A
2 (1% - 15 min)	248.50	A
3 (1.5% - 10 min)	272.50	B
4 (1.5% - 15 min)	296.50	B

Los cocientes de probabilidades (O.R) obtenidos en la regresión logística (tabla 3.6), se puede observar que utilizando los parámetros 1.5% v/v de hipoclorito de sodio existe mayor probabilidad de no contaminación $p = 0.0025$, al contrario de la variable tiempo de inmersión ($p = 0.1314$), para un nivel de significancia $\alpha = 5\%$.

Tabla 3.6: Regresión logística para los datos categóricos de contaminación en los tratamientos de desinfección de yemas de guaba (*Inga insignis*).

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald LI (95%)	Wald LS (95%)	Wald CHI*	p-valor
Constante	- 1.26	0.68	0.28	0,07	1.08	3.42	0.0642
NaClO (1.5% v/v)	2.53	0.84	12.53	64.67	64.67	9.11	0.0025
Tiempo (15 min)	1.18	0.81	3.26	15.90	15.90	2.24	0.1433

3.1.2 Viabilidad

Durante el proceso de desinfección, la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión puede inducir necrosis del material vegetal, por lo que es esencial determinar que tratamiento de desinfección genera el menor daño posible al explante para su posterior desarrollo.

3.1.2.1 Análisis exploratorio de datos

Se realizó una tabla de contingencia de acuerdo a los tratamientos de desinfección empleados con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión (tabla 3.7), la cual muestra el número de explantes que no presentaron necrosis después de 21 días de la siembra. Obteniéndose números similares de explantes sanos en todos los tratamientos (figura 3.3).

Tabla 3.7: Tabla de contingencia para la variable viabilidad, respecto a los tratamientos de desinfección para el factor medios de cultivo, para la variable número de brotes, durante la fase de inducción de brotes de guaba (*Inga insignis*).

		Tiempo de inmersión	
		10 minutos	15 minutos
Concentración de hipoclorito de sodio, en %	1% v/v	10	9
	1.5% v/v	9	9

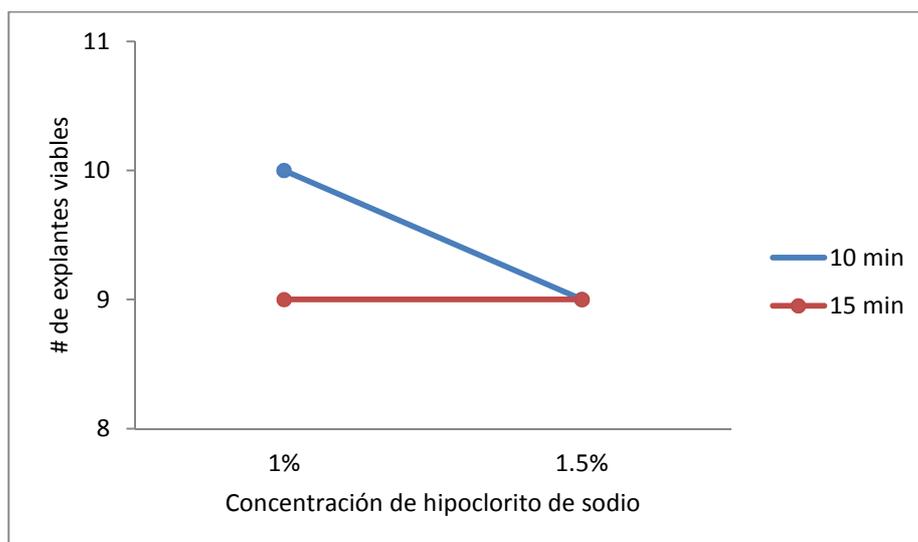


Figura 3.3: Grafica de interacción del número de explantes viables en función de la concentración de NaClO para el tiempo de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección.

En la figura 3.4 se observa que no existe relación entre la viabilidad frente al tiempo de inmersión y la concentración de hipoclorito de sodio, debido a que se observa el mismo número de explantes viables con la concentración de 1% y 1.5% v/v de hipoclorito de sodio con sus respectivos tiempos de inmersión.

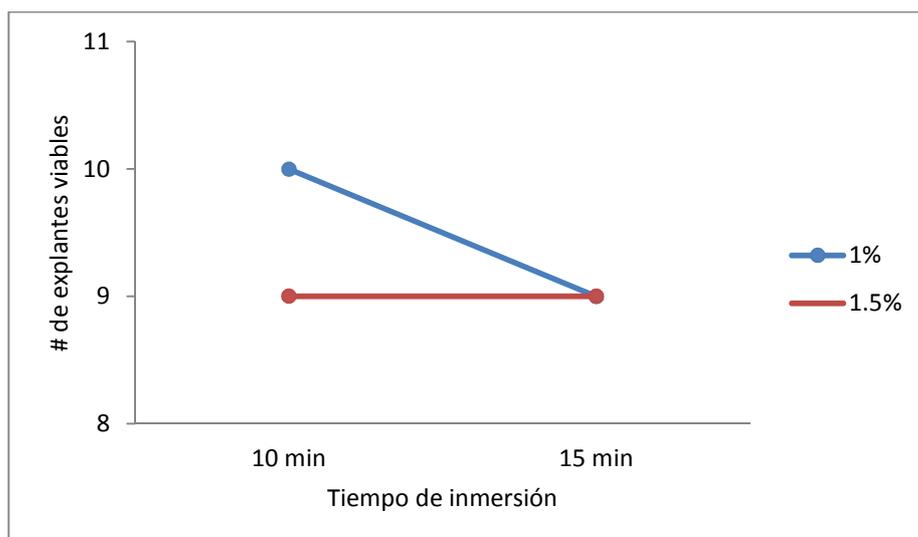


Figura 3.4: Grafica de interacción del número de explantes viables en función del tiempo de inmersión para la concentración de NaClO en los tratamientos de desinfección empleados.

Se analizó la relación de los factores aplicados (concentración y tiempo) y la variable viabilidad, mediante una distribución de frecuencias de la interacción; se evidenció que la concentración de 1% hipoclorito de sodio con un tiempo de inmersión de 10 minutos (tratamiento 1) es el más eficiente, para esta variable, pues presentó el 100% de tejidos sanos, mientras que los demás tratamientos presentaron el mismo porcentaje (90%). Al hallarse relativamente el mismo porcentaje de explantes viables para los cuatro tratamientos se puede señalar que la interacción de los factores evaluados no influye en la viabilidad, ver anexo B.2.

3.1.2.2 Análisis inferencial de datos

Se efectuó la prueba de chi – cuadrado de dependencia empleando un nivel de significación de $\alpha = 5\%$ para la variable viabilidad (tabla 3.8), en la que se obtuvo un valor ($p=0.8728$), demostrando que no existe significancia estadística. En este caso los resultados indican un rechazo de la dependencia por lo cual se sugiere que la viabilidad no depende de la concentración de hipoclorito de sodio ni del tiempo de inmersión.

Tabla 3.8: Prueba chi – cuadrado para la viabilidad con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio- tiempo de inmersión.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0.03	1	0.8728
Chi Cuadrado MV-G2	0.03	1	0.8728
Irwin- Fisher bilateral	0.03		>0.9999
Coef. Conting. Cramer	0.02		
Coef. Conting. Person	0.03		
Coeficiente Phi	0.03		

Se determinó que la variable viabilidad no tiene una distribución normal ($p < 0.0001$), esto a través la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 3.9: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los explantes viables respecto los tratamientos de desinfección empleados en los explantes de guaba.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P(UnilateralD)
Viabilidad	40	0.93	0.27	0.31	<0.0001

En la figura de cuantiles de explantes viables (anexo B.2.2), se puede evidenciar que no se cumple el supuesto de normalidad necesario en un diseño experimental paramétrico ya que los residuos aparentan seguir una distribución normal.

Los datos analizados para esta variable son dicotómicos, por lo tanto, no cumple con los supuestos de normalidad, es por esta razón que se realizó un análisis de varianza no paramétrico con el fin de determinar el comportamiento de esta variable de acuerdo al tratamiento aplicado, mediante la prueba de Krukal–Wallis, se determinó que no existe diferencia estadística significativa ($p = 0.7882$), por lo cual no se halló diferencia en el efecto de los tratamientos de desinfección en cuanto a la variable viabilidad (tabla 3.10).

Tabla 3.10: Prueba de Kruskal–Wallis para la variable viabilidad.

Variable	Tratamiento	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Viabilidad	1 (1%-10 min)	1.00	0.00	1.00	0.22	0.7882
	2 (1%-15 min)	0.90	0.32	1.00		
	3 (1.5%-10 min)	0.90	0.32	1.00		
	4 (1.5%-15min)	0.90	0.32	1.00		

Los cocientes de probabilidades (O.R) obtenidos en la regresión logística (tabla 3.11), se puede afirmar que la variable independiente concentración de hipoclorito de sodio no influye en la variable dependiente viabilidad al igual que la variable independiente tiempo de inmersión, debido a que no presentaron evidencia estadística para un nivel de significancia $\alpha = 5\%$.

Tabla 3.11: Regresión logística para los datos categóricos de viabilidad en los tratamientos de desinfección de segmentos nodales de guaba (*Inga insignis*).

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald LI (95%)	Wald LS (95%)	Wald CHI*	p-valor
Constante	3.38	1.33	29.50	2.17	401.48	6.45	0.0111
Tiempo (15 min)	-0.75	1.27	0.47	0.04	5.71	0.35	0.5539
NaClO (1.5% v/v)	-0.75	1.27	0.47	0.04	5.71	0.35	0.5539

3.2 Etapa II: establecimiento - inducción de brotes

En esta etapa se realizó con segmentos nodales desinfectadas con el tratamiento 4 (1.5% hipoclorito de sodio - 15 minutos), el cual presento los mejores resultados de acuerdo a las variables estudiadas en la fase de establecimiento del cultivo aséptico; estas fueron inoculadas en dos medios de cultivo: Murashige & Skoog (1962) (m1), y el mismo medio de cultivo al 50% (m2), adicionado con 30 gL^{-1} de sacarosa; 6 gL^{-1} de agar; y diferentes concentraciones de 6 – Benzil Amino Purina (BAP) (0.0, 1.0, 2.0, 3.0 mgL^{-1}) (tabla 2.2), el pH se ajustó a 5.8 ± 0.01 . En el transcurso de esta fase se evaluaron las variables tiempo a la brotación y número de brotes para los cuatro tratamientos planteados en el DCA.

3.2.1 Tiempo a la brotación

Esta variable se evaluó para cada tratamiento descrito en la tabla 2.3, con un total de ocho tratamientos con 10 repeticiones cada uno.

3.2.1.1 Análisis exploratorio de datos

A partir de los datos obtenidos en evaluación de la variable tiempo a la brotación, se realizó una tabla de contingencia (tabla 3.12), en la que señala el tiempo promedio de brotación para los explantes de guaba (*Inga insignis*),

se observa que el menor tiempo de brotación se obtuvo con la dosis de 2.0 mgL^{-1} de BAP esto en los dos medios de cultivo empleados (tratamientos 3 y 7); mientras que en los tratamientos testigo (1, 5), se obtuvieron el mayor tiempo a la brotación. En la figura 3.5 se observa que la mejor respuesta para esta variable se obtiene al emplear el medio Murashinge & Skoog (1962) (m1).

Tabla 3.12: Tabla de contingencia de tiempo a la brotación promedio en la fase de inducción de brotes de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de BAP y medio de cultivo.

Medio de cultivo	Concentración de BAP (mgL^{-1})			
	0.0	1.0	2.0	3.0
MS	12.40	9.30	6.90	10.20
MS/2	13.70	12.50	9.10	13.10

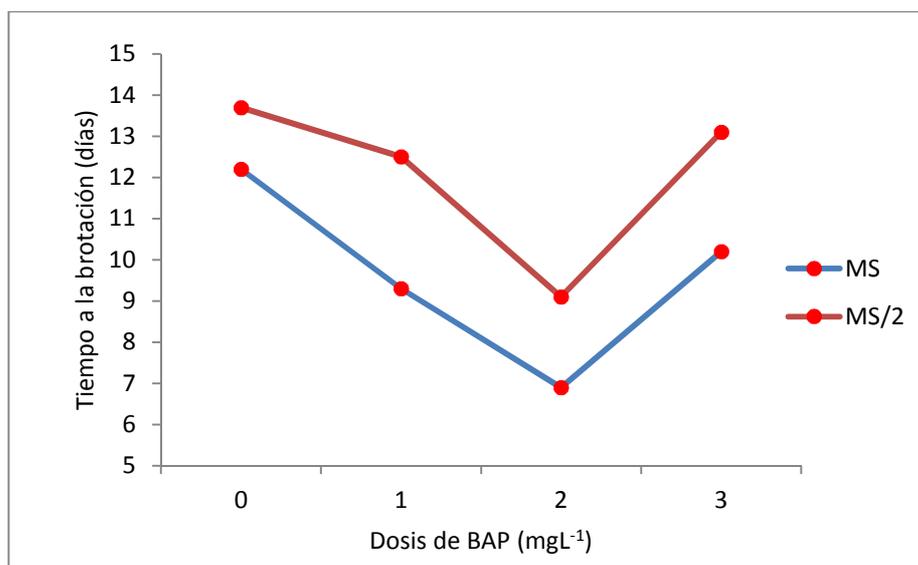


Figura 3.5: Tiempo a la brotación respecto a la dosis de BAP, para la variable tiempo a la brotación, durante la fase de inducción de brotes de guaba (*Inga insignis*).

En la figura 3.6 se observa que la concentración de 2.0 mgL^{-1} de BAP, es la dosis que menor tiempo a la brotación presenta; mientras que con la concentración de 1.0 y 3.0 mgL^{-1} de BAP se observó un comportamiento

similar. La menor respuesta vegetativa se obtiene con la ausencia de esta hormona.

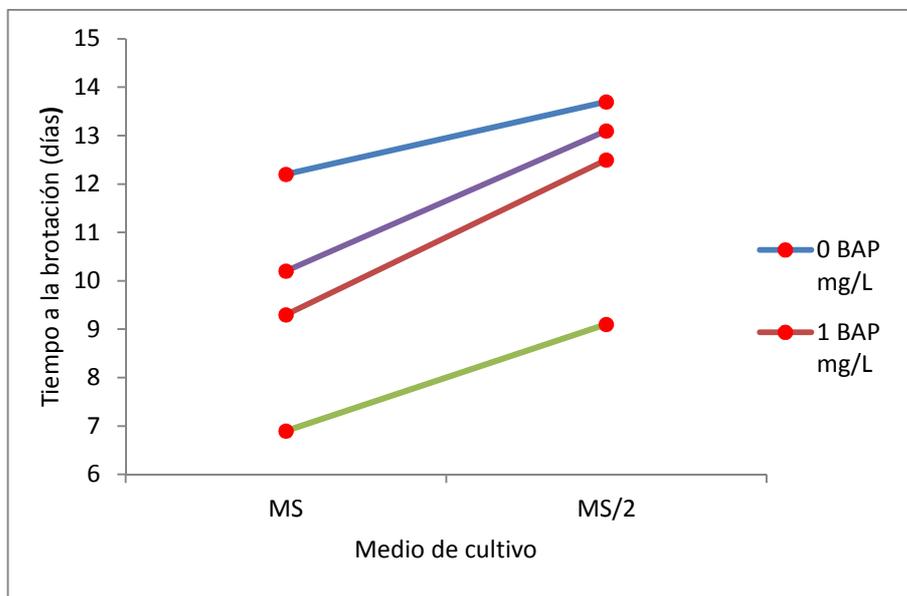


Figura 3.6: Tiempo a la brotación respecto a las concentraciones de BAP empleados en la fase de establecimiento de guaba (*Inga insignis*).

Adicionalmente se realizó un gráfico de barras de las medias obtenidas para la variable tiempo a la brotación en los medios de cultivo, en donde se puede observar que el menor tiempo a la brotación, con una media de 9.65 días a la brotación en el medio de cultivo Murashinge & Skoog (1962); mientras en el medio de cultivo Murashinge & Skoog (1962) al 50% de concentración de sales se observó un mayor número de días para la brotación con una media de 12.10 días a la brotación, ver anexo C.1.2.

3.2.1.2 Análisis inferencial de datos

En el análisis de varianza (ANOVA) al $\alpha = 5\%$, se detectó alta significancia estadística ($p < 0.0001$) para los factores Medios de cultivo, dosis de 6- Bencil Amino Purina (BAP) mientras que para la interacción MxB existió significancia estadística ($p < 0.0021$). El promedio general fue 10.88

días a la brotación. El coeficiente de variación fue 6.73%, porcentaje aceptable para esta investigación (tabla 3.13).

Tabla 3.13: Análisis de la varianza para la variable tiempo a la brotación en la fase de inducción de brotes guaba (*Inga insignis*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	392.15	7	56.02	104.50	<0.0001
Conc. BAP	263.45	3	87.82	163.80	<0.0001
Medio de cultivo	120.05	1	120.05	223.93	<0.0001
Conc.BAP* Medio de cultivo	8.65	3	2.88	5.38	0.0021
Error	38.60	72	0.54		
Total	430.75	79			

En esta variable se cuantifico el tiempo en días que tarda en aparecer la yema meristemática desde la siembra del explante. La prueba de Duncan al 5% para los factores medios de cultivo (tabla 3.14) detecto dos rangos de significación: obteniéndose la mayor respuesta en el medio de cultivo m1 (MS) con un promedio de 9.65 días a la brotación, y un segundo rango con una respuesta menor el medio de cultivo m2 (MS/2) con un promedio de 12.10 días a la brotación.

Tabla 3.14: Prueba de Duncan al 5% para el factor medios de cultivo para la variable tiempo a la brotación, durante la fase de inducción de brotes de guaba (*Inga insignis*).

Medio de cultivo	Medias	n	E.E	Grupo
MS	9.65	40	0.12	A
MS/2	12.10	40	0.12	B

La prueba de Duncan al 5% para el factor dosis de BAP (tabla 3.15) detectó cuatro rangos de significación. La mayor respuesta, es decir el

primer rango, se consiguió con la concentración 2.0 mgL⁻¹ BAP, con una media de 8 días a la brotación; en segundo rango se obtuvo con la concentración de 1.0 mgL⁻¹ BAP, con una media de 10.90 días a la brotación; en tercer rango se obtuvo con la concentración de 3.0 mgL⁻¹ BAP, con una media de 11.65 días a la brotación; mientras que la menor respuesta, ubicándose en el último rango se presentó concentración de 0.0 mgL⁻¹ BAP, registró una media de 12.85 días a la brotación.

Tabla 3.15: Prueba de Duncan al 5% para el factor dosis de BAP en la variable días a la formación de brotes, durante la fase de establecimiento de guaba (*Inga insignis*).

Concentración BAP	Medias	n	E.E	Grupo
2.0	8.00	20	0.16	A
1.0	10.90	20	0.16	B
3.0	11.65	20	0.16	C
0.0	12.65	20	0.16	D

En la interacción M x B (tabla 3.16) indicó 6 rangos de significación para esta fase. En el primer rango se ubicó con el menor número de días a la formación de brote, el tratamiento 3 (MS + 2.0 mgL⁻¹ BAP) con una media de 6.90 días; el último rango con el mayor número de días fue el tratamiento 5 (MS/2 + 0.0 mg/L⁻¹ BAP) con una media de 13.70 días a la brotación.

Tabla 3.16: Test de Duncan al 5% para el factor interacción medios de cultivo x dosis de BAP, para la variable en la variable días a la formación de brotes, durante la fase de inducción de brotes de guaba (*Inga insignis*).

Concentración BAP	Medio de cultivo	Medias	n	E.E	Grupo
2	MS	6.90	10	0.23	A
2	MS/2	9.10	10	0.23	B
1	MS	9.30	10	0.11	B
3	MS	10.20	10	0.11	C
0	MS	12.20	10	0.11	D
1	MS/2	12.50	10	0.11	D E
3	MS/2	13.10			E F
0	MS/2	13.70			F

Se determinó que la variable días a la brotación no posee una distribución normal ($p < 0.0001$), esto a través la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 3.17: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los días a la brotación respecto los tratamientos de la fase de establecimiento empleados en la micropropagación de guaba.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P(UnilateralD)
Días a la brotación	80	3.08	1.06	0.90	<0.0001

En la figura de cuantiles de días a la brotación (anexo C.1.3) no se cumple el supuesto de normalidad requerido en un diseño experimental paramétrico por que los residuos aparentan seguir una distribución normal, a pesar que, existen datos alejados de la normalidad,

3.2.2 Número de brotes

Esta variable se evaluó para cada tratamiento descrito en la tabla 2.3, con un total de ocho tratamientos con 10 repeticiones cada uno, a los 28 días después de la siembra, se procedió con el conteo de brotes formados a partir de cada segmento nodal de guaba (*Inga insignis*).

3.2.2.1 Análisis exploratorio de datos

Se realizó una tabla de contingencia (tabla 3.18) en la que se observa que el mayor número de brotes se obtuvo con la dosis de 2.0 mg/L^{-1} de BAP esto en los dos medios de cultivo empleados (tratamientos 3 y 7); mientras que en los tratamientos testigo (1, 5), se obtuvieron el menor número de brotes. En la figura 3.7 se observa que la mejor respuesta para esta variable se obtiene al emplear el medio Murashige & Skoog (1962) (m1).

Tabla 3.18: Tabla de contingencia de número de brotes promedio en la fase de establecimiento de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de BAP y medio de cultivo.

		Concentración de BAP (mgL ⁻¹)			
		0.0	1.0	2.0	3.0
Medio de cultivo	MS	1.80	3.60	4.70	3.30
	MS/2	1.70	2.90	3.60	2.70

La gráfica muestra la interacción entre las medias del número de brotes con respecto a la dosis de BAP en los medios de cultivo MS y MS/2; hallándose un número mayor de brotes en el medio de cultivo MS (figura 3.7) a una concentración de 2.0 mgL⁻¹ BAP, es decir en el tratamiento 3.

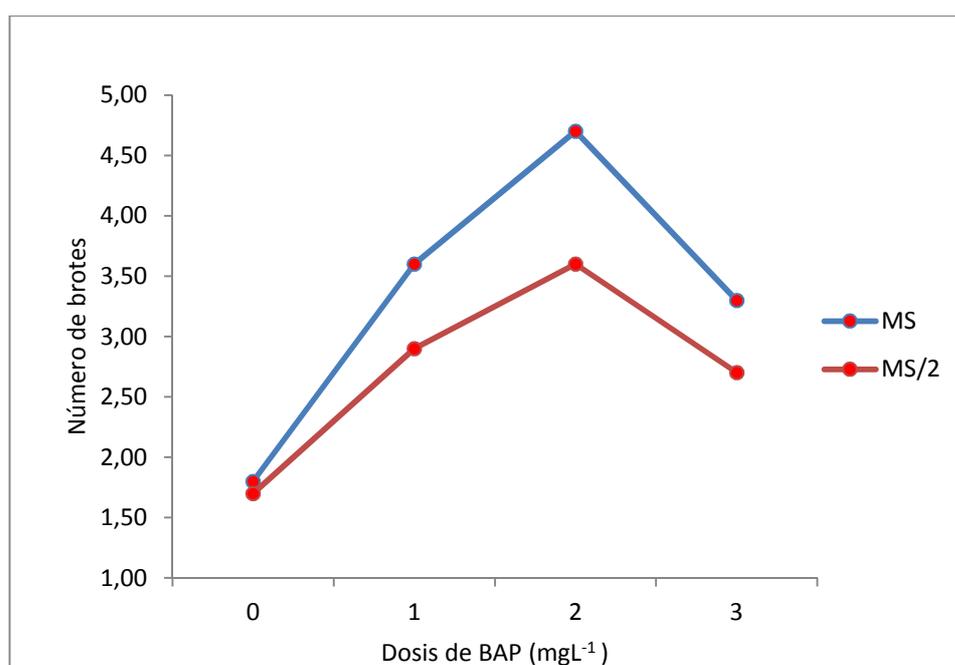


Figura 3.7: Número de brotes respecto a la dosis de BAP, para la variable número de brotes, durante la fase de establecimiento de guaba (*Inga insignis*).

Se observa en la figura 3.8, que el control es decir el tratamiento con ausencia de la hormona BAP, el número de brotes es inferior, a medida que aumenta la hormona a las dosis de 1.0 y 2.0 mgL⁻¹ BAP incrementa el número de brotes, sin embargo al llegar a la concentración de 3.0 mgL⁻¹ BAP

decrece el número de brotes, este comportamiento se aprecia tanto en el medio MS como en el MS/2.

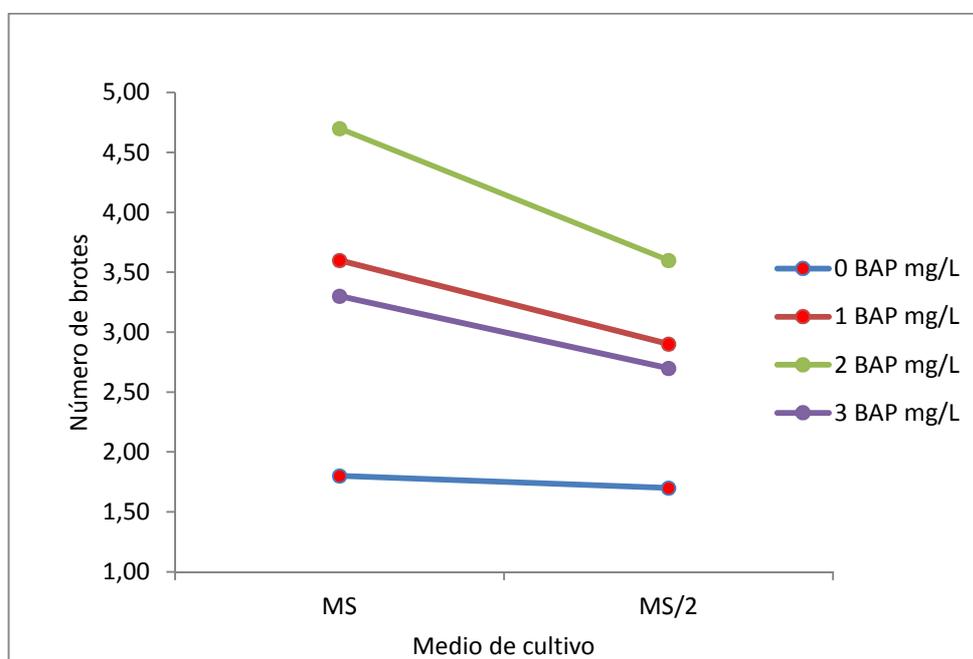


Figura 3.8: Número de brotes respecto a las concentraciones de BAP empleados en la fase de establecimiento de guaba (*Inga insignis*).

Adicionalmente se realizó un gráfico de barras de las medias obtenidas para la variable tiempo a la brotación en los medios de cultivo, en donde se puede observar que la mejor respuesta vegetativa para esta variable, se obtuvo en el medio de cultivo Murashinge & Skoog (1962), con una media de 3.40 brotes/explante; por otra parte en el medio de cultivo Murashinge & Skoog (1962) al 50% de concentración de sales se observó un menor número brotes/explante con una media de 2.75, ver anexo C.2.2.

3.2.2.2 Análisis inferencial de datos

El análisis de varianza (ANOVA) al $\alpha = 5\%$, para la variable número de brotes (tabla 3.19) reveló diferencia estadística alta ($p < 0.0001$) para los factores medio de cultivo y concentración de 6 – Bencil Amino Purina

(BAP); mientras que, existió significancia estadística para la interacción MxB $p = 0.0323$. El promedio general fue 3.04 brotes/explante y el coeficiente de variación fue de 17.22%, un rango aceptable para esta investigación, e indica que las condiciones de trabajo fueron homogéneas.

Tabla 3.19: Análisis de varianza para la variable número de brotes; durante la fase de inducción de brotes de guaba (*Inga insignis*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	69.19	7	9.88	36.12	<0.0001
Conc. BAP	58.84	3	19.61	71.68	<0.0001
Medio de cultivo	7.81	1	7.81	28.55	<0.0001
Conc. BAP* Medio de cultivo	2.54	3	0.85	3.09	0.0323
Error	19.70	72	0.27		
Total	88.89	79			

El test de Duncan al 5% para el factor medio de cultivo (tabla 3.20) detectó dos rangos de significación en el primer rango y evidenciando la mayor respuesta, el medio de cultivo m1 (MS) con una media 3.40 brotes/explante; en el segundo rango, presentando un menor respuesta, se ubicó el medio de cultivo m1 (MS/2) con una media de 2.75 brotes/explantes.

Tabla 3.20: Prueba de Duncan al 5% para el factor medios de cultivo, para la variable número de brotes, durante la fase de inducción de brotes de guaba (*Inga insignis*).

Medio de cultivo	Medias	n	E.E	Grupo
MS	3.35	40	0.08	A
MS/2	2.73	40	0.08	B

La prueba de Duncan al 5% (tabla 3.21) para el factor dosis de BAP reveló tres rangos de significación. En el primer rango con la mayor

respuesta, la concentración de 2.0 mgL⁻¹ BAP, con una media de 4.15 brotes/explante; las dosis de 1.0 y 3.0 mgL⁻¹ BAP se ubicaron en el segundo rango con una media de 3.25 y 3.00 brotes/explantes respectivamente; mientras que, con la menor respuesta, en el tercer rango se halló la concentración de 0.0 mgL⁻¹ BAP, con una media de 1.75 brotes/explante.

Tabla 3.21: Duncan al 5% para el factor dosis de BAP, para la variable número de brotes, durante la fase de inducción de brotes de guaba (*Inga insignis*).

Concentración BAP	Medias	n	E.E	Grupo
2.0	4.15	20	0.12	A
1.0	3.25	20	0.12	B
3.0	3.00	20	0.12	B
0.0	1.75	20	0.16	C

En la interacción MxB (tabla 3.22) indicó 5 rangos de significación para esta fase. En el primer rango se ubicó con el mayor número de brotes, el tratamiento 3 (MS + 2.0mgL⁻¹ BAP) con una media de 4.70 brotes/explante; el último rango con el menor número de brotes el tratamiento 5 (MS/2+0.0mgL⁻¹ BAP) con una media de 1.70 brotes/explante.

Tabla 3.22: Test de Duncan al 5% para el factor interacción medios de cultivo x dosis de BAP, para la variable en la variable días a la formación de brotes, durante la fase de inducción de brotes de guaba (*Inga insignis*).

Concentración BAP	Medio de cultivo	Medias	n	E.E	Grupo
2.0	MS	4.70	10	0.17	A
1.0	MS	3.60	10	0.17	B
2.0	MS/2	3.60	10	0.17	B
3.0	MS	3.30	10	0.17	B C
1.0	MS/2	2.90	10	0.17	C D
3.0	MS/2	2.70	10	0.17	D
1.0	MS	1.80			E
0.0	MS/2	1.70			E

Se determinó que la variable número de brotes no tiene una distribución normal ($p < 0.0001$), esto a través la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 3.23: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para el número de brotes respecto los tratamientos de la fase de establecimiento empleados en la micropropagación de guaba.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P(UnilateralD)
Número de brotes	80	10.88	2.35	0.90	<0.0001

En figura de cuantiles de número de brotes (anexo C.2.3) no sigue el supuesto de normalidad requerido en un diseño experimental paramétrico debido a que los residuos aparentan seguir una distribución normal.

3.3 Etapa III: multiplicación

Una vez establecidos los explantes, se continuo con la etapa de multiplicación, se realizaron dos subcultivos, en la cual se utilizó el medio de cultivo Murashinge & Skoog (1962), debido a que presento los mejores resultados en las variables evaluadas en la etapa anterior.

3.3.1 Tiempo a la brotación

Por tiempo a la brotación, se entiende como el tiempo expresado en días, a partir de la formación de la primera yema meristemática por organogénesis directa mediante el uso de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, en el presente estudio se empleó una concentración constante de ANA, y variaciones de BAP y GA₃, las cuales fueron planteados en la metodología (tabla 2.4).

3.3.1.1 Análisis exploratorio de datos

La tabla de contingencia (tabla 3.24) mostrada a continuación indica el tiempo a la brotación promedio de los brotes de guaba (*Inga insignis*) obtenidos de los tratamientos de multiplicación en función de la concentración de bencilaminopurina (BAP) y concentración de giberelina (GA_3), hallándose el menor tiempo a la brotación en los tratamientos con concentración de 1.0 mgL^{-1} BAP en los dos subcultivos; mientras que con los demás tratamientos se observa menor tiempo a la brotación.

Tabla 3.24: Tabla de contingencia de tiempo a la brotación promedio en la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de BAP y dosis de GA_3 .

Subcultivo	GA_3 (mgL^{-1})	BAP (mgL^{-1})			
		0.0	0.5	1.0	1.5
1	0.5	10.7	9.8	8.1	8.4
	1.0	10.6	9.5	7.9	8.8
2	0.5	10.5	9.8	7.8	8.2
	1.0	10.3	9.2	7.6	8.6

Se puede observar que a medida que la concentración de aumenta BAP disminuye el tiempo a la brotación, hasta llegar a la concentración más alta en la cual aumenta, este comportamiento se aprecia tanto en el primer subcultivo como en el segundo. El menor tiempo a la brotación se obtuvo con la dosis de 1.0 mgL^{-1} BAP con una media de 8.1, 7.9, 7.8 y 7.6 días a la brotación para el primer y segundo subcultivo respectivamente, ver figura 3.9.

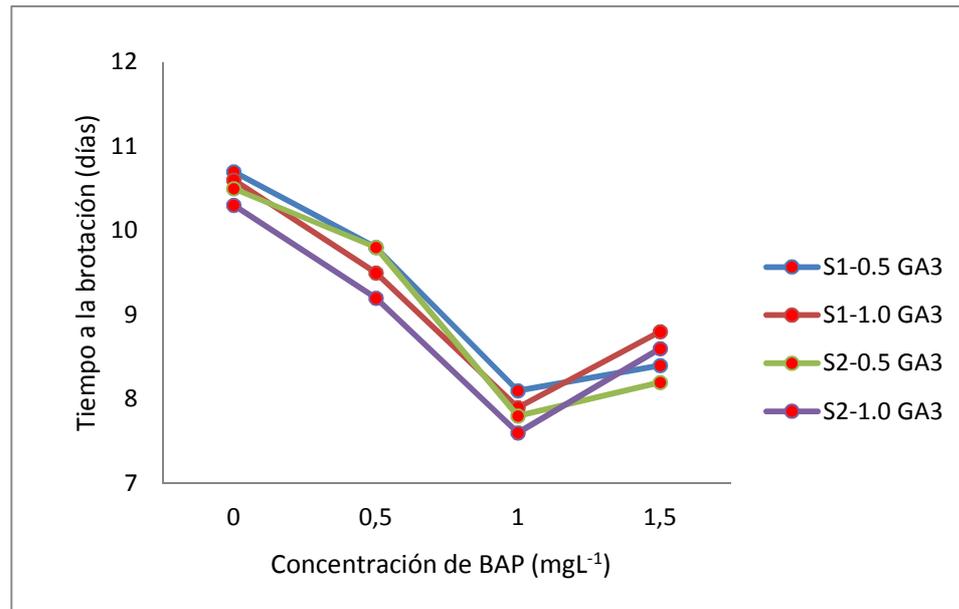


Figura 3.9: Tiempo a la brotación de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de BAP.

También se observó que no existe diferencia entre los tratamientos con 0.5 y 1.0 mgL⁻¹ de GA₃, puesto que generaron números similares de días a la brotación, esto para los dos subcultivos. Estos resultados se pueden visualizar de mejor manera en la figura 3.10.

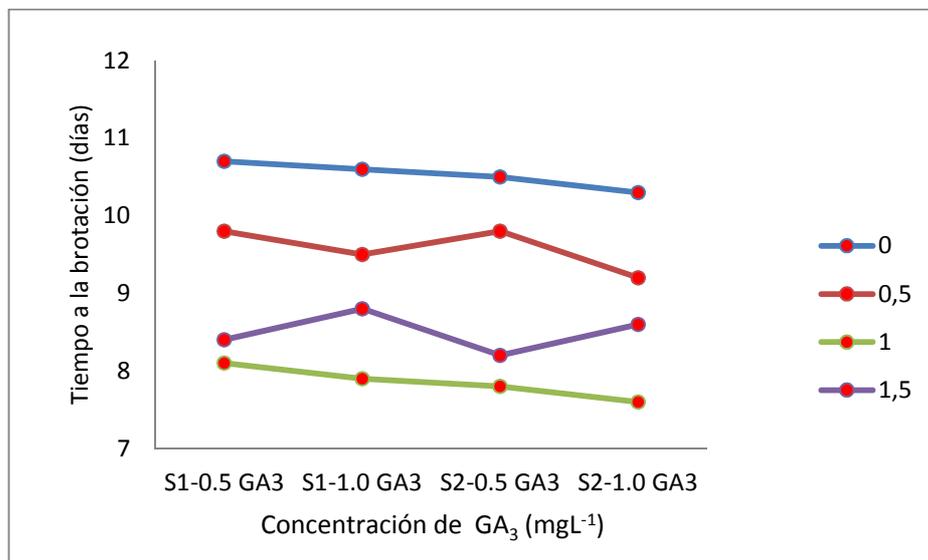


Figura 3.10: Tiempo a la brotación para los brotes de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de GA₃.

3.3.1.2 Análisis inferencial de datos

El análisis de varianza al 5% para la variable tiempo a la brotación, reveló un valor ($p < 0.0001$) para el factor Concentración de 6 – Bencil Amino Purina (BAP), lo que indica que existe alta significancia estadística; entretanto para los factor dosis de ácido giberelico (GA_3), subcultivo e interacciones no se halló significancia estadística ($p < 0.05$), para las demás interacciones. El promedio general del coeficiente de variación fue de 8.59%, y se obtuvo un promedio general de 9.11 días a la brotación (tabla 3.25).

Tabla 3.25: Análisis de varianza para la variable tiempo a la brotación, en la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	173.78	15	11.59	18.91	<0.0001
Concentración BAP	2.02	1	2.02	3.31	<0.0001
Dosis GA_3	167.13	3	55.81	90.95	0.4204
Subcultivo	0.40	1	0.40	0.65	0.0711
Concentración BAP *Dosis GA_3	0.13	3	0.04	0.07	0.1035
Subcultivo* Concentración.BAP	0.10	1	0.10	0.16	0.9768
Subcultivo *Dosis GA_3	3.85	3	1.28	2.10	0.6868
Subc.*Conc.BAP* Dosis GA_3	0.15	3	0.05	0.08	0.9699
Error	88.20	144	0.61		
Total	261.98	159			

La prueba de Duncan al 5% (tabla 3.26) identificó cuatro rangos para el factor concentración de BAP, obteniéndose la mejor respuesta con la dosis 1.0 mgL^{-1} BAP con una media de 7.85 días; mientras que la menor respuesta se obtuvo con la concentración 0.0 mgL^{-1} BAP, con una media de 10.53 días a la brotación.

Tabla 3.26: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de BAP en la variable tiempo a la brotación, durante la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

Concentración BAP	Medias	n	E.E	Grupo
1.0	7.85	40	0.12	A
1.5	8.50	40	0.12	B
0.5	9.58	40	0.12	C
0.0	10.53	40	0.12	D

Se determinó que la variable días a la brotación no tiene una distribución normal ($p < 0.0001$), esto a través la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 3.27: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los días a la brotación respecto los tratamientos de la fase de multiplicación empleados en la micropropagación de guaba.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P(UnilateralD)
Días a la brotación	160	9.18	1.48	0.93	<0.0001

En la figura de cuantiles días a la brotación (anexo D.1.2) no sigue el supuesto de normalidad requerido en un diseño experimental paramétrico debido a que los residuos aparentan seguir una distribución normal.

3.3.2 Número de brotes

En esta variable se contó el número de brotes obtenidos a partir del brote inicial, a los 28 días de incubación.

3.3.2.1 Análisis exploratorio de datos

La tabla de contingencia (tabla 3.28) expuesta a continuación muestra el número de brotes promedio de guaba (*Inga insignis*), obtenidos de los tratamientos de multiplicación en función de la concentración de bencilaminopurina (BAP) y concentración de giberelina (GA_3), obteniéndose

el mayor número de brotes en los tratamientos con concentración de 1.0 mgL^{-1} BAP (tratamientos 3 y 7) en los dos subcultivos; mientras que con los demás tratamientos se observa menor número de brotes.

Tabla 3.28: Tabla de contingencia de número de brotes promedio en la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de BAP y dosis de GA_3 .

Subcultivo	GA_3 (mgL^{-1})	BAP (mgL^{-1})			
		0.0	0.5	1.0	1.5
1	0.5	1.6	1.8	2.7	2.4
	1.0	2.1	2.8	4.2	3.5
2	0.5	1.9	2.0	2.9	2.5
	1.0	2.3	2.7	4.7	3.7

Se puede observar en la figura 3.24 que a medida que la concentración de aumenta BAP aumenta el número de brotes, hasta llegar a la concentración más alta en la cual disminuye, este comportamiento se aprecia tanto en el primer subcultivo como en el segundo. El mayor número de brotes se obtuvo con la dosis de 1.0 mgL^{-1} BAP para el primer y segundo subcultivo respectivamente.

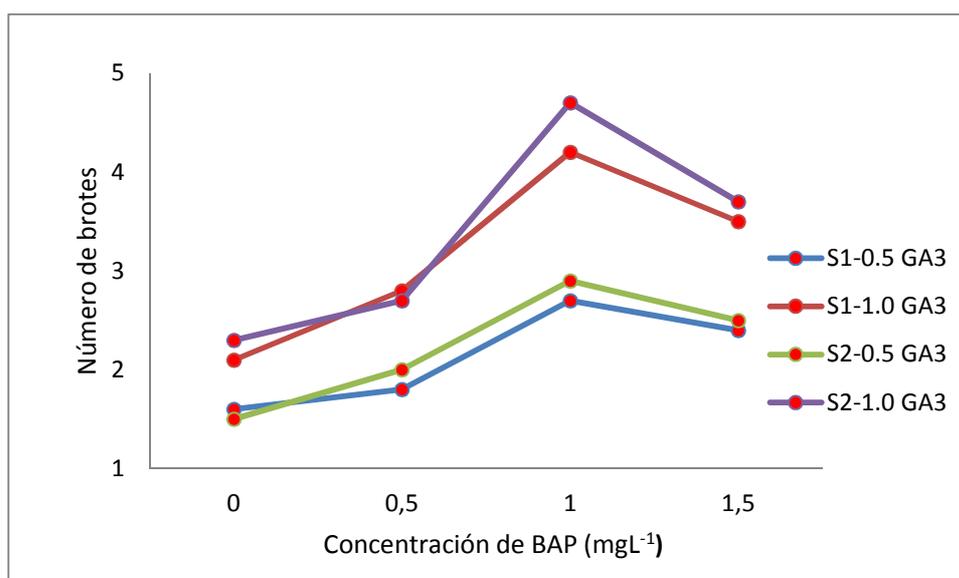


Tabla 3.29: Número de brotes de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de BAP.

Además se observó que los tratamientos con 1.0 mgL^{-1} de GA_3 generaron mayor número de brotes, esto para los dos subcultivos. Estos resultados se pueden visualizar de mejor manera en la figura 3.25.

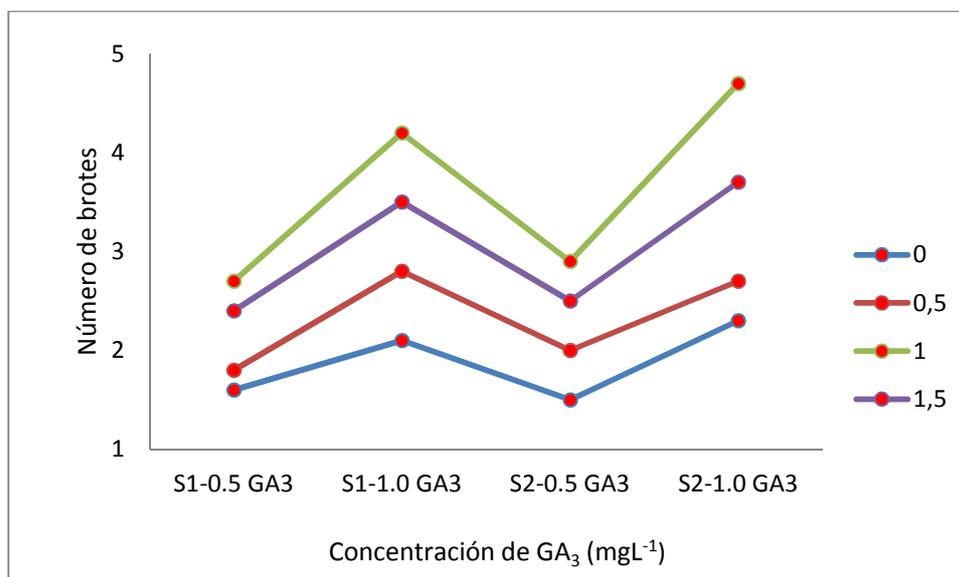


Tabla 3.30: Número de brotes de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de GA_3 .

3.3.2.2 Análisis inferencial de datos

El análisis de varianza al 5% para la variable número de brotes, se determinó un valor ($p < 0.0001$) para los factores: concentración de 6 – Bencil Amino Purina (BAP), dosis de giberelina GA_3 , y para la interacción de dichos factores, lo que muestra que existe alta significancia estadística; entretanto para los factor subcultivo, existe significancia estadista con un valor $p = 0.0046$. Por lo tanto se rechaza H_0 , demostrando que estos factores influyen de forma significativa en la variable número de brotes. Mientras que para las demás interacciones, no se encontró significancia estadística ($p > 0.05$). El promedio general del coeficiente de variación fue de 16.05%, valor aceptable para esta investigación, y se obtuvo un promedio general de 9.12 días a la brotación (tabla 3.31).

Tabla 3.31: Análisis de varianza al 5% para la variable número de brotes, en la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	173.78	15	11.59	18.91	<0.0001
Concentración BAP	64.88	3	21.63	112.01	<0.0001
Dosis GA ₃	42.03	1	42.03	217.68	<0.0001
Subcultivo	1.60	1	1.60	8.29	0.0046
Concentración BAP *Dosis GA ₃	7.68	3	2.56	13.25	<0.0001
Subcultivo *Concentración. BAP	0.50	1	0.17	0.86	0.4618
Subcultivo *Dosis GA ₃	0.00	3	0.00	0.00	>0.9999
Subc.*Conc. BAP*Dosis GA ₃	0.50	3	0.17	0.86	0.4618
Error	27.80	144	0.19		
Total	144.98	159			

Al realizar la prueba de Duncan al 5 % en función de la concentración de BAP (tabla 3.32), se observa que existen cuatro subconjuntos (A, B, C y D) debido a que los tratamientos presentan diferencias en sus medias, ver tabla 3.45. Ubicándose en el primer rango con el mayor número de brotes la concentración de 1.0 mgL⁻¹ BAP, con una media de 3.63 brotes/explante. Un menor número de brotes se consiguió con la concentración 0.0 mgL⁻¹ BAP, con una media de 1.98 brotes/explante.

Tabla 3.32: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de BAP en la variable número de brotes, durante la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

Concentración BAP	Medias	n	E.E	Grupo
1.0	3.63	40	0.07	A
1.5	3.03	40	0.07	B
0.5	2.33	40	0.07	C
0.0	1.98	40	0.07	D

El test de Duncan al 5% para el factor dosis de GA₃ (tabla 3.28) mostró dos rangos (A y B), obteniéndose el mayor número de brotes la concentración de 1.0 mgL⁻¹ GA₃ y (tabla 3.33).

Tabla 3.33: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de GA₃ en la variable número de brotes, durante la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

Dosis de GA ₃	Medias	n	E.E	Grupo
1.0	3.25	80	0.05	A
1.5	2.23	80	0.05	B

La prueba de Duncan al 5% para el factor subcultivo, revelo dos rangos para obteniéndose un mayor número de días a la brotación en el segundo subcultivo con una media de 2.84 brotes/ explante; mientras que para el primer subcultivo se obtuvo una media de 2.64 brotes/explante (tabla 3.34).

Tabla 3.34: Test de Duncan al 5% para el factor subcultivo en la variable número de brotes, durante la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

Subcultivo	Medias	n	E.E	Grupo
S2	2.84	80	0.05	A
S1	2.64	80	0.05	B

Para el factor interacción concentración de BAP – dosis de GA₃, mediante la prueba de Duncan al 5%, se obtuvo cinco rangos, hallándose la mejor respuesta vegetativa con la dosis de 1.0 mgL⁻¹ BAP y 1.0 mgL⁻¹ GA₃ (tratamiento 7), con una media de 4.45 brotes/explante; mientras que la menor respuesta vegetativa con el menor número de brotes fue con la dosis de 0.0 mgL⁻¹ BAP y 0.5 mgL⁻¹ GA₃ (tratamiento 1), con una media de 1.75 brotes/explantes, ver tabla 3.35.

Tabla 3.35: Test de Duncan al 5% para el factor concentración de BAP – concentración de GA₃, en la variable número de brotes de guaba (*Inga insignis*).

Concentración BAP	Dosis de GA ₃	Medias	n	E.E	Grupo
1.0	1.0	4.45	20	0.17	A
1.5	1.0	3.60	20	0.17	B
1.0	0.5	2.80	20	0.17	C
0.5	1.0	2.75	20	0.17	C
1.5	0.5	2.45	20	0.17	D
0.0	1.0	2.20	20	0.17	D
0.5	0.5	1.90	20	0.17	E
0.0	0.5	1.75	20	0.17	E

Se determinó que la variable número de brotes no tiene una distribución normal ($p < 0.0001$), esto a través la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 3.36: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para los días a la brotación respecto los tratamientos de la fase de multiplicación empleados en la micropropagación de guaba.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P(UnilateralD)
Número de brotes	160	2.59	1.04	0.88	<0.0001

En la figura de cuantiles de número de brotes (anexo D.2.2) no sigue el supuesto de normalidad requerido en un diseño experimental paramétrico debido a que los residuos aparentan seguir una distribución normal.

3.3.3 Altura de brotes

En esta variable se midió la longitud en centímetros del brote desde su origen hasta la yema apical a los 28 días de incubación, en cada tratamiento, ver tabla 2.4.

3.3.3.1 Análisis exploratorio de datos

La tabla de contingencia (tabla 3.37) expuesta a continuación muestra la altura promedio de los brotes de guaba (*Inga insignis*), obtenidos de los tratamientos de multiplicación en función de la concentración de bencilaminopurina (BAP) y concentración de giberelina (GA₃), obteniéndose una longitud mayor de brotes en los tratamientos con concentración de 1.0 mgL⁻¹ BAP (tratamientos 3 y 7) en los dos subcultivos; mientras que con los demás tratamientos se observa una menor longitud.

Tabla 3.37: Tabla de contingencia de altura de brotes promedio en la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de BAP y dosis de GA₃.

Subcultivo	GA ₃ (mgL ⁻¹)	BAP (mgL ⁻¹)			
		0.0	0.5	1.0	1.5
1	0.5	2.42	2.45	2.88	2.83
	1.0	2.76	2.79	3.93	3.84
2	0.5	2.51	2.53	3.07	3.02
	1.0	3.25	3.25	4.07	3.97

Se puede observar que a medida que la concentración de incrementa BAP aumenta la longitud de los brotes, hasta llegar a la concentración más alta en la cual disminuye levemente, este comportamiento se aprecia tanto en el primer subcultivo como en el segundo. La mayor longitud se obtuvo con la dosis de 1.0 mgL⁻¹ BAP, ver figura 3.11.

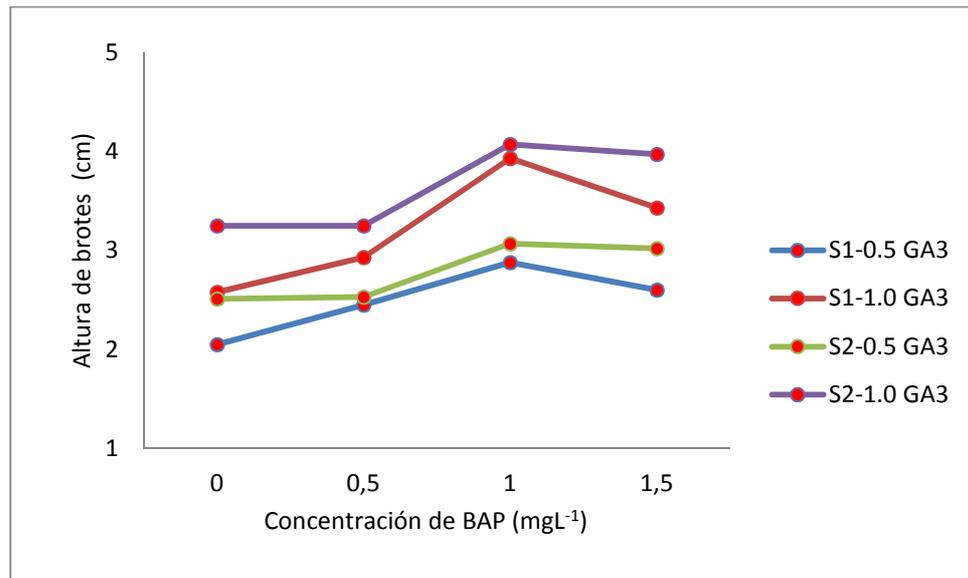


Figura 3.11: Altura de brotes de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de BAP.

Conjuntamente se realizó la gráfica 3.12, en la que se puede observar que los tratamientos con 1.0 mgL⁻¹ de GA₃ generaron mayor longitud de brotes, esto para los dos subcultivos.

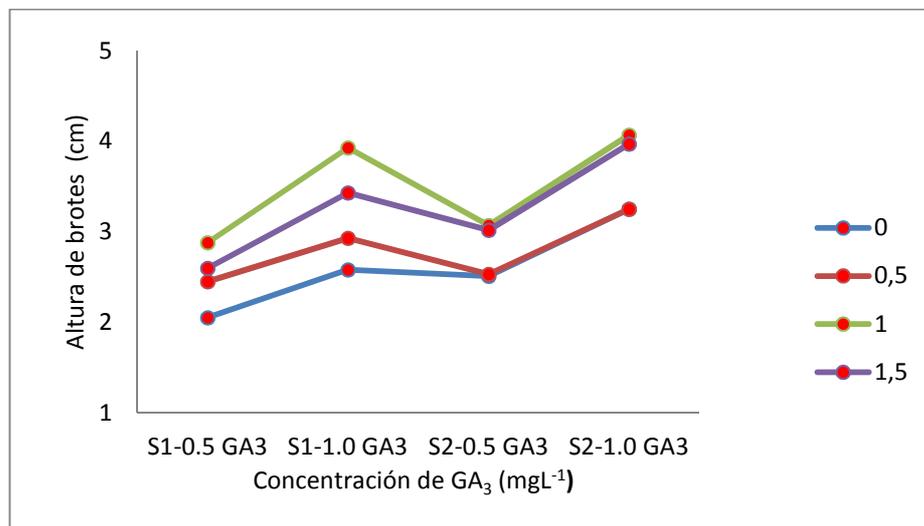


Figura 3.12: Altura de brotes de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de GA₃.

3.3.3.2 Análisis inferencial de datos

El análisis de varianza al 5% de significancia para la variable altura del brote, reportó alta significancia estadística con un valor ($p < 0.0001$) en los factores concentración de BAP, dosis de GA₃, subcultivo e interacción concentración de BAP - dosis de GA₃. Por lo tanto se rechaza H_0 , demostrando que estos factores influyen de forma significativa en la variable altura de brotes. Se obtuvo un coeficiente de variación de 8.78%, valor aceptable para esta investigación (tabla 3.38).

Tabla 3.38: Análisis de varianza al 5% para la variable altura del brotes, en la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	48.91	15	3.26	44.07	<0.0001
Concentración BAP	20.19	3	6.73	90.96	<0.0001
Dosis GA ₃	23.63	1	23.63	319.36	<0.0001
Subcultivo	1.95	1	1.95	26.37	<0.0001
Conc.BAP *Dosis GA ₃	2.21	3	0.74	9.94	<0.0001
Subcultivo*Conc. BAP	0.14	3	0.05	0.64	0.5927
Subc. *Dosis GA ₃	0.27	1	0.27	3.69	0.0567
Subcultivo*Conc. BAP *Dosis GA ₃	0.52	3	0.17	2.34	0.0759
Error	10.66	144	0.19		
Total	59.57	159			

Se realizó el test de Duncan al 5 % para el factor concentración de BAP (tabla 3.39) en el que mostró dos rangos ubicándose en el primer lugar con la mayor altura las concentraciones de 1.0 y 1.5 mgL⁻¹ BAP, con una media de 3.49 y 3.42 centímetros respectivamente; mientras que en segundo lugar

la concentración de 0.5 y 0.0 mgL⁻¹ BAP, con una media de 2.75 y 2.74 centímetros.

Tabla 3.39: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de BAP en la variable altura del brote, durante la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

Concentración BAP (mgL ⁻¹)	Medias	n	E.E	Grupo
1.0	3.49	40	0.04	A
1.5	3.42	40	0.04	A
0.5	2.75	40	0.04	B
0.0	2.74	40	0.04	B

Para el factor dosis de GA₃ (tabla 3.40), mediante el mismo análisis se observa que la dosis de 1.0 mgL⁻¹ de GA₃ obtuvo mayor altura con una media 3.48 centímetros.

Tabla 3.40: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de GA₃ en la variable altura del brote, durante la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

Dosis de GA ₃	Medias	n	E.E	Grupo
1.0	3.48	80	0.03	A
0.5	2.71	80	0.03	B

La prueba de Duncan al 5% para el factor subcultivo (tabla 3.41), revelo dos rangos para obteniéndose un menor longitud de los brotes en el segundo subcultivo con una media de 3.21 centímetros; mientras que para el primer subcultivo se obtuvo una media de 2.99 centímetros.

Tabla 3.41: Test de Duncan al 5% para el factor subcultivo, en la variable tiempo a la brotación, durante la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

Subcultivo	Medias	n	E.E	Grupo
S2	3.21	80	0.03	A
S1	2.99	80	0.03	B

Se realizó el test de Duncan al 5% para el factor interacción concentración de 6 – Bencil Amino Purina (BAP) x dosis de GA₃ (tabla 3.42), en el cual se observa tres rangos, en el primer lugar se encuentra la concentración de 1.0 mgL⁻¹ BAP y 1.5 mgL⁻¹ BAP con 1.0 mgL⁻¹ GA₃, tratamiento 7 (tabla 2.7), con la cual se consigue la mayor respuesta con una media de 4.0 y 3.90 cm de altura del brote respectivamente; mientras que en último lugar con la concentración de 0.0 y 0.5 mgL⁻¹ BAP + 0.5 mgL⁻¹ GA₃ (tratamientos 1 y 2), se obtuvo la menor respuesta, con una media 2.49 y 4.47 centímetros de altura del brote respectivamente.

Tabla 3.42: Test de Duncan al 5% para el interacción concentración de BAP y dosis de GA₃ en la variable número de brotes, durante la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*).

Concentración BAP	Dosis de GA ₃	Medias	n	E.E	Grupo
1.0	1.0	4.00	20	0.06	A
1.5	1.0	3.90	20	0.06	A
0.5	1.0	3.02	20	0.06	B
0.0	1.0	3.01	20	0.06	B
1.0	0.5	2.98	20	0.06	B
1.5	0.5	2.93	20	0.06	B
0.5	0.5	2.49	20	0.06	C
0.0	0.5	2.47	20	0.06	C

Se determinó que la variable altura de brotes no posee una distribución normal ($p < 0.0001$), esto a través la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 3.43: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para altura de brotes respecto los tratamientos de la fase de multiplicación empleados en la micropropagación de guaba.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P(UnilateralD)
altura de brotes	160	9.18	1.48	0.93	<0.0001

En la figura de cuantiles de altura de brotes (anexo D.3.2) no sigue el supuesto de normalidad requerido en un diseño experimental paramétrico debido a que los residuos aparentan seguir una distribución normal.

3.4 Etapa IV: enraizamiento

Los brotes obtenidos en la fase de multiplicación fueron empleados para esta última etapa, con el propósito de obtener plantas completas, es decir, con un adecuado sistema radicular capaz de sobrevivir a las condiciones *ex vitro*. Para lo cual se evaluó; el tiempo al enraizamiento, longitud de la plántula, longitud de la raíz y número de raíces al final de un periodo de 42 días.

3.4.1 Tiempo al enraizamiento

Es el tiempo expresado en días, en el que se inició la rizogénesis, evaluado en cada tratamiento, ver tabla 2.5.

3.4.1.1 Análisis exploratorio de datos

La tabla de contingencia del promedio del tiempo al enraizamiento (tabla 3.44), indica que la dosis de 1.0 mgL^{-1} de Ácido Indol Butírico (IBA) (tratamiento 3), es con la concentración más adecuada para el enraizamiento de plántulas de guaba (*Inga insignis*), debido a que presentó el menor número de días para el apareamiento de raíces, sin embargo las concentraciones de 0.5 y 1.5 mgL^{-1} (tratamientos 2 y 4) también registraron un tiempo apropiado para el enraizamiento; mientras que el tratamiento control mostró el mayor tiempo al enraizamiento.

Tabla 3.44: Tabla de contingencia del promedio del tiempo al enraizamiento de las plantas de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de IBA.

Concentración de IBA (mgL^{-1})			
0.0	0.5	1.0	1.5
40.70	24.10	20.10	22.50

La figura 3.13 indica la interacción entre las medias del número de días al enraizamiento con respecto a la dosis de IBA, evidenciando que existe influencia de la auxina en la variable tiempo al enraizamiento, se puede observar que a medida que la dosis aumenta disminuye considerablemente el tiempo que tardan las plántulas en iniciar la rizogénesis.

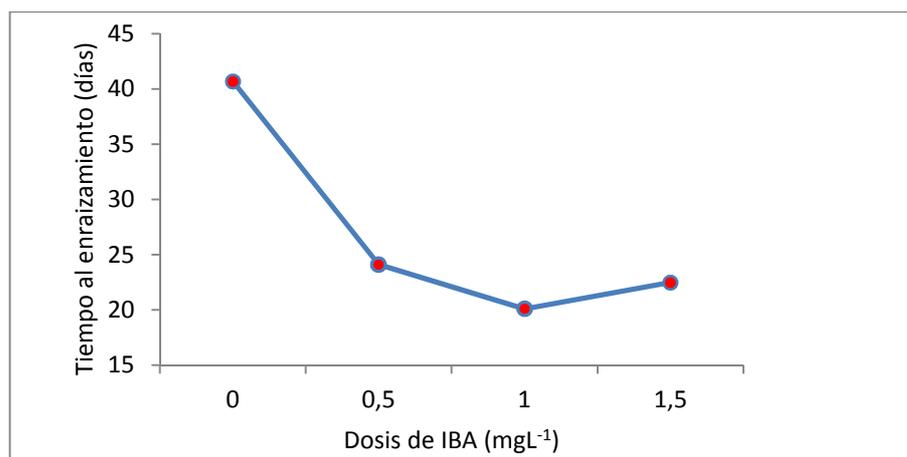


Figura 3.13: Gráfica de interacción de dosis de IBA para la variable tiempo al enraizamiento, durante la fase de enraizamiento de la guaba (*Inga insignis*).

3.4.1.2 Análisis inferencial de datos

El análisis de varianza (ANOVA) al 5% mostró alta significancia estadística ($p < 0.0001$), para el factor concentración de Ácido Indol Butírico (IBA). El promedio global fue de 26.85 días al enraizamiento y el coeficiente de variación fue 6.34%, lo que indica que las condiciones de trabajo fueron homogéneas (tabla 3.45).

Tabla 3.45: Análisis de varianza para la variable tiempo al enraizamiento, durante la fase de enraizamiento de guaba (*Inga insignis*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2638.70	3	879.57	303.30	<0.0001
Conc. IBA	2638.70	3	879.57	303.30	<0.0001
Error	104.40	36	2.90		
Total	2743.10	39			

El test de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA (tabla 3.46) detectó cuatro rangos de significación. En el primer rango se ubicó obteniendo la mejor respuesta vegetativa, la concentración de 1.0 mgL⁻¹ IBA, con una media de 20.10 días; en segundo rango la dosis de 1.5 mgL⁻¹ IBA y tercer rango la dosis de 0.5 mgL⁻¹ IBA con una media de 22.50 y 24.10 días al enraizamiento respectivamente; mientras que, con la menor respuesta, en el tercer rango se ubicó la dosis de 0.0 mgL⁻¹ IBA, con una media de 40.70 días.

Tabla 3.46: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA en la variable tiempo al enraizamiento, durante la fase de enraizamiento de guaba (*Inga insignis*).

Concentración IBA	Medias	n	E.E	Grupo
1.0	20.10	10	0.54	A
1.5	22.50	10	0.54	B
0.5	24.10	10	0.54	C
0.0	40.70	10	0.4	D

Se determinó que la variable altura de brotes no posee una distribución normal ($p < 0.0001$), esto a través la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 3.47: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para tiempo al enraizamiento respecto los tratamientos de la fase de enraizamiento empleados en la micropropagación de guaba.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P(UnilateralD)
Tiempo al enraizamiento	40	31.10	9.44	0.81	<0.0001

En la figura de cuantiles de altura de brotes (anexo E.1.2) no sigue el supuesto de normalidad requerido en un diseño experimental paramétrico debido a que los residuos aparentan seguir una distribución normal.

3.4.2 Longitud de la plántula

En esta variable se consideró la altura de la plántula expresada en centímetros a los 45 días después de la siembra, para cada tratamiento descrito en la tabla 2.5.

3.4.2.1 Análisis exploratorio de datos

Se determinó la longitud de la plántula en centímetros y se realizó la tabla de contingencia del promedio de la longitud de la planta al final de la incubación (tabla 3.48), se observa que las medias para las diferentes dosis de IBA no exhiben una diferencia notable en cuanto a la longitud de la plántula, sin embargo se evidencia que las mejores dosis para esta fase es la concentración de 1.0 y 1.5 mgL⁻¹ IBA (tratamientos 3 y 4); mientras que con la concentración de 0.5 mgL⁻¹ IBA y el tratamiento control es ligeramente inferior (tratamientos 1 y 2).

Tabla 3.48: Tabla de contingencia del promedio de la longitud de las plantas de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de IBA.

Dosis de IBA (mgL ⁻¹)			
0.0	0.5	1.0	1.5
3.22	3.75	4.39	4.27

En la figura 3.14 muestra la interacción entre las medias de longitud de la plántula (cm) con respecto a la dosis de IBA, obteniéndose una respuesta parecida con la dosis de 1.0 y 1.5 mgL⁻¹ IBA una mayor longitud de la plántula con el tratamiento 3 (1.0 mgL⁻¹ IBA) (tabla 2.4).

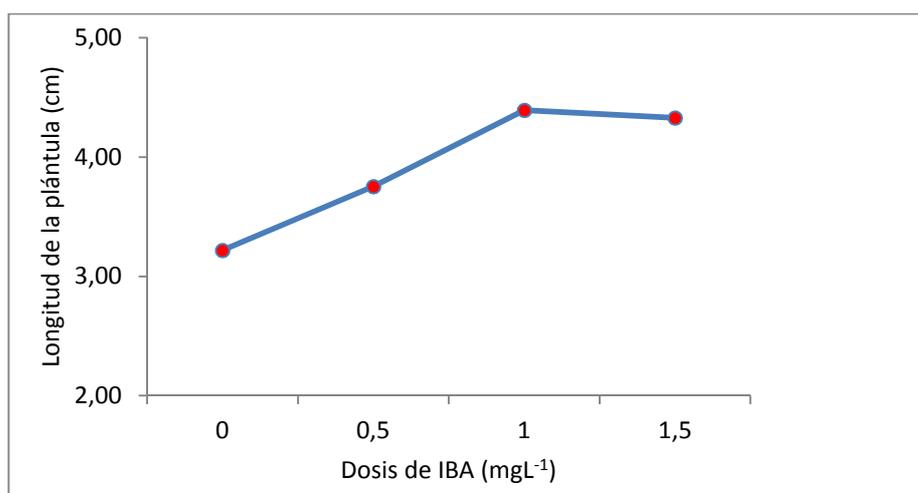


Figura 3.14: Longitud de la plántula para los diferentes tratamientos de enraizamiento utilizados, para la micropropagación de guaba (*Inga insignis*).

3.4.2.2 Análisis inferencial

Se efectuó el análisis de varianza (ANOVA) para esta variable (tabla 3.49), la cual reveló que existe alta significancia estadística ($p < 0.0001$) para el factor dosis de Ácido Indol Butírico (IBA), se alcanzó como promedio general 3.92 centímetros y un coeficiente de variación de 11.09%, lo que indicó que las condiciones de trabajo fueron homogéneas.

Tabla 3.49: Análisis de varianza para la variable longitud de la plántula, durante la fase de enraizamiento *in vitro* para la micropropagación de guaba (*Inga insignis*).

F.V.	p-valor
Modelo	<0.0001
Concentración IBA	<0.0001
Error	
Total	

El test de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA mostró tres rangos de significación. En el primer rango se ubicaron obteniendo la mayor longitud, la dosis de 1.0 y 1.5 mgL⁻¹ IBA, con una media de 4.39 y 4.33 centímetros respectivamente, el último rango se obtuvo con la dosis de 0.0 mgL⁻¹ IBA con una media de 3.22 centímetros (tabla 3.50).

Tabla 3.50: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA, para la variable longitud de la plántula, durante la fase de enraizamiento de guaba (*Inga insignis*).

Concentración IBA	Medias	n	E.E	Grupo
1.0	4.39	10	0.14	A
1.5	4.33	10	0.14	A
0.5	3.75	10	0.14	B
0.0	3.22	10	0.14	C

Se determinó que la variable longitud de la plántula no posee una distribución normal ($p < 0.0001$), esto a través la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 3.51: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para longitud de la plántula respecto los tratamientos de la fase de enraizamiento empleados en la micropropagación de guaba.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P(UnilateralD)
Longitud de la plántula	40	3.92	0.64	0.	0.0460

En la figura de cuantiles de longitud de la plántula (anexo E.2.2) no sigue el supuesto de normalidad requerido en un diseño experimental paramétrico debido a que los residuos aparentan seguir una distribución normal.

3.4.3 Longitud de la raíz promedio

En esta variable se consideró el tamaño de la raíz, para lo cual se midió todas las raíces obteniendo un promedio de las raíces por plántula, longitud de las raíces se expresó en centímetros, medidas a los 42 días a partir de la siembra, para cada uno de los tratamientos descritos en la tabla 2.5.

3.4.3.1 Análisis exploratorio de datos

La tabla de contingencia (tabla 3.52), se muestra la longitud promedio de las raíces de las plántulas de guaba (*Inga insignis*) sugiere que la dosis de 1.0 mgL⁻¹ IBA (tratamiento 3), es la que presenta mayor longitud de la raíz, con un promedio de 5.11 centímetros; mientras que los demás tratamientos presentaron una menor longitud.

Tabla 3.52: Tabla de contingencia de la altura promedio de las plántulas de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de IBA.

Dosis de IBA (mgL ⁻¹)			
0.0	0.5	1.0	1.5
1.35	3.02	5.11	4.05

Los resultados de la longitud de la raíz, para los diferentes tratamientos empleados en esta fase, se pueden observar en la figura 3.15, la cual muestra la interacción entre los promedios de longitud de la plántula expresada en centímetros con respecto a la dosis de 1.0 mgL⁻¹ IBA (tratamiento 3), obteniéndose una mayor longitud de la plántula a medida que incrementa la concentración de IBA, sin embargo al llegar a la concentración de 1.5 mgL⁻¹ IBA se observa un decrecimiento.

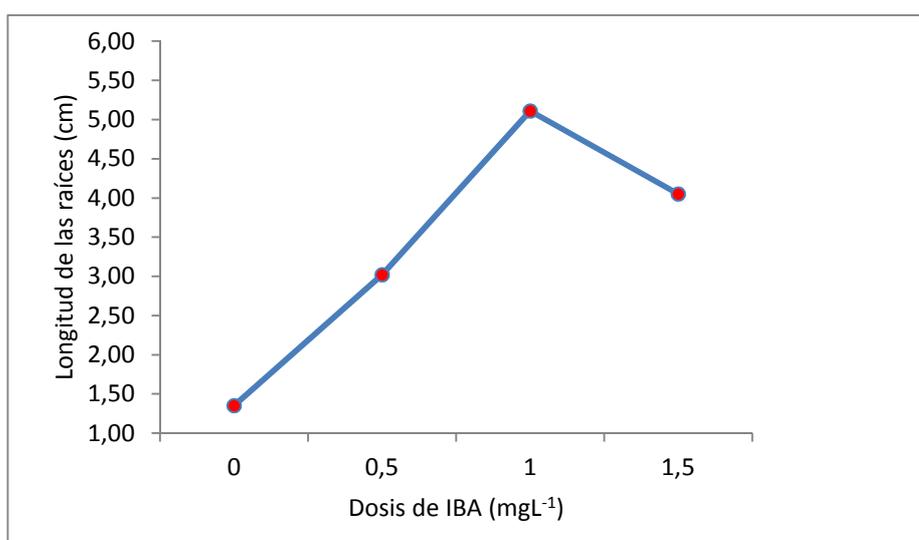


Figura 3.15: Longitud de la raíz para los diferentes tratamientos de enraizamiento utilizados de guaba (*Inga insignis*).

3.4.3.2 Análisis inferencial de datos

Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) para la variable longitud de la raíz y se halló alta significancia estadística con un valor ($p < 0.0001$) para el factor dosis de IBA, por lo que se puede afirmar que los tratamientos no son estadísticamente iguales. El promedio global fue de 2.58 centímetros, con un coeficiente de variación de 13.03% (tabla 3.53).

Tabla 3.53: Análisis de la varianza para la variable longitud de la raíz, durante la fase de enraizamiento de guaba (*Inga insignis*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	76.73	3	25.58	131.63	<0.0001
Concentración IBA	76.73	3	25.58	131.63	<0.0001
Error	6.99	36	0.19		
Total	83.72	39			

La prueba de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA detectó cuatro rangos de significación. En primer rango con una media de 5.11 centímetros se ubicó la dosis de 1.0 mgL⁻¹ IBA (tratamiento 3), seguida de la dosis de 1.5 mgL⁻¹ IBA (tratamiento 4), con una media de 4.05 centímetros, en tercer rango la dosis de 0.5 mgL⁻¹ IBA (tratamiento 5), con una media de 3.02 centímetros; mientras que el último rango la dosis de 0.0 mgL⁻¹ IBA, con una media de 1.35 centímetros (tabla 3.54).

Tabla 3.54: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA, para la variable longitud de la raíz, durante la fase de enraizamiento de guaba (*Inga insignis*).

Concentración IBA	Medias	n	E.E	Grupo
1.0	5.11	10	0.14	A
1.5	4.05	10	0.14	B
0.5	3.02	10	0.14	C
0.0	1.35	10	0.14	D

Se determinó que la variable longitud de la raíz no posee una distribución normal ($p < 0.0001$), esto a través la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 3.55: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para longitud de las raíces promedio respecto los tratamientos de la fase de enraizamiento empleados en la micropropagación de guaba.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P(UnilateralD)
Longitud de la raíz promedio	40	3.38	1.47	0.91	<0.0001

En la figura de cuantiles de altura de brotes (anexo E.3.2) no sigue el supuesto de normalidad requerido en un diseño experimental paramétrico debido a que los residuos aparentan seguir una distribución normal.

3.4.4 Número de raíces

Se contabilizo el número raíces por cada plántula, para cada tratamiento descrito en la tabla 2.5.

3.4.4.1 Análisis exploratorio de datos

La tabla de contingencia (tabla 3.56) mostrada a continuación señala el número de raíces promedio de plántulas de guaba (*Inga insignis*), obtenidos a partir de los tratamientos de enraizamiento en función de la concentración de Ácido Indol Butírico (IBA). El mayor número de raíces se da en los tratamientos con concentración de 1.5 y 1.0 1.5 mgL⁻¹ (tratamientos 3 y 4), presentando un número de 4.30 y 4.20 raíces/plantula; mientras que en el tratamiento con menor concentración presentaron menor número de raíces al igual que el tratamiento control.

Tabla 3.56: Tabla de contingencia del número de raíces promedio de plántulas de guaba (*Inga insignis*), respecto a la concentración de IBA.

Dosis de IBA (mgL ⁻¹)			
0.0	0.5	1.0	1.5
1.30	2.10	4.30	4.20

En la figura 3.16 se observa un efecto de la auxina en el número de raíces, pues a partir del tratamiento control aumenta directamente proporcional la concentración de IBA y el número de raíces, obteniéndose la máxima respuesta vegetativa con las concentración de 1.0 y 1.5 mgL⁻¹ (tratamiento 3 y 4).

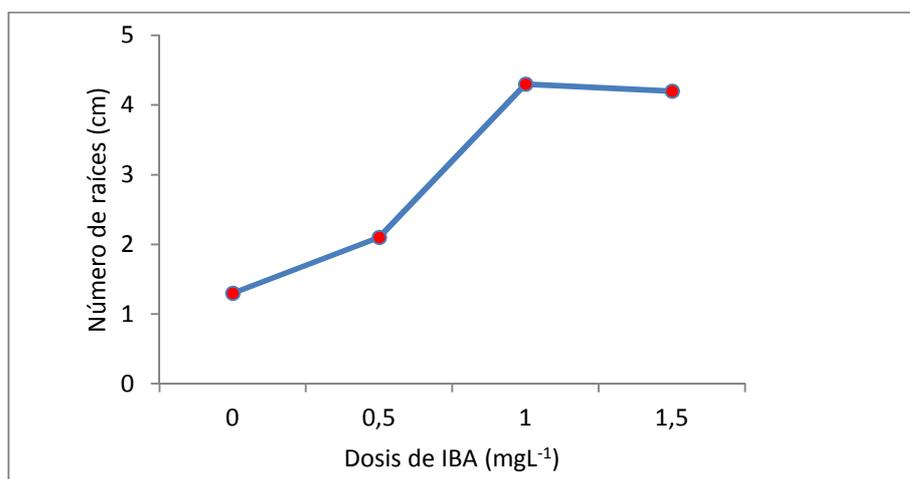


Figura 3.16: Número de raíces para los diferentes tratamientos de enraizamiento utilizados, para la micropropagación de guaba (*Inga insignis*).

3.4.4.2 Análisis inferencial de datos

Finalmente el análisis de varianza (ANOVA) de la cuarta variable investigada durante esta etapa, número de raíces, se presenta en la tabla 3.57 en la cual se observa que existe significancia estadística entre los diferentes dosis de IBA ($p < 0.0001$), el promedio global fue de 2.98 raíces/plántula, con un coeficiente de variación de 16.52%.

Tabla 3.57: Análisis de la varianza para la variable número de raíces, durante la fase de enraizamiento de guaba (*Inga insignis*).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	68.27	3	22.76	94.17	<0.0001
Concentración IBA	68.27	3	22.76	94.17	<0.0001
Error	8.71	36	0.14		
Total	76.98	39			

El test de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA generó tres rangos de significación, en el cual se obtuvo la mayor respuesta con la dosis de 1.5 y 1.0 mgL⁻¹ IBA (tratamiento 3 y 4), con una media 4.30 y 4.20 raíces/plántula respectivamente; mientras que la menor respuesta se obtuvo con la dosis de 0.0 mgL⁻¹ IBA (tratamiento 1), con una media de 1.30 raíces/plántula (tabla 3.58).

Tabla 3.58: Test de Duncan al 5% para el factor dosis de IBA, para la variable número de raíces, durante la fase de enraizamiento de guaba (*Inga insignis*).

Concentración IBA	Medias	n	E.E	Grupo
1.0	4.30	10	0.16	A
1.5	4.20	10	0.16	A
0.5	2.10	10	0.16	B
0.0	1.30	10	0.16	C

Se determinó que la variable número de raíces no posee una distribución normal ($p < 0.0001$), esto a través la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 3.59: Prueba de Shapiro-Wilks (modificado) para número de raíces respecto los tratamientos de la fase de enraizamiento empleados en la micropropagación de guaba.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P(UnilateralD)
Número de raíces	40	2.58	1.30	0.80	0.0097

En la figura de cuantiles de número de raíces (anexo E.4.2) no sigue el supuesto de normalidad requerido en un diseño experimental paramétrico debido a que los residuos aparentan seguir una distribución normal.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Al no existir antecedentes del uso de técnicas de cultivo *in vitro* de esta especie nativa bajo amenaza (*Inga insignis*), se pretende que este trabajo puede ser un precedente en el país en el estudio *in vitro* de este género.

4.1 Etapa I: desinfección

Durante la etapa de establecimiento, y de acuerdo a los resultados obtenidos, el punto condicional en la supervivencia y viabilidad de los explantes es el tratamiento de asepsia aplicado. Por lo cual, se afirma la trascendencia de la condición de asepsia en la técnica de cultivo de tejidos, debido a que un determinado protocolo no siempre es el más adecuado, ya que dependerá de la especie en estudio (Uribe, Delaveau, Garcés, & Escobar, 2008).

4.1.1 Contaminación

Es importante comenzar el cultivo *in vitro* en una estado de total asepsia, lo cual involucra ejecutar tratamientos para eliminar microorganismos de la superficie del explante. Además el lugar de trabajo y los materiales deben cumplir con esta condición (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

En la desinfección de segmentos nodales, comúnmente se emplea como método estándar la utilización de soluciones de detergente, etanol e hipoclorito de sodio, esto ha sido el método más empleado con gran éxito para el establecimiento *in vitro* de la mayoría de especies leñosas (Yasodha, Sumanthi, & Gurumurthi, 2004).

Sin embargo mediante ensayos previos de desinfección se constató que la principal fuente de contaminación fue producida por hongos, por lo cual se empleó parte de la metodología de desinfección descrita por Goyal y

colaboradores (2012), en la que se utilizó una solución antifúngica, con lo cual se logró disminuir la contaminación.

Por otra parte, el hipoclorito de sodio es uno de los agentes esterilizantes más empleado en los trabajos de cultivo *in vitro* (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997), en el presente trabajo mediante el análisis exploratorio de datos se observa que a medida que el tiempo y la concentración de hipoclorito de sodio aumentan, disminuye el porcentaje de contaminación (figura 3.1), siendo el tratamiento con hipoclorito de sodio al 1.5% v/v con un tiempo de inmersión de 15 minutos muy efectivo para la desinfección superficial de explantes, ya que se obtuvo mayor porcentaje de descontaminación (90%) (anexo B.1), a pesar que estadísticamente mediante el análisis de chi – cuadrado $p=0.4037$ se encontró que el porcentaje de contaminación no depende de la concentración de hipoclorito de sodio ni del tiempo de inmersión (tabla 3.2).

No obstante, mediante la prueba de varianza no paramétrica Kruskal-Wallis (tabla 3.4), se encontró que los tratamientos evaluados difieren significativamente ($p<0.0001$), mediante la regresión logística se determinó que el mejor tratamiento de desinfección de yemas de guaba (*Inga insignis*), es con la concentración de 1.5% v/v de hipoclorito de sodio durante un tiempo de exposición de 15 minutos, debido a que muestran la mayor probabilidad de presentar descontaminación, similares resultados fueron obtenidos por Lozano (2011), en el estudio de propagación *in vitro* de guarango *Caesalpinia spinosa*, especie forestal perteneciente a la familia Fabaceae, en el cual el tratamiento de desinfección más eficiente fue aquél que utilizó hipoclorito de sodio al 1.5% v/v y un tiempo de inmersión de 15 minutos, logrando un porcentaje de establecimiento de 67%, mientras que Patiño (2011), en la misma especie obtuvo el 100% de descontaminación al utilizar concentraciones de hipoclorito de sodio al 3.5% y 1.5% v/v por 2 minutos, alcanzando un porcentaje de supervivencia de 44%.

Los resultados obtenidos difieren a los obtenidos por Ortiz, Gonzáles, & Koch (2007), en *Acacia melanoxylon*, en el cual emplearon cloro al 0.5% v/v por 10 minutos y obtuvieron 83.9% descontaminación.

4.1.2 Viabilidad

La desinfección de los explantes antes del cultivo *in vitro* es esencial para eliminar los contaminantes superficiales, por lo cual la desinfección de la superficie vegetal debe ser eficiente para eliminar los contaminantes, causando daño mínimo a las células vegetales (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

El efecto fitotóxico que produce el hipoclorito de sodio sobre los tejidos vegetales, también es un factor limitante en el cultivo de tejidos *in vitro*. En diversas especies se ha reportado que el empleo de dosis elevadas de agentes desinfectantes elimina los microorganismos (bacterias y hongos) causantes de la contaminación, pero a su vez origina la muerte de los explantes. Por lo cual la elección del tratamiento desinfectante, de igual forma debe basarse de acuerdo al tratamiento que menor daño cause a los tejidos (Rebolledo, Aparicio, & Cruz, 2006).

El empleo de enjuagues al explante, con agua destilada estéril, posterior al proceso de desinfección es fundamental para eliminar efectivamente el agente desinfectante, del mismo modo para remover los fenoles oxidados y otros productos del daño celular establecidos en la preparación y desinfección del explante. En algunos casos se utiliza la inmersión y agitación de los explantes en agua destilada estéril, sola o con algún aditivo, durante un tiempo determinado antes de su cultivo definitivo (Gautheret, 1999).

Sin embargo, mediante las pruebas estadísticas a través de la prueba de chi-cuadrado (tabla 3.8), no se halló relación de dependencia entre la viabilidad frente a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión; así como mediante la prueba de Kruskal-Wallis (tabla 3.10), no

se mostró diferencia significativa entre los tratamientos para esta variable, y mediante la prueba de regresión logística (tabla 3.9) también se halló que ninguna variable independiente (cloro, tiempo) influyen en la viabilidad, además en el análisis exploratorio se observó que todos los tratamientos presentaron alto porcentaje de viabilidad (anexo B.2).

Por lo cual, se sugiere que los porcentajes de necrosis obtenidos en esta investigación son producidos por el proceso de desinfección, como lo señala Azofeifa (2009), en el cual menciona que al ser eliminados los tejidos que ha sido afectado durante el proceso mediante cortes, puede causar que muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, aunque se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta a estrés bióticos o abióticos).

Por otra parte, puede existir influencia del medio de cultivo empleado (MS), Vila, Rey, & Mroginski (2009), al trabajar con el árbol leguminoso *Gleditsia triacanthos*, durante la fase de establecimiento emplearon diferentes disoluciones del medio de cultivo MS (MS/2; MS/4 y MS/8) y sin disolución, observaron que en medio de cultivo MS sin disolución fue el que obtuvo menor necrosamiento de tejidos.

4.2 Etapa I: establecimiento - inducción de brotes

Por lo general, se necesitan 3-6 semanas para completar esta etapa y para generar explantes que están listos para ser trasladados a la Fase II. Algunas plantas leñosas pueden tardar hasta 12 meses para completar la fase I establecimiento del cultivo aséptico (Abdelnour & Escalant, 1994).

Gautheret (1999), hace hincapié en que la condición fisiológica de la planta donante tiene gran influencia sobre la respuesta *in vitro*, posiblemente como resultado de su interacción con la disponibilidad de nutrientes, niveles

endógenos de fitoreguladores y los principales aminoácidos libres, cuyas proporciones y cantidades difieren en las distintas épocas del año.

4.2.1 Tiempo a la brotación

El ANOVA efectuado durante esta etapa (tabla 3.13) muestra que existió dependencia estadística ($p < 0.0001$) para los factores medios de cultivo, dosis de BAP, y para la interacción de estos dos factores.

La prueba de Duncan para el factor medio de cultivo (tabla 3.14) mostro que existió diferencia estadística significativa, obteniéndose en el medio de cultivo MS, un menor número de días los primeros brotes de guaba (*Inga insignis*) con una media de 9.65 días a la brotación, mientras que MS/2 se obtuvo una media de 12.10 días a la brotación.

Estos resultados pueden ser producto de la composición del medio de cultivo, debido a que los medios empleados difieren en cuanto a la concentración de sales, hallándose una mejor respuesta vegetativa en el medio MS al 100 %, similares resultados se obtuvieron en otras especies de Fabaceae, en las que se evaluó en los mismos medios de cultivo empleados en esta investigación, en los cuales obtuvieron mejor respuesta vegetativa en el medio MS completo (Ayisire *et al.*, 2008; Lozano, 2011), lo cual se puede explicar porque el explante tiene una mayor concentración de nutrientes disponibles, siendo el medio Murashige y Skoog es el más utilizado en cultivo de tejidos vegetales, incluyendo especies forestales (Yasodha, Sumanthi, & Gurumurthi, 2004).

La concentración de BAP, a través de la prueba de Duncan (tabla 3.15) sugiere la existencia de diferencias estadísticas significativas entre las distintas concentraciones de BAP empleadas, evidenciando que a medida que se incrementa la concentración de BAP, disminuye los días del apareamiento del primer brote, esto hasta llegar a la concentración 2.0 mgL^{-1} BAP, siendo en la que menor tiempo a la brotación se obtuvo con una media de 8.0 días a la brotación, mientras que a concentración de 3.0 mgL^{-1}

BAP aumenta el tiempo, resultados similares obtuvo en *Erythrina variegat* (Shahina & Wetten, 1999).

La prueba de Duncan para la interacción medio de cultivo – concentración de BAP, indica que existieron cambios significativos entre los días a la brotación (tabla 3.15), demostrando que la acción del medio de cultivo MS y la acción hormonal tienen un papel primordial en el desarrollo *in vitro* de esta especie, tanto en su interacción como de manera separada, obteniéndose una mejor respuesta vegetativa al emplear medio de cultivo MS suplementado con 2.0 mgL^{-1} BAP, similares resultados se obtuvo en esta fase en la propagación *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* (Lozano, 2011).

4.2.2 Número de brotes

En la fase de establecimiento de un explante *in vitro* se pretende conseguir la máxima brotación de los explantes (Pierik, 1997); el ANOVA (tabla 3.19), evidencia que existió diferencia estadística para los factores medios de cultivo, dosis de BAP.

Empleando la prueba de Duncan, se evidenció que se obtiene un mayor número de brotes utilizando el medio de cultivo MS con una media de 3.40 brotes/explante a diferencia del medio MS/2 con 2.75 brotes/explante (tabla 3.20). Este resultado sugiere que la disponibilidad de sales en el medio de cultivo logra la diferencia en el número de brotes, pues estos resultados son similares a los alcanzados por: Goyal y colaboradores (2012), en el que hallaron mayor número de brotes en el medio MS que el WP, difiriendo principalmente, dichos medios en la concentración de sales.

Así como, en el cultivo *in vitro* de *Dalbergia sissoo*, encontraron el mayor porcentaje de brotes en medio de cultivo MS frente al medio de cultivo B₅ (Joshi, Bisht, Sharma, & Uniyal, 2003).

Por otro lado, la función del BAP para la regeneración de brotes también se ha reportado anteriormente con éxito en muchos árboles leguminosos

(Islam & Wetten, 1999; Vengadesan G. , y otros, 2008; Li, Wu, Yang, & Xia, 2002; Joshi *et al.*, 2003; González, Orozco, Cruz, Chávez, & Vernon, 2007; (Goyal, Kachwaha, & Kothari, 2012).

La prueba de Duncan al 5% (tabla 3.21) en función de la concentración de BAP reveló el mayor número de brotes aplicando la concentración de 2.0 mgL⁻¹ BAP, con una media de 3.63 brotes/explante, sin embargo se observó que con una dosis mayor existió un menor número brotes, resultados similares se obtuvo en la propagación *in vitro* de árboles leguminosos; en *Albizia lebbbeck*, en la fase de inducción de brotes se observó que el número de brotes aumenta hasta llegar a 2.0 mgL⁻¹ BAP y disminuye al aumentar la concentración (Yadav & Singh, 2011), del mismo modo en su estudios de cultivo *in vitro* de *Pithecellobium dulce* (Shekhawat, 2012), observo un número menor de brotes con concentraciones superiores a 3.0 mgL⁻¹ de BAP, en esta fase. Mientras que Quraishi, Jadhav, & Gupta (2011) en el cultivo *in vitro* de *Cassia tora* reporto disminución del número de brotes a partir de la concentración de 0.5 mgL⁻¹ BAP.

Dodds & Roberts (2004) proponen que este comportamiento es debido a que los tejidos consiguen desarrollar las vías de biosíntesis de citoquinina de manera adecuada, asumiendo por lo tanto, que los explantes pueden tener inicialmente niveles de citoquininas endógena intermedios, y al aumentar la concentración de citoquinina resulta tóxica por lo cual disminuye el crecimiento celular.

4.3 Etapa III: multiplicación

El éxito en la fase de multiplicación depende de una adecuada selección del explante, medio de cultivo empleado, pero también en el descubrimiento de la correcta combinación de reguladores de crecimiento y la modulación de los niveles hormonales (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

Se seleccionó la concentración de ANA a 0.1 mgL⁻¹, debido a que en diversas especies de árboles leguminosos se ha empleado con gran éxito

esta concentración combinada con BAP (Sancak, 1999; Abedini *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2003; Agrawal & Sardar, 2006). Así como ha sido importante el efecto de este regulador de crecimiento es la micropropagación de Acacia (*Robinia pseudoacacia*) (Naser, Kaviani, Hashemabadi, & Zarchini, 2012).

Por otra parte, los antioxidantes como el ácido ascórbico, ácido cítrico, PVP y adsorbentes tales como carbón activado pueden ser añadidos a la medio de cultivo para evitar necrosis de los explantes. Entre los diversos antioxidantes utilizados en especies leñosas, el ácido ascórbico fue el más eficaz en la multiplicación de brotes axilares de *Acacia nilotica* (Singh *et al.*, 1996) citado por Vengadesan, Ganapathi, Amutha y Selvaraj (2002). El ácido cítrico y PVP fueron eficaces en el control de la necrosis en *Acacia farnesiana* y *Acacia schffneri* (Ortiz *et al.*, 2000), así como en *Cassia toria* (Quraishi, Jadhav, & Gupta, 2011). Mientras que en el presente estudio mediante ensayos previos se halló al carbón activado como la sustancia más adecuada para contrarrestar la oxidación durante esta fase.

4.3.1 Tiempo a la brotación

El análisis de varianza (ANOVA) realizado al 5% (tabla 3.25), indicó que la variación del tiempo a la brotación, en la fase de multiplicación de guaba (*Inga insignis*), solamente depende de la concentración de BAP.

Por lo cual la prueba de Duncan al 5% (tabla 3.26), identificó la influencia del BAP, en los días a la brotación ($p < 0.0001$), pues se obtuvo el menor número de días a la brotación 1.0 mgL⁻¹ BAP con una media de 7.58 días; mientras que la menor respuesta se obtuvo con la concentración 0.0 mgL⁻¹ BAP, con una media de 10.78 días a la brotación. Roca y Mroginski (1993) señalan, que las citoquinina son fundamentales dentro del proceso del cultivo *in vitro*, debido a que promueve la emisión de brotes, asumiendo así también los días a la formación de los mismos, debido a la división y crecimiento celular acelerado, incrementando la producción de yemas y brotes.

Sin embargo en la figura 3.9 se evidencio que a partir de la concentración de 1.0 mgL^{-1} de BAP el número de días a la brotación disminuye, de acuerdo a Abdelnour y Escalant (1994), quienes indican que las citoquininas inducen la formación y brotación de yemas adventicias y el desarrollo de yemas axilares, pero los requerimientos exógenos de hormonas dependen de los niveles endógenos de la planta, por lo cual al utilizar una concentración mayor de BAP, resulta un efecto inhibitorio, efecto que también se ha apreciado en *Acacia chundra* (Rout, Senapati, & Aparajeta, 2008).

El factor dosis de GA_3 e interacción concentración de BAP – dosis de GA_3 no tuvo ningún efecto estimulante sobre el apareamiento de los primeros brotes, similares observaciones se registró por Vengadesan y colaboradores (2008) en *Acacia sinuata*, esto podría deberse a que la principal función de las giberelinas es intervenir en los procesos de elongación de los entrenudos (Pierik, 1997).

Por otra parte, en la propagación *in vitro* de *Acacia mangium*, reporto que para el apareamiento de los primero brotes, si existió influencia de la concentración de GA_3 y BAP, suplementado al medio de cultivo MS, en la misma dosis empleada en esta investigación (1.0 mgL^{-1}) (Nanda, Das, & Rout, 2004).

4.3.2 Número de brotes

El análisis de varianza al 5% para la variable número de brotes (tabla 3.31), determinó que para los factores: concentración de BAP, dosis de GA_3 , interacción entre concentración de BAP – dosis de GA_3 , subcultivo, existió significancia estadística ($p < 0.0001$) por lo cual estos factores influyeron el número de brotes.

Al realizar la prueba de Duncan al 5 % en función de la concentración de BAP (tabla 3.32) exhibe que número de brotes producidos fue significativamente afectada por las diferentes concentración de BAP

utilizado, el mayor número promedio de brotes (3.63) se obtuvo al suplementar el medio de cultivo con 1.0 mgL^{-1} BAP.

Se observó, que el incremento en la concentración de BAP, aumentó el número de brotes producidos, alcanzando un número máximo de brotes a 1.0 mgL^{-1} de BAP pero a una mayor concentración BAP redujo el número de brotes (figura 3.24). La disminución del número de brotes de acuerdo a Borchetia, Das, Handique, & Das (2009), podría ser debido a que un aumento en la concentración de BAP produjo inhibición en la formación de meristemos adventicios.

Este resultado es similar a las investigaciones realizadas por Arumugam & Panneerselvam (2012) en la micropropagación del árbol leguminoso *Clitoria ternatea*, Ortiz, Gonzáles, & Koch (2007) en *Acacia melanoxylon*, Joshi y colaboradores (2003), en *Dalbergia sissoo*, Indravathi & Pullaiah (2012) en *Albizia amara* en el que se alcanzó el máximo número de brotes en la fase de multiplicación aplicando la concentración de 1.0 mgL^{-1} de BAP.

Pierik (1997), señala que los requerimientos de citoquininas en cuanto a tipo y concentración, son extremadamente variables y dependen básicamente del contenido endógeno de cada especie, por lo que una cantidad superior puede generar inhibición en el desarrollo de los tejidos y efectos adversos, así como lo mencionan Jones & Smith (1986) citado por Ortiz y colaboradores (2007) que al emplear una concentración elevada de BAP, puede producir una rápida formación de brotes *in vitro*, pero a su vez se puede producir clorosis y caída de hojas con una pérdida importante de explantes.

Para el factor dosis de GA_3 , mediante el test de Duncan al 5% (tabla 3.33) mostró dos rangos (A y B), obteniéndose el mayor número de brotes la concentración de 1.0 mgL^{-1} GA_3 , mientras que para el factor interacción concentración de BAP – concentración de GA_3 , mediante la prueba de Duncan al 5% (tabla 3.29), se obtuvo cinco rangos, hallándose la mejor respuesta vegetativa con la dosis de 1.0 mgL^{-1} BAP y 1.0 mgL^{-1} GA_3 , con

una media de 4.45 brotes por explante, estos resultados coinciden con los realizados por Nanda y colaboradores (2004), en el estudio de propagación *in vitro* de *Acacia mangium*, en el cual obtuvo el mayor número cuando empleo dosis de 1.0 mgL^{-1} de BAP combinando con GA_3 (1.0 mgL^{-1}).

La prueba de Duncan al 5% para el factor subcultivo (tabla 3.34), revelo dos rangos obteniéndose un mayor número de brotes en el segundo subcultivo con una media de 2.84 brotes/explante; mientras que para el primer subcultivo se obtuvo una media de 2.64 brotes/explante. De acuerdo a Pierik (1997), este comportamiento se debe a que el explante, en el transcurso de los subcultivo presenta tejido cada vez más joven que le permite absorber de mejor manera los nutrientes.

4.3.3 Altura de los brotes

El análisis de varianza al 5% de significancia para la variable altura del brote (tabla 3.38), reportó alta significancia estadística con un valor ($p < 0.0001$) en los factores concentración de BAP, dosis de GA_3 , subcultivo e interacción concentración de BAP - dosis de GA_3 .

Se realizó el test de Duncan al 5 % para el factor concentración de BAP (tabla 3.39) en el que mostró dos rangos ubicándose en el primer lugar con la mayor altura las concentraciones de 1.0 y 1.5 mgL^{-1} BAP, con una media de 3.49 y 3.42 centímetros respectivamente; mientras que en segundo lugar la concentración de 0.5 y 0.0 mgL^{-1} BAP, con una media de 2.75 y 2.74 centímetros. Aunque en el estudio de micropropagación de *Albizia amara* (Indravathi & Pullaiah, 2012), no se empleó giberelinas, también se obtuvo la máxima altura (2.5 cm) cuando el medio de cultivo se suplemento con 1.0 mL^{-1} de BAP.

Para el factor dosis de GA_3 (tabla 3.40), mediante el mismo análisis se observa que la dosis de 1.0 mgL^{-1} de GA_3 obtuvo mayor altura con una media 3.48 centímetros. Según Talón (1993), la suplementación exógena de giberelina produce una amplia variedad de respuestas en el desarrollo, de

las cuales la más importante probablemente para esta fase es la inducción del crecimiento del tallo, siendo el efecto fisiológico más significativo de este regulador (Pierik, 1997).

Por lo tanto, una de las razones de aplicar exógenamente GA₃ fue esencialmente producir la elongación de los entrenudos. Al respecto, se encontró que los resultados obtenidos se pueden relacionar con investigaciones similares hechas en *Acacia magnium* por Nanda y colaboradores (2004) quien concluye que existió influencia de GA₃ con una dosis de 1.0 mgL⁻¹, la cual permitió el alargamiento de brotes adventicios sin producir deformación foliar. De modo contrario en las investigaciones realizadas por Quorin, da Silva, Martins, Oliveira (2001) en *Acacia mearnsii* en la fase de multiplicación no hallaron influencia del GA₃ (0.5 y 1.0 mgL⁻¹) en la elongación de los brotes.

Se realizó el test de Duncan al 5% para el factor interacción concentración de 6 – Bencil Amino Purina (BAP) x dosis de GA₃ (tabla 3.41), en el cual se observa tres rangos, en el primer lugar se encuentra la concentración de 1.0 mgL⁻¹ BAP y 1.5 mgL⁻¹ BAP con 1.0 mgL⁻¹ GA₃, con la cual se consigue la mayor respuesta con una media de 4.0 y 3.90 centímetros de altura del brote respectivamente; mientras que en último lugar con la concentración de 0.0 y 0.5 mgL⁻¹ BAP + 0.5 mgL⁻¹ GA₃, se obtuvo la menor respuesta, con una media 2.49 y 4.47 centímetros de altura del brote respectivamente.

Para a interacción concentración de BAP – dosis de GA₃, la prueba de Duncan al 5% (tabla 3.42) mostro tres rangos, obteniéndose la mejor respuesta con la dosis de 1.0 mgL⁻¹ BAP combinado con 1.0 mgL⁻¹ GA₃, con una media de 4.0 centímetros. Aunque 1.5 mgL⁻¹ BAP en combinación con 1.0 mgL⁻¹ de GA₃ también dio como resultado una buena altura (3.90 cm).

De acuerdo a Srejavic & Neskovic (1985) citado por Calderón (2004) en su estudio sobre la influencia del ácido giberélico en el cultivo de tejidos, proponen que puede ser necesario el alargamiento de brotes, debido a que

si los brotes son muy pequeños, al transferirlos al medio de enraizamiento estos se necrosan rápidamente.

Sin embargo, Das & Mitra, (1990) han mencionado que es posible alargar los entrenudos de brotes antes del enraizamiento en medios con ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP), si se adicionan tanto ácido giberélico (GA_3) como carbono activado, o si éstos se aplican aisladamente, así como emplear una concentración más alta de calcio contribuyen al crecimiento celular. El ácido giberélico estimula el crecimiento al incrementar la extensibilidad de la pared celular (Pierik, 1997).

Tales observaciones coinciden con las de Riffaud y Cornu, (1981), en la que mencionan que el ácido giberélico no es el único inductor de alargamiento que se puede aplicar en leñosas. Sin embargo Mitta, Agarwal, & S, 1989 citado por Gruta (2002) con *Acacia auriculiformis* obtuvieron mejores resultados con la aplicación de concentración de GA_3 .

La prueba de Duncan al 5% para el factor subcultivo (tabla 3.42), revelo dos rangos para obteniéndose un menor longitud de los brotes en el segundo subcultivo con una media de 3.21 centímetros; mientras que para el primer subcultivo se obtuvo una media de 2.99 centímetros.

En el género *Acacia*, los subcultivos a intervalos constantes (25 a 30 días), mostraron mejores resultados, pues se obtuvo mayor crecimiento y número de brotes (Vengadesan A. , Ganapathi, Amutha, & Selvaraj, 2002). La transferencia de los brotes a un medio cultivos a fresco después se encontró 3 semanas puede ser esencial para evitar defoliación, así como el deterioro del medio de cultivo y un mantener un adecuado sostén de los brote en crecimiento (Shekhawat, Rathore, Singh, Doera, & Rao, 1997).

4.4 Etapa IV: enraizamiento

Para cualquier protocolo de micropropagación, una enraizamiento éxito de los brotes es un requisito fundamental para facilitar su establecimiento en suelo (Klopfenstein, Chun, Kim, & Ahuja, 1997).

En el presente estudio mediante ensayos previos de esta fase se constató la necesidad de emplear carbón activado, aunque los efectos promotores del carbón activado en la morfogénesis son principalmente la adsorción irreversible de compuestos inhibidores en el medio de cultivo, así como disminución sustancialmente de metabolitos tóxicos y exudados fenólicos, evitando así la acumulación de exudados (Murkute & Shantipatil, 2003), también es muy utilizado para el enraizamiento (Monteuuis & Bon, 2000), debido a tiene una influencia positiva notable en la eficiencia de enraizamiento, generando un entorno favorable para el inicio de la rizogénesis al propiciar un ambiente libre de luz necesario para la activación del sistema radicular (Singh, Singh, & Saxena, 1993).

Por lo cual, se añadió al medio de cultivo 1.0 gL^{-1} carbón activado, concentración que se observó más favorable entre 0.5 y 1.0 gL^{-1} , como lo mencionan Goyal y colaboradores (2012).

Por otra parte, en la etapa de enraizamiento de plantas leñosas pertenecientes a la familia Fabaceae se ha empleado con gran éxito el medio de cultivo MS/2 en diversas especies de árboles de la familia Fabaceae: *Acacia tortilis* (Aziz, Omari, & Kafawin., 2002), *Dalbergia sissoo* (Joshi, Bisht, Sharma, & Uniyal, 2003), *Caesalpinia bonduc* (Meena, Kochappan, Cheruvathur, Britto, & Thuruthiyil, 2010), en el cultivo *in vitro* de *Pithecellobium dulce* (Goyal, Kachwaha, & Kothari, 2012), y en *Albizia amara* (Indravathi & Pullaiah, 2012).

Cabe recalcar que cuando se ha suplementado el medio de cultivo en la fase de multiplicación con GA_3 , puede producirse inhibición del enraizamiento. Esto podría estar relacionado con una inhibición parcial de la

síntesis de almidón endógena en los plástidos, obstaculizando el desarrollo de primordios de raíz a través de una inhibición de la actividad mitótica en el iniciador primordios radicales (Srejovic & Neskovic, 1985). Sin embargo este comportamiento adverso no se presentó en este estudio y se obtuvo una adecuada fase de enraizamiento.

4.4.1 Tiempo de enraizamiento

En plantas leñosas la etapa de enraizamiento puede resultar lento y difícil en comparación con las plantas herbáceas (Yasodha, Sumanthi, & Gurumurthi, 2004). Sin embargo, en el presente estudio se obtuvo las primeras raíces de guaba (*Inga insignis*) en un tiempo adecuado.

Mediante el ANOVA al 5%, para esta variable (tabla 3.45), se halló que existe influencia de la concentración de IBA en el apareamiento de las primeras raíces, y a través del test de Duncan al 5% para este factor (tabla 3.46), se detectó cuatro rangos de significación. Obteniéndose la mejor respuesta vegetativa, con la concentración de 1.0 mgL⁻¹ IBA, con una media de 20.10 días, estos resultados son similares a los realizados por Joshi y colaboradores (2003) en la fase de enraizamiento de *Daliberia sisso*, en el que obtuvieron el periodo más corto de inicio de la rizogénesis (18 días) con la adición de 1.0 mgL⁻¹ IBA.

Además se puede observar que al aumentar la concentración de IBA, se produjo un aumento en el número de días en que apareció la primera raíz, obteniéndose a concentración de 1.5 mgL⁻¹ IBA 22.5 días al enraizamiento, este comportamiento también se observó en *Daliberia sisso* (Joshi, Bisht, Sharma, & Uniyal, 2003).

Estos resultados difieren a los obtenidos en *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* y *A. nilotica* (Aziz, Omari, & Kafawin, 2002) en *Cassia angustifolia* (Agrawal & Sardar, 2006), *Acacia ehrenbergiana* (Javed, Khan, & Aref, 2013) se halló la mejor respuesta con una concentración de 4.0, 2.5 y 1.5 mL⁻¹ de IBA respectivamente.

4.4.2 Longitud de la plántula

Roca & Mroginski, (1993), señalan que las auxinas también intervienen en los procesos de elongación de las células *in vitro* y división celular para la formación brotes, así como también se ha observado en *Caesalpinia bonduc* (Santosh & Krishna, 2012). Por lo cual en la variable longitud de la plántula, el ANOVA (tabla 3.49), revelo que influencia del IBA en el tamaño de las plántulas.

Además el test de Duncan al 5% mostró tres rangos de significación, evidenciando que a medida que incrementa la concentración de IBA, aumenta el tamaño de las plántulas, se obtuvo la mayor longitud con las dosis de 1.0 y 1.5 mgL⁻¹ IBA, con una media de 4.39 y 4.33 días respectivamente, el ultimo rango se obtuvo con la dosis de 0.0 mgL⁻¹ IBA con una media de 3.81 centímetros (tabla 3.50).

4.4.3 Longitud de la raíz promedio

Hartmann y Kester (2002) reportan que IBA alienta a las plantas para producir raíces más grandes, por lo cual en el ANOVA se halló que la dosis de IBA presentaron influencia en el tamaño de las raíces (tabla 3.53).

La prueba de Duncan al 5% (tabla 3.54) detectó cuatro rangos de significación, obteniéndose la mayor longitud de raíz con la concentración de 1.0 mgL⁻¹ IBA, con una media de 5.11 centímetros. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en *Daliberia sisso* (Joshi, Bisht, Sharma, & Uniyal, 2003) y *Parapiptadenia rigida* (Kielser, Franco, Paranhos, Franco, & Santos, 2009), en los cuales la mayor longitud de raíz promedio (2.5 y 4.5 cm respectivamente), se consiguen con la dosis de 1.0 mgL⁻¹ IBA.

Sin embargo, los mejores resultados de la presente investigación difieren con los alcanzados por Shekhawat, (2012) en *Pithecellobium dulce*, en el cual la concentración de 2.5 mgL⁻¹ de IBA, consigue el mayor tamaño promedio de raíz (2.2 cm), en *Caesalpinia bonduc* la dosis de 4.0 mgL⁻¹

IBA, obtuvo el tamaño más grande de raíz promedio con 3.1 cm (Meena, Kochappan, Cheruvathur, Britto, & Thuruthiyil, 2010), así como en *Prosopis chilensis*, la concentración de 3.0 mgL⁻¹ de IBA es la que obtuvo mayor longitud de la raíz (6.5 cm) (Caro, Polci, Lindstrom, Echenique, & Hernandez, 2002).

De igual modo, que en estas investigaciones, en el enraizamiento de guaba (*Inga insignis*), se observó (figura 3.15) que al aumentar la concentración de IBA se produjo una reducción en el tamaño de las raíces.

Salisbury y Ross (2000) aseveran que las auxinas u otra fitohormona son fisiológicamente funcionales, al añadirse *in vitro* en pequeñas cantidades, mientras que una alta concentración de estas sustancias ejerce un efecto negativo sobre los tejidos, causando toxicidad y por ende inhibición en su desarrollo.

4.4.4 Número de raíces

El fitoregulador IBA es la auxina más utilizada para la formación de raíces a partir de brotes de árboles leñosos (Nandwani y Ramawat 1991 ; Krieken *et al.*, 1993; citado por Goyal *et al.*, 2012).

Por lo cual, el ANOVA de esta variable investigada, indicó que existió influencia significativa de la dosis de IBA, para el número de raíces (tabla 3.57), y mediante el test de Duncan al 5% para este factor (tabla 3.58) generó tres rangos de significación, en el cual se obtuvo la mayor respuesta con la dosis de 1.5 y 1.0 mgL⁻¹ IBA, con una media 4.30 y 4.20 raíces/plántula respectivamente.

Estos datos resultados son similares a los alcanzados por Joshi y colaboradores (2003) en *Daliberia sisso*, en el cual el número máximo de raíces promedio fue 4.47, en la dosis de 1.0 mgL⁻¹ IBA, Quraishi y colaboradores, (2011) también hallaron a esta concentración como la mejor produciendo un número máximo de raíces promedio (3.5 raíces por plántula)

en la especie *Cassia toria*, de igual forma Ortiz y colaboradores (2007) en *Acacia melanoxylon* alcanzaron el mayor número de raíces con las dosis de 1.5 y 1.0 mgL⁻¹ con un número de raíces promedio por explante de 3.67 y 4.67.

Por otra parte, estos resultados difieren entre otras especies de este género debido a las diferentes respuestas *in vitro* de cada especie como en *Dalbergia sisso* (Meena, Kochappan, Cheruvathur, Britto, & Thuruthiyil, 2010) y *Pithecellobium dulce* (Goyal, Kachwaha, & Kothari, 2012), en el que se halló el máximo número de explantes promedio (4.3 y 3.4) con la dosis de 2.5 y 0.5 mgL⁻¹ IBA respectivamente.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- El tiempo de inmersión y la concentración de hipoclorito de sodio no influyeron en la desinfección ($p=0.4037$), no obstante los cocientes de probabilidades (O.R.) ($p<0.0001$), permitieron evidenciar que existe mayor posibilidad de descontaminación cuando la concentración de hipoclorito de sodio es aplicada a una concentración de 1.5% v/v durante un tiempo de inmersión de 15 minutos, por lo cual se apreció que este es el mejor tratamiento de desinfección para la micropropagación *in vitro* de yemas de *Inga insignis*, alcanzando un 90% de descontaminación.

- Mediante el análisis estadístico se evidenció que durante la presente investigación la viabilidad no tuvo influencia en la fase de desinfección ($p<0.8728$).

- El medio de cultivo más efectivo en la fase de establecimiento fue el MS ($p<0.0001$), suplementado con 2 mgL⁻¹ de BAP ($p<0.0001$), en el cual se obtuvo la mejor respuesta vegetativo con el menor tiempo para la formación de brotes de *Inga insignis* (media=7.87 días) y mayor cantidad de brotes (media=4.15 brotes por explante).

- En la fase de multiplicación existió influencia de BAP a dosis de 1 mgL⁻¹ combinado con 1 mgL⁻¹ de GA₃ ($p<0.0001$), mediante el cual se obtuvo el menor número de días para la formación de brotes de *Inga insignis* (media=7.80 días), así como mayor número (media=4.45 brotes por explante) y longitud de los brotes (media=4.00 centímetros).

- Se encontró que en la fase de enraizamiento la concentración de 1mgL⁻¹ de IBA tuvo influencia significativa ($p<0.0001$) en las variables tiempo al enraizamiento (media=20.10 días), longitud de la plántula (media=4.39 centímetros), longitud (media=5.11 centímetros) y número de raíz (media=4.20 raíces por plántula).

- Se acepta la hipótesis planteada al inicio de esta investigación que afirma que existe influencia del balance fitohormonal en las etapas de micropropagación *in vitro* de *Inga insignis*.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- La presente investigación obtuvo bajos porcentajes de contaminación, debido la planta donadora del material vegetal (planta juvenil, obtenida por semilla), por lo cual si emplea como planta donadora de material vegetal a una planta adulta se recomienda implementar pre tratamientos con fungicidas.
- En la etapa de desinfección aumentar las concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión sodio para reducir la contaminación.
- En la fase de multiplicación se recomienda suplementar al medio de cultivo sulfato de adenina para incrementar la tasa de multiplicación, la cual ha tenido gran éxito en otras especies leñosas pertenecientes a la familia Fabaceae.
- Evaluar diferentes concentraciones de ácido naftalen acético (ANA) en la fase de multiplicación.
- Ensayar la etapa de enraizamiento con diferentes concentraciones de carbón activado con la finalidad de obtener evidencia estadística de este factor.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A., & Escalant, J. (1994). *Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Catargo.
- Abedini, W., Boeri, B., Marinucci, I., Ruscitti, M., & Scelzo, L. (2000). Biotécnicas aplicadas a especies forestales Nativas. *Comisión de investigaciones científicas de la provincia de buenos aires*, 32-43.
- Agrawal, V., & Sardar, P. (2006). *In vitro* propagation of *Cassia angustifolia* through leaflet and cotyledon derived. *Biologia Plantarum*. Volume 50, Issue 1, 118-122.
- Altaf, H., Iqba, A., Qarshi, K., Hummer, N., & Ikram, U. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. En *Charper 1* (págs. 4-7). USA.
- Arumugam, R., & Panneerselvam, R. (2012). *In vitro* propagation and antibacterial activity of *Clitoria ternatea* Linn. *Department of Botany, Annamalai University, Annamalai Nagar, Tamil Nadu, India* , 870-875.
- Aziz, A., Omari, M., & K. O. (2002). Micropropagation of *Acacia tortilis* subsp. *Raddiana* and *a. Nilotica* under *in vitro* conditions. *Department of Agricultural Resources and Environment, Faculty of Agriculture, University of Jordan, Amman, Jordan*, 45-55.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidacion y oscurecimeinto de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomica mesoamericana*, 153-157.
- Barona, H. (2004). Algunos frutales potenciales en Panamá, su producción y Comercialización. *Instituto de Mercadeo Agropecuario*, 50-62.
- Borchetia, S., Das, P., Handique, J., & Das, S. (2009). High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia spp.*). *Scientia Horticulturae*, vol. 120, no. 4, 544-550.
- Brent, H., & McCown, J. (2000). Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: Dealing with genetic predeterminism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* , 149-154.

- Bressani, R. (2010). *Valoración química nutricional de la harina de semilla de diferentes especies de Inga sp. Estudios preliminares para su incorporación en la dieta de la población rural. Universidad del valle de Guatemala*. Guatemala: Universidad del Valle Guatemala, Tesis pregrado.
- Calderón, X. (2004). Influencia del calcio y ácido giberélico en el alargamiento de brotes adventicios *in vitro* de *Eucalyptus globulus*. *Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca, Casilla, Talca, Chile*, 747-751.
- Caro, L., Polci, P., Lindstrom, L., Echenique, C., & Hernandez, F. (2002). Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from Young and mature plants. *Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, San Andrés –Argentina*, 25- 33.
- Cruz, M., García, Y., Sánchez, C., Alvarado, Y., Acosta, M., Leiva, M., & Freire, M. (2007). Identificación y control de *Bacillus* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. *Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de las Villas Cuba*, 09-13.
- da Silva, F., & Rodríguez, W. (2010). Género *Inga* Mill (Leguminosae Mimosoidae en el estado de Paraná Brasil. 354-368.
- de la Torre, A. (2008). *Enciclopedia de plantas útiles*. Quito: herbario.
- Dias, J., Domingos, J., Barbedo, J., & Fratin, P. (2013). Viability of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. Embryos according to the maturation stage, fungal incidence, chemical treatment and storage. *Journal of Seed Science, Brasil*. v. 35, n.1, 70-76.
- Dodds, J., & Roberts, L. (2004). *Experiments in Plant Tissue Culture*. New York.
- Estrella, J., Manosalvas, R., Mariaca, J., & Rivadeneira, M. (2005). Biodiversidad y recursos genéticos, una guía para su uso y acceso en el Ecuador. *Departamento Nacional de Recursos Filogenéticos. Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, 21-22.

- Flor, E. (2013). Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de algarrobo tropical (*Prosopis pallida*). Universidad Central del Ecuador. *Tesis pregrado*, 88-91.
- Fonturbel, F. (2001). Los vitropatógenos: consideraciones generales, detección y eliminación. *Revista Biología*, 55-61.
- Francis, J. (2001). Registro de árboles campeones de Puerto Rico. Instituto Internacional de Dasonomía Tropical. *Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio Forestal, Río Piedras. Puerto Rico*, 55-61.
- Gauchat, M; Rodriguez, G; Belaver, E; Bischoff, D. (2003). Híbridos de alta productividad combinando crecimiento y forma. 168.
- Gautheret, R. (1999). Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro*. En *Cap III* (págs. 108–127). Ediciones Mundi – Prensa.
- George, E. (1996). Plant propagation by tissue culture. *Exegetics Limited England*, 361.
- González, B., Orozco, J., Cruz, F., Chávez, V., & Vernon, J. (2007). Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. and Bonpl. Ex willd. MC Johnston). I. via cotyledonary nodes. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, .260- 262.
- Goyal, P., Kachwaha, S., & Kothari, S. (2012). *Micropropagation of Pithecellobium dulce (Roxb.)Benth—a multipurpose leguminous tree and assessmentof genetic fidelity of micropropagated plantsusing molecular markers Srivastava Foundation for Science and Society. India.*
- Hartmann, H., & Kester, D. (2002). *Propagación dee Plantas, principios y prácticas.* California.
- Hernández. (2007). Jardines botánicos y bancos de germoplasma: La conservación ex situ frente a las perspectivas de una estrategia para la conservación de las plantas. *Universidad de Córdoba*, 42-43.
- Hugo, B., & McCown, H. (2000). *In vitro* plant recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: Dealing with genetic predeterminism. . *In Vitro Cellular & Developmental Biology* , 34.

- Indravathi, G., & Pullaiah, T. (2012). *In vitro* propagation studies of *Albizia amara* (Roxb.). *Department of Biotechnology, Sri Krishnadevaraya University, Anantapur, India*, 505-513.
- Iridonio, A. (2001). Conservación de geermoplasma de especies raras y amenazadas. *Departamento biología vegetal - agrícola*, 6-26.
- Islam, S., & Wetten, A. (1999). *In vitro* Regeneration of *Erythrina variegata*, a Multipurpose Fast-growing Tree in Bangladesh. *Department of Agricultural Botany, Reading University, Reading, U. K*, 113-120.
- Javed, S., Khan, P., & Aref, I. (2013). *In vitro* regeneration and multiplication for mass propagation of *Acacia ehrenbergiana*. *Hayne: a potential reclaimment of denude arid lands. Agroforestry Systems. Volume 87, Issue 3*, 621-629.
- Jones, C., & Smith, M. (1986). Getting Slarted in Micropropagation of Tasmanian Blackwood (*Acacia melanoxylon*). *Combined Proceedings of the International Plant Propagators' Society, Volume 36*, 477-481.
- Joshi, I., Bisht, K., Sharma, V., & Uniyal, P. (2003). Studies on effect of nutrient media for clonal propagation of superior phenotypes of *dalbergia sissoo roxb*. Through tissue culture. *Division of genetics and tree propagation, forest research institute, India*, 143-147.
- Kielser, P., Franco, E., Paranhos, J., Franco, T., & Santos, A. (2009). Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. *Ciência Rural, Santa Maria, v.39, n.4 . Brasil*, 1098-1104.
- Klopfenstein, N., Chun, Y., Kim, M., & Ahuja, M. (1997). *Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of Populus*. USA: Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experimental Station.
- Kosiol, M., Rios, M., Borgtoft, P., & Granda, G. (2007). *Useful Plants of Ecuador Applications, Challenges, and Perspectives*. Quito: Herbario, Universidad de Aarhus, Dinamarca Herbario, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

- Li, Z., Wu, H., Yang, W., & Xia, D. (2002). A Study on the Tissue Culture of Tara (*Caesalpinia spinosa* Kuntze). *The Research Institute of Resource Insects.*, 474- 478.
- Lozano, Z. (2011). Establecimiento de un protocolo para la Propagación in vitro de guarango *Caesalpinia spinosa* (molina) kuntze, a partir de plántulas como herramienta para la preservación de esta especie. *Sangolquí – Ecuador. Tesis pregrado*, 87-92.
- Meena, U., Kochappan, L., Cheruvathur, J., Britto, J., & Thuruthiyil, D. (2010). Callus induction and shoot regeneration from epicotyl explants of ethnomedicinally important *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *The Rapinat Herbarium and Centre for Molecular Systematics and Taxonomy*, 263- 269.
- Mitta, I. A., Agarwal, R., & S, G. (1989). *In vitro* development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis* – a leguminous tree. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 19, 65-70.
- Monteuuis, O., & Bon, M. (2000). Influence of auxin and darkness on *in vitro* rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 63-67.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.* *Physiologia Plantarum*, Copenhagen.
- Murkute, A., & Shantipatil, M. (2003). Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural science . Digest* 23, 29-31.
- Nanda, R., Das, P., & Rout, G. (2004). *In vitro* clonal propagation of *Acacia mangium* Willd. and its evaluation of genetic stability through RAPD marker. *Plant Biotechnology Division, Plant Tissue Culture Laboratory, Regional Plant Resource Centre, Bhubaneswar, Orissa – India*, 203-212.
- Naser, N., Kaviani, B., Hashemabadi, D., & Zarchini, M. (2012). Effect of Naphthalene Acetic Acid (NAA) on Micropropagation of *Acacia*(*Robinia pseudoacacia* L.) . *Department of Horticulture, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran*, 381-386.

- Orozco, A., Prado, Y., & Ramírez, S. (2013). Manejo de frutos y semillas de las especies forestales *Inga densiflora* Benth. e *Inga edullis* Mart. Asociados a paisajes caferes del departamento del Quindío. *Revista de Investigaciones - Universidad del Quindío*, 280 - 292.
- Ortiz, O., Gonzáles, M., & Koch, L. (2007). Micropropagación de árboles superiores de *Acacia melanoxylon*. *Instituto Forestal Chile*, 146-153.
- Patiño, M. (2011). Evaluación de métodos de desinfección y medios de cultivo para la multiplicación de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *Escuela Politécnica de Chimborazo. Riobamba Ecuador. Tesis pregrado*, 78-81.
- Pennington, T. (1996). *The genus Inga Botany*. USA: Royal Botanic Gardens Kew.
- Pennington, T., & Revelo, N. (1997). *El género Inga en el Ecuador. Morfología, Distribución y Usos*. Reino Unido: The Royal Botanic Gardens Kew.
- Pierik, R. (1997). *In vitro culture of Higher Plants*. Netherlands: Kluwet Academic Publishers.
- Quitiguiña, V., Oña, P., & Vargas, O. (2008). *Plantas útiles de Otonga y los bosques nublados noroccidentales del Ecuador*. Quito.
- Quorin, O., da Silva, M., Martins, L., & Oliveira, A. (2001). Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. *Issue 3, Volume 66*, 199-205.
- Quraishi, A., Jadhav, S., & Gupta, S. (2011). *In vitro* Clonal Propagation of *Cassia toria*. *A medicinal Plant India*, 108-115.
- Rebolledo, V., Aparicio, A., & Cruz, H. (2006). Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Foresta Veracruzana vol 8*, 27-32.
- Reid, W., & Miller, K. (1989). Scientific basic for conservation of Biodiversity. *World Resources Institute, University of Washington*, 16-22.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT.

- Rojas, S., García, J., & Alarcón, M. (2004). *Propagación asexual de plantas. Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas*.
Obtenido de Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA:
<http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Archivos/Publicaciones/Propagaciónasexualdeplantas.pdf>
- Rosales, M. (1997). Efectos asociativos del valor nutricional in vitro de mezclas de forrajes arbóreos para rumiantes. Memorias V Seminario-Taller Internacional de Palmas en Sistemas de Producción Agropecuaria para el Trópico. *Seminario - Taller Internacional de Palmas en Sistemas de Producción Agropecuaria para el Trópico* (págs. 146-148). Cali: Fundación CIPAV.
- Rout, G., Senapati, S., & Aparajeta, S. (2008). Micropropagation of *Acacia chundra* (Roxb.) DC. *Plant Biotechnology Division, Regional Plant Resource Centre, Orissa, India*, 234-242.
- Salisbury, F., & Ross, C. (2000). *Fisiología de las Plantas: Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. Madrid: Jose Manuel Alonso.
- Sancak. (1999). *In vitro* Micropropagation of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *University of Ankara, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, Ankara-Turkey*, 133-136.
- Santosh, S., & Krishna, V. V. (2012). Direct and indirect method of plant regeneration from root explants of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. A threatened medical plant of Western Ghats. *Department of Studies and Research in Biotechnology and Bioinformatics, Kuvempu Universtiy Shankaranghatta, India*, 45-52.
- Shahina, I., & Wetten, A. (1999). *In vitro* Regeneration of *Erythrina variegata*, a Multipurpose Fast-growing Tree in Bangladesh. *Department of Agricultural Botany, Reading University, Reading, U. K. Plant Tissue Cult.* 9, 97-105.
- Shekhawat, M. (2012). Multiplication of *Pithecellobium dulce* benth. - an important ethno-medicinal plant. *Department of Plant Biology and*

- Biotechnology, K.M. Centre for Post Graduate Studies Lawspet, Pondicherry . India, 605- 608.*
- Shekhawat, N., Rathore, T., Singh, R., Doera, S., & Rao, R. (1997). Factors affecting *in vitro* clonal propagation of *Prosopis cineraria*. *Plant Growth Regulation.*, 123-134.
- Singh, S., Singh, R., & Saxena, R. (1993). *In vitro* bud break in axillary nodal segments of mature trees of *Acacia nilotica*. *Indian J. Plant Physiol*, 36-41.
- Sousa, M. (2008). El género *Inga* (Leguminosae:Mimosoidae) Del Sur de Mexico y Centroamérica. Estudio Previo para la Flora Mesoamericana. *Missouri Botanical Garden Press*, 223 - 269.
- Srejovic, J., & Neskovic, M. (1985). *Efecct of Gibberellic Acid on Organogenesis in Tissue Culture.*
- Stein, V., Paiva, R., Pereira, F., & Nogueira, R. (2008). Organogênese direta em explantes caulinares de ingazeiro. *Departamento Biología, Universidad e Federal de Lavras, Brasil*, 128-132.
- Talón, M. (1993). Giberelinas. In Azcon-Bieto J, M Talon eds. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Madrid : McGraw-Hill/Interamericana.
- Tigrero, J. (2009). List anoada de hospederos de moscas de la fruta presentes de Ecuador. *Laboratorio de Entomología, Carrera de Ciencia Agropecuarias, Departamento de Ciencias de la Vida*, 107-116.
- Toquiza, J. (2007). *Colección y establecimeinto de una plantación piloto con germoplasma de guaba (Inga sp.) en el cantón San Miguel de Urcuquí - Imbabura, Ecuador*. Quito: Facultad de Ingeniería Agropecuaria.
- Uribe, M., Delaveau, C., Garcés, M., & Escobar, R. (2008). Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Departamento de Silvicultura y Centro de Biotecnología*, 58-64.
- Vengadesan, A., Ganapathi, S., Amutha, N., & Selvaraj, M. (2002). *In vitro* propagation of *Acacia* species*/a review. *Department of*

Biotechnology, School of Life Sciences, Bharathidasan University, Tiruchirappalli, Tamilnadu, India, 620-624.

- Vengadesan, G., Ganapathi, A., Prem, H., Anand, R., Ramesh, L., & Anbazhagan, V. (2008). *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 23-28.
- Vila, S., Rey, H., & Mroginski, L. (2009). Establecimiento *in vitro* de Explantes de *Gleditsia triacanthos* L. (Leguminosae). *Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) – IBONE Argentina*, 290.
- YACHAY. (12 de Mayo de 2013). *Avance del proyecto*. Obtenido de <http://www.yachay.gob.ec/Avance>
- Yadav, K., & Singh, N. (2011). Effect of seed harvesting season and sterilization treatments on Germination and *in vitro* propagation of *Albizia lebeck* (L.) Benth. *Plant Tissue Culture Lab., Department of Botany, Kurukshetra University, Kurukshetra, Haryana, India*, 102-108.
- Yasodha, R., Sumanthi, R., & Gurumurthi, K. (2004). Micropropagation for quality propagule production in plantatio forestry. *Division of Plant Biotechnology, Institute of Forest Genetics and Tree Breeding Coimbatore, India*, 151-156.
- Zuñiga, R. (1996). *Viability of recalcitrant Inga seeds*. USA: Agroforestry Cranfiel Silsoe College.