

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“DETERMINACIÓN DEL PROTOCOLO DE ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE QUISHUAR (*Buddleja incana*), A PARTIR DE YEMAS AXILARES DE PLANTAS MADRE, COMO UNA HERRAMIENTA PARA LA PRESERVACIÓN DE ESTA ESPECIE DENTRO DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO”

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MARÍA JOSÉ CÁRDENAS ESPINOSA

Sangolquí, 19 Abril del 2011

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

María José Cárdenas Espinosa

**DIRECTOR DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN
BIOTECNOLOGÍA**

Ing. Rafael Vargas

DELEGADO UNIDAD DE ADMISION Y REGISTRO

Abg. Laura López Acurio

Sangolquí, 19 de Abril del 2011

CERTIFICACION

Ing. Norman Soria

Ing. Marco Taipe

Certifican:

Que el trabajo titulado “Determinación del protocolo de establecimiento y multiplicación *in vitro* de Quishuar (*Buddleja incana*), a partir de yemas axilares de plantas madre, como una herramienta para la preservación de esta especie dentro del Distrito Metropolitano de Quito”, realizado por María José Cárdenas Espinosa, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a la temática del proyecto, proceso de investigación *in vitro*, por la importancia en el área de reforestación y conservación de especies forestales nativas, SI recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a María José Cárdenas Espinosa que lo entregue a Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Quito, 19 Abril del 2011

Ing. Norman Soria
DIRECTOR

Ing. Marco Taipe
CODIRECTOR

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, Marcelo Cárdenas y Cristina Espinosa, quienes han sido un gran ejemplo de trabajo, tenacidad y fortaleza. A mis hermanas, María Cristina y Carolina, quienes fueron mi estímulo y aliento. A todos aquellos que día a día creen en mí.

María José Cárdenas

AGRADECIMIENTO

Agradezco a todas aquellas personas que motivaron este proyecto y colaboraron en cada etapa del mismo para que todo siguiera adelante.

Gracias a Dios; por haber guiado mis pasos con sabiduría y fortaleza.

A mis padres, por su apoyo incondicional, cariño y comprensión a lo largo de toda mi vida.

A mis hermanas, quienes con su ternura, motivación y esfuerzo representan un pilar fundamental.

Al Ing. Norman Soria, por sus sugerencias y aportes desde el inicio de este proyecto que hicieron posible su realización.

Al Ing. Marco Taipe, por la coordinación y colaboración en cada momento.

Al Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la EPMMOP, especialmente al Ing. Cristian Reyes e Ing. Elisa Erazo por haberme permitido participar en esta experiencia de trabajo e investigación.

Al Ing. Fabián Díaz, por sus consejos y conocimientos que fortalecieron este proyecto.

Al personal de vivero: Rita, Diana y Segundo quienes con su amistad y trabajo crearon un soporte constante.

A mis compañeras de tesis: Amparito, Naty y Karlita por su amistad, lealtad y apoyo dentro y fuera del Laboratorio, en especial a Adri por ser una amiga en todo momento.

A Alejandro Narváez por su paciencia y apoyo imprescindible durante los últimos meses.

A todos mis amigos dentro de estos 5 años de carrera por su amistad sincera, cariño, preocupación y confianza, esenciales en el desarrollo de la carrera y mi formación como persona.

A todos ellos, gracias, sin ellos hubiese sido imposible.

María José Cárdenas

ÍNDICE

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS	II
CERTIFICACION.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO	V
INDICE	VII
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VIII
LISTADO DE TABLAS	X
LISTADO DE FIGURAS	XV
LISTADO DE ANEXOS	XVII
ABREVIATURAS	XVIII
RESUMEN	XIX
ABSTRACT.....	XX

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación de problema	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos Específicos	4
1.4 Marco Teórico.....	4
1.4.1 Distrito Metropolitano de Quito	4
1.4.2 Degradación Ambiental	6
1.4.2 Quishuar	7
1.4.2.1 Descripción botánica.....	7
1.4.2.2 Distribución geográfica.....	7
1.4.2.3 Características generales.....	8
1.4.2.4 Usos y propiedades	10
1.4.3 Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	10
1.4.3.1 Reguladores de crecimiento.....	12
1.4.3.1.1 Auxinas.....	12
1.4.3.1.2 Citoquininas.....	13
1.4.3.1.3 Brasinoesteroides.....	14
1.4.3.1.4 Giberelinas.....	15
1.4.3.1.5 Otros reguladores de crecimiento	16
1.4.3.1.5.1 Ácido abscísico.....	16
1.4.3.1.5.2 Etileno.....	17
1.4.3.2 Factores Químicos.....	17
1.4.3.2.1 Sales inorgánicas	17
1.4.3.2.2 Carbohidratos	19
1.4.3.2.3 Vitaminas.....	19
1.4.3.2.4 Aminoácidos.....	19
1.4.3.2.5 Agentes gelificantes.....	20
1.4.3.3 Factores Físicos.....	20
1.4.3.4 Etapas de la micropropagación	21
1.4.3.4.1 Preparación del material vegetal.....	21
1.4.3.4.2 Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	22
1.4.3.4.3 Multiplicación <i>in vitro</i>	22
1.4.3.4.4 Enraizamiento	23
1.4.3.4.5 Aclimatación de las plántulas	23
1.4.4 Propagación de especies forestales.....	24
1.5 Sistema de hipótesis.....	24
CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 Fase de campo	25
2.1.1 Ubicación geográfica del vivero.....	25
2.1.1.1 Plantas madre de vivero	25

2.1.1.2	Tratamiento preliminar.....	26
2.1.1.3	Selección de explantes	26
2.1.1.4	Corte de explantes	27
CAPITULO 3: RESULTADOS.....		37
3.1.	Fase I: Desinfección de explantes	37
3.2.	Fase II: Establecimiento <i>in vitro</i> de explantes	45
3.2.1.	Longitud de brote	45
3.2.2.	Número de yemas basales por brote	49
3.2.3.	Índice de contaminación.....	53
3.2.4.	Índice de brotación	57
3.3.	Fase III: Multiplicación <i>in vitro</i> de explantes	61
3.3.1.	Longitud de brote	61
3.3.2.	Número de brotes por explante.....	72
3.3.3.	Índice de contaminación.....	83
3.3.4.	Índice de brotación	94
CAPITULO 4: DISCUSIÓN		106
4.1.	Fase I: Desinfección de explantes	106
4.2.	Fase II: Establecimiento <i>in vitro</i> de explantes	108
4.2.1	Longitud de brote	108
4.2.2	Número de yemas basales por brote	109
4.2.3	Índice de contaminación.....	110
4.2.4	Índice de brotación	110
4.3.	Fase III: Multiplicación <i>in vitro</i> de explantes	111
4.3.1.	Longitud de brote	111
4.3.2.	Número de brotes por explante.....	113
4.3.3.	Índice de contaminación.....	114
4.3.4.	Índice de brotación	115
CAPITULO 5: CONCLUSIONES.....		117
CAPITULO 6: RECOMENDACIONES.....		119
CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA		121
ANEXOS		126
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....		132
AUTORIZACIÓN.....		133

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Características físicas de especies potenciales para sistemas de reforestación del área Andina.	9
Tabla 1.2 Composición de cinco sales inorgánicas en la formulación Murashige y Skoog (Smith, 2000).	18
Tabla 2.1 Tratamientos utilizados en la fase de desinfección de explantes.	29
Tabla 2.2 Diferentes tratamientos con BAP en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> de explantes.	30
Tabla 2.3 Tratamientos realizados con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	34
Tabla 2.4 Tratamientos realizados con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	34
Tabla 2.5 Tratamientos independientes realizados con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	34
Tabla 3.1 Porcentajes de supervivencia y mortalidad para MSVG y MSVG/2 de acuerdo a cada tratamiento.	37
Tabla 3.2 Análisis de varianza para la variable mortalidad en la fase de desinfección.	38
Tabla 3.3 Análisis de varianza para la variable supervivencia en la fase de desinfección. ...	38
Tabla 3.4 Porcentajes globales de mortalidad y supervivencia con relación a los medio de cultivo MSVG/2 y MSVG.	39
Tabla 3.5 Prueba Chi- cuadrado y análisis de varianza para contaminación fúngica y bacteriana en la fase de desinfección de explantes.	41
Tabla 3.6 Porcentajes totales de contaminación de los tratamientos de desinfección.	41
Tabla 3.7 Prueba Chi- cuadrado y análisis de varianza para descarte y supervivencia en la fase de desinfección de explantes.	43
Tabla 3.8 Porcentajes totales de descarte y supervivencia de los tratamientos de desinfección.	44
Tabla 3.9 Análisis de varianza para longitud de brotes en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	46
Tabla 3.10 Rangos de significancia para longitud de brote según la prueba SNK al 5% en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	46
Tabla 3.11 Promedios para longitud de brote en ambos medios de cultivo con la prueba SNK al 5%.	47
Tabla 3.12 Promedios para longitud de brote según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.	48
Tabla 3.13 Análisis de varianza para número de yemas basales por brotes en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	49
Tabla 3.14 Rangos de significancia para número de yemas basales por brote según la prueba SNK al 5% en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	50
Tabla 3.15 Promedios para el número de yemas basales por brote en ambos medios de cultivo con la prueba SNK al 5%.	51
Tabla 3.16 Promedios para el número de yemas basales por brote según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.	52
Tabla 3.17 Análisis de varianza para el índice de contaminación en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	53
Tabla 3.18 Rangos de significancia para promedios de porcentajes de contaminación de cada tratamiento con la prueba SNK al 5% en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	54

Tabla 3.19 Porcentajes para el índice de contaminación en ambos medios de cultivo con la prueba SNK al 5%.	55
Tabla 3.20 Promedios del porcentaje de contaminación en ambos medios de cultivo con la prueba SNK al 5%.	56
Tabla 3.21 Análisis de varianza para índice de brotación en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	57
Tabla 3.22 Rangos de significancia para índice de brotación según la prueba SNK al 5% en la fase de establecimiento <i>in vitro</i>	58
Tabla 3.23 Promedios para el índice de brotación en ambos medios de cultivo con la prueba SNK al 5%.	59
Tabla 3.24 Promedios para el índice de brotación según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.	60
Tabla 3.25 Análisis de varianza para longitud de brotes según ensayos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	62
Tabla 3.26 Rangos de significancia para longitud de brotes por tratamientos con BAP según la prueba SNK al 5% en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	62
Tabla 3.27 Promedios para longitud de brotes en ambos medios de cultivo según ensayos con BAP mediante la prueba SNK al 5%.	63
Tabla 3.29 Análisis de varianza para longitud de brotes según ensayos con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	65
Tabla 3.30 Rangos de significancia para longitud de brotes por tratamientos con KIN según la prueba SNK al 5% en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	66
Tabla 3.31 Promedios para longitud de brotes en ambos medios de cultivo según ensayos con KIN mediante la prueba SNK al 5%.	67
Tabla 3.32 Promedios para longitud de brote según dosis de KIN con la prueba SNK al 5%.	68
Tabla 3.33 Análisis de varianza para longitud de brotes según ensayos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	69
Tabla 3.34 Rangos de significancia para longitud de brotes por tratamientos con BRS según la prueba SNK al 5% en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	69
Tabla 3.36 Promedios para longitud de brote según dosis de BRS con la prueba SNK al 5%.	71
Tabla 3.37 Análisis de varianza para número de brotes por explante según ensayos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	72
Tabla 3.38 Rangos de significancia para número de brotes por explante según ensayos con BAP dada por la prueba SNK al 5% en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	73
Tabla 3.39 Promedios para número de brotes por explante en ambos medios de cultivo según ensayos con BAP mediante la prueba SNK al 5%.	74
Tabla 3.40 Promedios para número de brotes por explante según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.	75
Tabla 3.41 Análisis de varianza para número de brotes por explante según ensayos con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	76
Tabla 3.43 Promedios para número de brotes por explante en ambos medios de cultivo según ensayos con KIN mediante la prueba SNK al 5%.	78
Tabla 3.44 Promedios para número de brotes por explante según dosis de KIN con la prueba SNK al 5%.	79

Tabla 3.45 Análisis de varianza para número de brotes por explante según ensayos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	80
Tabla 3.46 Rangos de significancia para número de brotes por explante según ensayos con BRS dada por la prueba SNK al 5% en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	80
Tabla 3.47 Promedios para número de brotes por explante en ambos medios de cultivo según ensayos con BRS mediante la prueba SNK al 5%.	81
Tabla 3.48 Promedios para número de brotes por explante según dosis de BRS con la prueba SNK al 5%.	82
Tabla 3.49 Análisis de varianza para el índice de contaminación según ensayos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	84
Tabla 3.50 Promedios del porcentaje de contaminación según ensayos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	84
Tabla 3.51 Promedios del porcentaje de contaminación en ambos medios de cultivo según ensayos con BAP mediante la prueba SNK al 5%.	85
Tabla 3.52 Promedios de índices de contaminación según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.	86
Tabla 3.53 Análisis de varianza para el índice de contaminación según ensayos con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	87
Tabla 3.54 Promedios del índice de contaminación según tratamientos con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	88
.....	88
Tabla 3.55 Promedios del índice de contaminación en ambos medios de cultivo según ensayos con KIN mediante la prueba SNK al 5%.	89
Tabla 3.56 Promedios de índices de contaminación según dosis de KIN con la prueba SNK al 5%.	90
Tabla 3.57 Análisis de varianza para el índice de contaminación según ensayos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	91
Tabla 3.58 Porcentajes de contaminación según ensayos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	91
Tabla 3.59 Promedios del índice de contaminación en ambos medios de cultivo según ensayos con BRS mediante la prueba SNK al 5%.	92
Tabla 3.60 Promedios del índice de contaminación según dosis de BRS con la prueba SNK al 5%.	93
Tabla 3.61 Análisis de varianza para el índice de brotación según ensayos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	95
Tabla 3.62 Rangos de significancia para índice de brotación según ensayos con BAP dada por la prueba SNK al 5%.	95
Tabla 3.63 Promedios del índice de brotación en ambos medios de cultivo según ensayos con BAP mediante la prueba SNK al 5%.	96
Tabla 3.64 Promedios de índices de brotación según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.	97
Tabla 3.65 Análisis de varianza para el índice de brotación según ensayos con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	98
Tabla 3.66 Rangos de significancia para índice de brotación según ensayos con KIN dada por la prueba SNK al 5%.	99
Tabla 3.68 Promedios de índices de brotación según dosis de KIN con la prueba SNK al 5%.	101

Tabla 3.69 Análisis de varianza para el índice de brotación según ensayos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	102
Tabla 3.70 Presentación de medias para índice de brotación según ensayos con BRS dada por la prueba SNK al 5%.	102
Tabla 3.71 Promedios del índice de brotación en ambos medios de cultivo según ensayos con KIN mediante la prueba SNK al 5%.	103
Tabla 3.72 Promedios de índices de brotación según dosis de BRS con la prueba SNK al 5%.	104

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 División política del Distrito Metropolitano de Quito (D'Ercole & Metzger 2004).	5
Figura 1.2 Distribución geográfica de Quishuar en Sudamérica (Carreras, 2008).	8
Figura 2.1 Plantas madre de Quishuar pertenecientes al vivero de la EPMMOP.	25
Figura 2.2 Cuatro yemas axilares (YAX) una yema apical (YAP) de tallos jóvenes de Quishuar.	26
Figura 2.3 Yemas axilares cortadas, cada una con aprox. 3 cm de longitud.	27
Figura 2.4 Lavado de explantes con detergente en agitación constante.	28
Figura 2.5 Lavado de explantes dentro de la cámara de flujo laminar.	31
Figura 2.6 Variación en la longitud de brotes durante la fase de establecimiento <i>in vitro</i> A) siete días B) catorce días y C) veintiún días después de la fase de desinfección.	32
Figura 3.1 Porcentajes de mortalidad y supervivencia de acuerdo a los tratamientos de desinfección.	39
Figura 3.2 Porcentajes globales de mortalidad y supervivencia de acuerdo a los medios de cultivo MSVG y MSVG/2.	40
Figura 3.3 Porcentajes de contaminación fúngica y bacteriana de acuerdo a los tratamientos de desinfección	42
Figura 3.4 Porcentajes de descarte y supervivencia de acuerdo a los tratamientos de desinfección.	45
Figura 3.5 Promedios de longitud de brotes de acuerdo a cada tratamiento en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .	47
Figura 3.7 Promedios de longitud de brotes para cada dosis de BAP en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .	49
Figura 3.8 Promedios de número de yemas basales por brote de acuerdo a cada tratamiento en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .	51
Figura 3.9 Promedios de número de yemas basales por brote para cada medio de cultivo en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .	52
Figura 3.10 Promedios de número de yemas basales por brote para cada dosis de BAP en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .	53
Figura 3.11 Promedios del índice de contaminación de acuerdo a cada tratamiento en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .	55
Figura 3.12 Promedio de porcentajes de contaminación por cada medio de cultivo en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .	56
Figura 3.13 Promedios del porcentaje de contaminación para cada dosis de BAP en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .	57
Figura 3.14 Promedios del índice de brotación de acuerdo a cada tratamiento en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .	59
Figura 3.15 Promedios del índice de brotación por cada medio de cultivo en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .	60
Figura 3.16 Promedios del índice de brotación para cada dosis de BAP en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> .	61
Figura 3.17 Promedios de longitud de brote por tratamientos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	63

Figura 3.18 Promedios de longitud de brotes para cada medio de cultivo según ensayos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	64
Figura 3.19 Promedios de longitud de brotes para cada dosis de BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	65
Figura 3.20 Promedios de longitud de brote por tratamientos con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	66
Figura 3.21 Promedios de longitud de brotes para cada medio de cultivo según ensayos con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	67
Figura 3.22 Promedios de longitud de brotes para cada dosis de KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	68
Figura 3.23 Promedios de longitud de brote por tratamientos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	70
Figura 3.24 Promedios de longitud de brotes para cada medio de cultivo según ensayos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	71
Figura 3.25 Promedios de longitud de brotes para cada dosis de BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	72
Figura 3.26 Promedios de número de brotes por explante según tratamientos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	74
Figura 3.27 Promedios de número de brotes por explante para cada medio de cultivo según ensayos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	75
Figura 3.28 Promedio de número de brotes por explante para cada dosis de BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	76
Figura 3.29 Promedio de número de brotes por explante según tratamientos con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	77
Figura 3.30 Promedios de número de brotes por explante para cada medio de cultivo según ensayos con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	78
Figura 3.31 Promedios de número de brotes por explante para cada dosis de KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	79
Figura 3.32 Promedios de número de brotes por explante según tratamientos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	81
Figura 3.33 Promedios de número de brotes por explante para cada medio de cultivo según ensayos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	82
Figura 3.34 Promedios de número de brotes por explante para cada dosis de BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	83
Figura 3.35 Promedios del Índice de contaminación según tratamientos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	85
Figura 3.36 Promedios de los porcentajes de contaminación para cada medio de cultivo según ensayos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	86
Figura 3.37 Promedios del índice de contaminación para cada dosis de BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	87
Figura 3.39 Promedios de porcentaje de contaminación para cada medio de cultivo según ensayos con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	89
Figura 3.40 Promedios del índice de contaminación para cada dosis de KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	90
Figura 3.41 Promedios del índice de contaminación según ensayos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	92

Figura 3.42 Promedios del porcentaje de contaminación para cada medio de cultivo según ensayos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	93
Figura 3.43 Promedios del índice de contaminación para cada dosis de BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	94
Figura 3.44 Promedios de índice de brotación según tratamientos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	96
Figura 3.45 Promedios del porcentaje de brotación para cada medio de cultivo según ensayos con BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	97
Figura 3.46 Promedios del índice de brotación para cada dosis de BAP en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	98
Figura 3.48 Porcentajes de brotación para cada medio de cultivo según ensayos con KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	100
Figura 3.49 Promedios del índice de brotación para cada dosis de KIN en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	101
Figura 3.50 Promedio de índice de brotación de acuerdo a cada tratamiento con BRS utilizado en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	103
Figura 3.51 Porcentajes de brotación para cada medio de cultivo según ensayos con BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	104
Figura 3.52 Promedios del índice de brotación para cada dosis de BRS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i>	105

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. Composición de los medios de cultivo MSVG y MSVG/2.	126
Anexo B. Explantes de Quishuar establecidos <i>in vitro</i> luego de 7 días A) en medio MSVG B) medio MSVG con 0,56 mg/L BAP y C) medio MSVG con 1,12 mg/L BAP.	127
Anexo C. Yema axilar de Quishuar establecida <i>in vitro</i> luego de 21 días en medio MSVG.	127
Anexo D. Explantes establecidos <i>in vitro</i> luego de 14 días en medio MSVG/2.	128
Anexo E. Yema axilar de Quishuar establecida <i>in vitro</i> luego de 14 días en medio MSVG/2 suplementada con 0,56 mg/L BAP.	128
Anexo F. Explantes de Quishuar establecidos <i>in vitro</i> luego de 21 días A) en medio MSVG/2 suplementado con 1,12 mg/L BAP y B) medio MSVG/2 con 1,68 mg/L BAP.	129
Anexo H. Multiplicación <i>in vitro</i> de brotes de Quishuar luego de A) 7 días y B) 21 días en medio MSVG suplementado con 1,12 mg/L KIN.	129
Anexo I. Brotes multiplicados <i>in vitro</i> luego de A) 7 días B) 14 días y C) 21 días en medio MSVG suplementado con 0,4 ppm BRS.	130
Anexo J. Brotes multiplicados <i>in vitro</i> luego de 7 días en medio MSVG suplementado con 3,37 mg/L BAP.	130
Anexo K. Brotes multiplicados <i>in vitro</i> luego de 7 días en medio MSVG/2 suplementado con 3,37 mg/L BAP.	131
Anexo L. Brotes multiplicados <i>in vitro</i> luego de 7 días en medio MSVG/2 A) suplementado con 1,12 mg/L KIN y B) con 0,4 ppm de BRS.	131

ABREVIATURAS

DMQ: Distrito Metropolitano de Quito

GA₃: Ácido giberélico.

gr.L⁻¹: gramo/Litro.

ppm: Partes por millón.

ABA: Ácido abscísico.

MS: Formulación Murashige y Skoog

MSVG: Murashige y Skoog con vitaminas Gamborg

MSVG/2: Formulación con la mitad de sales inorgánicas de Murashige y Skoog con vitaminas Gamborg.

BAP: 6- Bencil aminopurina

KIN: Kinetina

BRS: Brassinolida

pH: Potencial hidrógeno

ha: Hectáreas

EPMMOP: Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas

AIA: Ácido Indolacético

2,4- D: 2,4 Diclorofenoxiacético

p/v: peso/volumen

RESUMEN

El Distrito Metropolitano de Quito está formado por 85 quebradas que bajan desde las laderas del volcán Pichincha a la ciudad. Estas zonas mantienen la estabilidad del suelo, sin embargo, asentamientos informales, altos índices de deforestación y tala ilegal han provocado procesos de erosión y riesgo de deslizamientos. Esto marca una nueva perspectiva que demuestra la vulnerabilidad física, social, económica y ambiental en que vive la población debido a la falta de programas de reforestación sustentable con especies forestales nativas. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el protocolo de establecimiento y multiplicación *in vitro* de Quishuar para evaluar su viabilidad. Para el efecto, se realizaron cultivos *in vitro* de Quishuar partiendo de yemas axilares de plantas madre de vivero. Utilizando tres etapas (desinfección, establecimiento y multiplicación) se evaluaron medios de cultivo y biorreguladores. Los resultados indican que los explantes sometidos a mayores concentraciones de cloro y tiempo (2,5% y 15 min) determinaron mayores porcentajes de supervivencia en MSVG (70%) y MSVG/2 (76,7%). En el caso de los explantes establecidos, aquellos sin concentraciones de BAP (0 mg/L) presentaron mayor crecimiento vegetativo y longitud de brotes (13.36 mm) y (13.15 mm) para MSVG/2 y MSVG. De acuerdo a los ensayos de multiplicación, bajas concentraciones de KIN (1,12 mg/L) y BRS (0,4 ppm) desarrollaron índices mayores de brotación (4,05% y 4,12%) respectivamente, en comparación con las dosis más altas de BAP (3,37 mg/L) cuyo valor es fue de 3,03%. Basados en los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede sugerir que los medios de cultivo y biorreguladores evaluados son efectivos para la determinación de un protocolo de establecimiento y multiplicación *in vitro* de Quishuar.

ABSTRACT

The Quito Metropolitan District is made up of 85 streams that flow down from the slopes of the Pichincha volcano to the city. These areas maintain soil stability, however, informal settlements; high rates of deforestation and illegal logging have caused erosion and landslide risk. This marks a new perspective view showing the physical, social, economic and environmental living population due to lack of sustainable reforestation programs with native tree species. This study aimed to determine the protocol for the establishment and multiplication *in vitro* of Quishuar to assess their viability. For this purpose, were cultured *in vitro* from axillary buds Quishuar of nursery stock plants. Using three stages (disinfection, establishment and multiplication) were evaluated culture media and bio. These results indicate that the explants subjected to higher concentrations of chlorine and time (2.5% and 15 min) found higher rates of survival in MSVG (70%) and MSVG/2 (76.7%). In the case of explants established, those without BAP concentrations (0 mg/L) showed higher vegetative growth and shoot length (13.36 mm) and (13.15 mm) for MSVG/2 and MSVG. According to the multiplication tests, low concentrations of KIN (1.12 mg/L) and BRS (0.4 ppm) developed higher rates of germination (4.05% and 4.12%) respectively, compared with higher doses of BAP (3.37 mg/L) whose value was 3.03%. Based on the results of this investigation may suggest that the culture media and bio evaluated are effective for determining a protocol for *in vitro* establishment and multiplication of Quishuar.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación de problema

La necesidad de obtener recursos del bosque ha llevado al ser humano a explotarlo de forma irracional, sin pensar en las consecuencias. Centeno (2007) determinó que hoy en día, sólo en el continente americano se pierden hasta 300.00 ha de bosque nativo por año. Históricamente, la región Andina ha estado densamente poblada y su vegetación natural ha sido modificada durante milenios debido a actividades antropogénicas, razón por la cual bosques y vertientes internas de la cordillera sólo mantienen remanentes de vegetación nativa (Cárcamo, 2004).

Ruíz (2006) explica que, la Sierra ecuatoriana se encuentra entre los valles ubicados en la Cordillera Occidental y Oriental. Dentro de la cadena de altiplanos se encuentra el Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) el cual tiene una superficie de 4.204 Km² (422.802 ha) ubicándose en el centro norte de la provincia, al pie del volcán Pichincha, con altitud promedio de 2820 m.s.n.m (FONAG, 2008).

Alrededor de 85 quebradas bajan desde las laderas del volcán a la ciudad. Estas zonas son consideradas parte natural del entorno que mantienen la estabilidad del suelo en el DMQ, sin embargo los asentamientos informales, altos índices de deforestación y tala ilegal han provocado procesos de erosión, riesgo de aluviones, deslizamientos, flujos de lodos y escombros que se producen por intensas lluvias (Zevallos, 2005).

El riesgo no sólo se manifiesta a través del aumento de la probabilidad y magnitud de ocurrencia de deslizamientos o aluviones que afecten a la población de zonas consideradas críticas por el proceso de degradación ambiental, sino que marca una nueva perspectiva que demuestra la vulnerabilidad física, social, económica y ambiental en que vive la población de las laderas que forman el DMQ y cómo la ciudad se encuentra en peligro debido a la falta de programas de reforestación sustentable que mejoren la calidad de vida de los ciudadanos (Zevallos, 2005).

El 27.9% del área Metropolitana ubicada en cuencas de laderas constituye zonas urbanas ocupadas legalmente o invadidas de manera ilegal con alto grado de consolidación, lo que dificulta el planteamiento y desarrollo de nuevos programas de recuperación de suelos. Esta problemática demanda programas de reforestación con especies nativas de la zona Andina, dada su adaptación a las condiciones locales (Costales, 2005).

Tomando en cuenta lo expuesto previamente, esta investigación tratará de responder si el cultivo *in vitro* de especies forestales es una herramienta potencial para regenerar zonas deforestadas en el DMQ.

1.2 Justificación del problema

Las especies forestales nativas juegan un papel importante en la formación de ecosistemas integrales. Kellison (2002) menciona que estas especies están asociadas a sistemas de producción agroforestales, tales como terrazas de formación lenta y zanjas de infiltración. En ambas prácticas se observaron resultados altamente satisfactorios.

La presencia del componente forestal protege al cultivo de fuertes vientos, aumenta la temperatura generando un microclima dentro del sistema, provee de sombra ante la intensa radiación solar, actúa como un verdadero sistema de protección del suelo que mejora las condiciones y reciclaje de los nutrientes, además protege las cabeceras de cuencas, lo que genera ventajas ambientales, sociales y económicas en conjunto con poblaciones cercanas (Majada, 2005).

Estudios medioambientales han demostrado que la región andina posee una de las floras más diversas de Sudamérica. Sin embargo, el avance de la frontera agrícola, sobrepastoreo y la producción maderera han acelerando los procesos masivos de deforestación alterando cuencas y páramos (Henderson *et al.*, 2001).

Todo este fenómeno de degradación, también se ve presente en las fuentes de agua que abastecen al Distrito Metropolitano de Quito (FONAG, 2008).

Esta problemática hace indispensable la búsqueda de nuevas alternativas sustentables con el fin mantener el equilibrio en ecosistemas andinos. Los sistemas de reforestación tradicionales en Ecuador cuentan con poca participación gubernamental y comunitaria, además carecen de investigación e inversión nacional y extranjera lo que dificulta el desarrollo en esta área (Arica, 2003).

Uribe (2004) explica que a través de métodos de propagación vegetal tradicional aún existen limitaciones y dificultades importantes, tales como: lentitud en el proceso de desarrollo e irregularidad en la obtención de plántulas para formar una población homogénea (edad y/o tamaño).

Por tanto, el cultivo *in vitro* se presenta como una excelente alternativa para superar las dificultades antes mencionadas, ya que por medio de esta técnica es posible reproducir clones con alto valor genético y plantas de alta calidad que pueden llegar incluso a triplicar las ganancias económicas, forestales y ambientales.

Los sistemas de cultivo vegetal permiten optimizar las condiciones ambientales en referencia a factores físicos, nutricionales y hormonales; recuperar plantas en peligro de extinción, multiplicándolas rápidamente en un corto periodo de tiempo (Bagót, 2005).

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones (Henderson *et al.*, 2001).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Determinar el protocolo de establecimiento y multiplicación *in vitro* de Quishuar a partir de yemas axilares de plantas de vivero para evaluar su viabilidad y desarrollo vegetativo.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Establecer un procedimiento de desinfección para obtener explantes libres de agentes contaminantes.
- Determinar el protocolo para el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de Quishuar
- Producir brotes a partir de explantes establecidos *in vitro* previamente de Quishuar.
- Determinar la tasa de multiplicación de brotes de Quishuar.
- Evaluar la respuesta de los diferentes tratamientos durante las diversas etapas de desarrollo de los explantes.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Distrito Metropolitano de Quito

El Distrito Metropolitano de Quito es un área rodeada por un entorno rico y diverso, ecológica, paisajística y geográficamente. Sus colinas y planicies forman un valle longitudinal en el eje norte-sur, donde se concentra la zona urbana (FONAG, 2008).

Se localiza entre las coordenadas 0°10'0" de latitud sur y 78°29'0" de longitud oeste. De acuerdo al Censo de Población y Vivienda (2001), el DMQ, cuenta con 1'842.201 habitantes, de los cuales 1'414.601 se ubican en el área urbana. Si a ello se suma la población de los cantones Rumiñahui y Mejía, el total de la población del área de influencia directa con el DMQ es de aproximadamente 2.000.00 de habitantes; de estos, el 82% vive en las áreas urbanas y el 18% en las suburbanas y rurales.

Esta zona se divide en 8 administraciones zonales, las cuales contienen a 32 parroquias urbanas y 33 parroquias rurales y suburbanas (Fig.1.1).

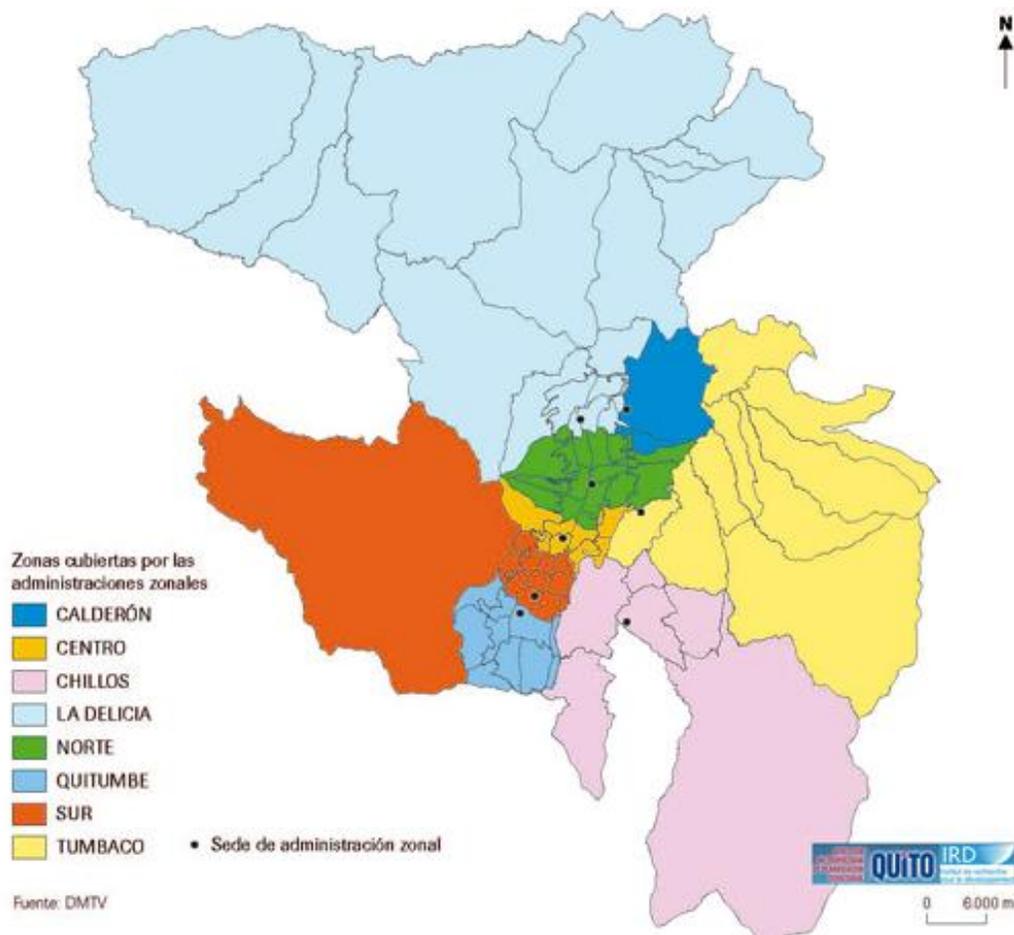


Figura 1.1 División política del Distrito Metropolitano de Quito (D'Ercole & Metzger 2004).

14.1.2 Degradación Ambiental

En términos de conservación de biodiversidad, el territorio del DMQ presenta una situación preocupante, ya que la mayor parte de sus áreas silvestres han sido reducidas significativamente. De acuerdo con el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2008) la superficie de los paisajes naturales remanentes se extiende en aproximadamente el 21% de la superficie del Distrito. La disminución de la superficie de los paisajes naturales, es alarmante ya que la cordillera andina, especialmente en los flancos (bosques nublados) - espacio sobre el cual se asienta el DMQ- concentra altas cantidades de especies silvestres.

Zevallos (2005) explica que la deforestación ocurre a causa de los requerimientos de urbanización y aprovechamiento de madera, leña, combustible y construcción. La tasa de desaparición del bosque para ocupación urbana se ha estimado en 100 ha/año, o más. De esta forma, el bosque de las laderas que rodean la ciudad desaparecería en 15 años aproximadamente.

La basura y escombros, que se arrojan a las quebradas, a más del problema sanitario, implican altos costos de operación y mantenimiento. Según la EMAAP-Q (Empresa Metropolitana de Alcantarillado y Agua Potable de Quito) en el año 2000 sólo en laderas se recogió el 36.8% de la basura que se genera; el 31.5% se depositan en quebradas. Al existir escasez de material vegetal incrementa el porcentaje de inundaciones y el riesgo de aluviones en la ciudad (Zevallos, 2005).

Efectos de erosión y desestabilización de laderas por apertura de calles, caminos, cortes, zanjas y canales podrían producir grandes cambios en la morfología del suelo. No obstante, este impacto no ha sido cuantificado, debido a fuertes pendientes y alta erosividad de materiales, pero es posible determinar la formación de grandes cárcavas con varios metros de profundidad que aportan gran cantidad de sedimentos a quebradas y laderas, incrementando la probabilidad de deslizamientos (Costales, 2005).

La amenaza, inicialmente de origen natural (geodinámica, hidrometeorológica), se ha convertido en un problema socio natural e incluso antropológico), como consecuencia de la falta de planificación municipal, ausencia de servicios y condiciones socio-económicas del país (FONAG, 2008).

1.4.2 Quishuar

1.4.2.1 Descripción botánica

Árbol de aprox. 15 metros de altura, raíces pivotantes engrosadas y follaje tupido. Corteza café, ramas jóvenes del mismo color. Las hojas son de subcoriáceas a coriáceas, verde-oscuras encima y blanco amarillentas, torrentosas debajo, hoja oblarga; 7 x 4.5 cm ápice afilado, base afilada, margen en forma de serrucho. Inflorescencias de 8-15 cm de largo, paniculadas con 2-3 órdenes de ramas, flores agrupadas en cabezas de 1 cm. de diámetro, cada una con 15 - 40 flores. Cáliz torrentoso por fuera con lóbulos de 2.5-4 cm de largo. Corola amarillenta-anaranjada, campanulada 4.5-6 mm de largo incluida los lóbulos ovoides (Brandbyge, 2004).

1.4.2.2 Distribución geográfica

Se encuentra distribuida en la parte alta de los Andes, dentro del área de Ecuador, Perú y Bolivia (Fig.1.2). Esta especie se desarrolla entre los 2.300 y 3.400 m.s.n.m. aunque algunas veces se la encuentra hasta los 3. 500 m.s.n.m. (Costales, 2005).

Considerada como una especie característica y constitutiva de la formación forestal de la Ceja Andina (2.800 – 3.200 m.s.n.m.) constituye la franja superior del Bosque Andino Nublado que limita con el Páramo. Éste se caracteriza por un denso bosque, con árboles de entre 5 a 15 metros de alto, con arbustos densamente ramificados y árboles pequeños con hojas de tamaño reducido y coriáceas (Arica, 2003).

Actualmente el bosque de Ceja Andina está presente en forma de islas de bosque natural (fragmentos o parches) relegados a las quebradas, o en suelos con pendientes

pronunciadas (Luteyn, 1999). Este aislamiento del bosque se debe a varios factores provocados por deslaves, derrumbes, desastres naturales o eventos antropogénicos- incendios y transformación a suelos agrícolas (Neill, 1999).

Esta situación pone en riesgo la sobrevivencia de estos bosques y de la biodiversidad ligada a ellos (Suárez, 2008).



Figura 1.2 Distribución geográfica de Quishuar en Sudamérica (Carreras, 2008).

1.4.2.3 Características generales

Las especies forestales locales deben ser consideradas una prioridad debido a sus características naturales. Éstas presentan mayor adaptabilidad a diferentes tipos de suelo, menor susceptibilidad a enfermedades, y un alto crecimiento vegetativo que actúa en la formación de barreras naturales (Majada, 2005).

Tabla 1.1 Características físicas de especies potenciales para sistemas de reforestación del área Andina.

	Especies Forestales				
	<i>Polylepis spp</i>	<i>Gynoxys spp</i>	<i>Buddleja incana</i>	<i>Vallea Stipularis</i>	<i>Oreopanax spp</i>
Características					
Radio de altitud natural (metros)	3,400 - 4200 m	3,200 - 4,100 m	3,000 - 3,700 m	2,500 - 3,600 m	3,000 - 4,000 m
Tolerancia a la helada	Tolerante	Tolerante	Tolerante hasta los 3,700 m	Vulnerable	Vulnerable
Altitud de plantación recomendada (metros)	3,400 - 4,000 m	3,200 - 3,700 m	3,200 - 3,700 m	2,800 - 3,300 m	3,000 - 3,300 m
Terrenos aptos para plantación	Suelos orgánicos	Adaptable a suelos de diferente textura	Adaptable a una variedad de tipos de suelo	Adaptable a una variedad de tipos de suelo	Suelos orgánicos húmedos

La Tabla 1.1 muestra las características físicas de las especies potenciales utilizadas en procesos de reforestación en el área Andina (Brandbyge, 2004). En el caso de Quishuar, cumple con todas las características necesarias para participar en programas de reforestación que permitan recuperar zonas erosionadas y antropológicamente alteradas.

Knight (2009) describe a Quishuar como una especie nativa de alto potencial, orientada a estabilizar taludes, cárcavas, laderas, riberas de quebradas, zonas de deslizamiento y degradación ambiental crítica. Generalmente esta especie nativa establece pequeños rodales y sistemas combinados de vegetación.

Esta especie vegetal protege al suelo del proceso de erosión eólica, disminuyendo la velocidad del aire en zonas deforestadas, manteniendo la estabilidad geomorfológica del suelo e incrementando los niveles de retención de humedad (Arica, 2003).

1.4.2.4 Usos y propiedades

Las especies forestales nativas de la zona Altoandina, son de mucha importancia dentro de las comunidades rurales, de ellas se obtienen importantes productos maderables como no maderables (Arica, 2003).

En la Sierra ecuatoriana, se utiliza la madera de esta especie para la elaboración de arados, timones, yugos, cabos de azadón, postes, estacas y artesanías. Se emplea en la construcción de viviendas y corrales. En las provincias de Cotopaxi, Chimborazo y Cañar consideran a Quishuar un árbol sagrado y venerado usado en el tallado de ídolos incas durante las fiestas del Raimi (De la Torre *et al.*, 2008).

Varias comunidades de la provincia de Cotopaxi utilizan el baño con la infusión de las hojas en casos de tratamiento posparto, reumatismo y sarpullidos. Las hojas molidas, junto con las de matico se usan para tratar golpes y heridas. Además, se usa en el tratamientos de afecciones indeterminadas en animales y humanos, como parte de varias mezclas en las que se emplean múltiples especies. (De la Torre *et al.*, 2008).

1.4.3 Cultivo de tejidos *in vitro*

Es una técnica de producción vegetal en condiciones totalmente asépticas. Se basa en la “totipotencialidad celular”, esto es, la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo ciertas condiciones, dadas en el cultivo *in vitro*. Así se logra la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original, a partir de cualquier parte de la planta, ya sea trozos de tejidos, ápices meristemáticos o incluso células aisladas. (Reyes & Hewstone, 1994).

Muñoz (2007) describe a la reproducción asexual vegetal como un mecanismo de división mitótico, al igual que las células animales, mediante el cual cumplen sucesivas etapas de crecimiento y desarrollo. La división celular mitótica implica una replicación de

los cromosomas de las células hijas, por lo que las mismas poseen un genotipo idéntico al de la célula madre.

Así, las células vegetales crecidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse dando dos tipos de respuesta:

- Una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos.
- Una respuesta morfogenética por la cual se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos).

La primera respuesta se conoce como organogénesis o embriogénesis indirecta (mediada por un estado de callo) mientras que la segunda respuesta se considera organogénesis o embriogénesis directa (Muñoz, 2007).

Existen diferentes tipos de cultivos *in vitro*, dependiendo de los objetivos perseguidos. Las variaciones están sujetas a las condiciones de cultivo y a los explantes - células, tejidos, meristemas, órganos, etc.- inicialmente utilizados, dándose una amplia gama de eventos y posibilidades de uso de técnicas (Reyes & Hewstone, 1994).

El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de plantas madre, las cuales permiten la inducción de respuestas morfogenéticas, como la división celular y el crecimiento vegetativo (Castillo, 2004).

En todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, el cual está regulado por el balance hormonal y el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, este balance puede ser modificado por un agregado de compuestos que imitan la acción de las hormonas vegetales. Estos compuestos, denominados reguladores del crecimiento son

los que se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta (Devlin, 1976).

1.4.3.1 Reguladores de crecimiento

Éstos se definen como estructuras moleculares que modifican cualitativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas. Su efecto está mediado por su presencia o ausencia, sin embargo la concentración de éstos es importante para un crecimiento vegetativo normal (Castillo & Davies, 1999).

Los reguladores de crecimiento median la comunicación intercelular en las plantas, para ello las células utilizan sus receptores y envían la información necesaria para cada proceso de diferenciación. Una vez que el receptor capta la señal se desencadenan microambientes distintos para células genéticamente iguales, a través de cambios en la actividad del citoesqueleto, cambios osmóticos y metabólicos (Vidal, 2008).

El complejo regulador-receptor modifica el crecimiento y desarrollo vegetal. Todos los reguladores vegetales presentan bajo peso molecular (28 a 346 Da) (Castillo, 2004).

De acuerdo a Applied Research Systems, los sistemas *in vitro* de micropropagación vegetal requieren reguladores de crecimiento capaces de mantener y permitir el desarrollo óptimo del explante para procesos posteriores de multiplicación y enraizamiento (2003).

1.4.3.1.1 Auxinas

Las auxinas son un grupo de reguladores de crecimiento vegetal que provocan elongación de las células, formación de raíces laterales y adventicias, retardo en la abscisión de hojas y frutos, entre otros efectos. Se sintetizan en las regiones meristemáticas del ápice de los tallos y se desplazan desde allí hacia otras zonas de la planta,

principalmente hacia la base. Este movimiento se realiza a través del parénquima que rodea a los haces vasculares (García, 2006).

Son varias las auxinas que existen en el tejido vegetal, siendo el ácido indolacético (AIA) la más relevante en cuanto a cantidad y actividad. Éste es considerado el precursor de la forma activa de las auxinas. Otros como el ácido indolacetonitrilo, o la indolacetamida están presentes en menor cantidad y tienen poca actividad en relación al AIA (Pérez & Martínez, 1994).

Existen, por otra parte, muchas sustancias sintéticas reguladoras del crecimiento que no poseen estructura indólica, y sin embargo presentan actividad auxínica. Un ejemplo importante es el ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4 -D) que es uno de los principales constituyentes de numerosos herbicidas (Pérez & Martínez, 1994). A partir de aquí se desarrolló una amplia gama de moléculas con actividad auxínica, como el ácido 2-metil, 4-cloro fenoxiacético (MCPA) y el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) (Salisbury & Ross, 1994).

Hay otros procesos de correlación con auxinas como: dominancia apical e inhibición del crecimiento de yemas laterales; inducción el desarrollo del sistema radicular y aéreo, crecimiento de frutos (biosíntesis de etileno y maduración), estimulación en la formación de flores, frutos, raíces y semillas; fototropismo o procesos de abscisión o caída de los frutos (Salisbury & Ross, 1994).

1.4.3.1.2 Citoquininas

Grupo de fitorreguladores que gobiernan el proceso de división celular, la diferenciación en tejidos vegetales, la modificación de la dominancia apical y diferenciación de tallos. Se encuentran en el xilema, floema y hojas, transportándose por vía acrópeta, desde el ápice de la raíz hasta las hojas, moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema (García, 2006).

En procesos *in vitro* se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Vidal (2008) señala que estos compuestos son utilizados para la proliferación de tallos axilares. Aparte de su papel como reguladores de la formación de nuevos órganos, éstos intervienen en la apertura de estomas e inhibición de la senescencia de las hojas.

García (2006) detalla que la naturaleza química de las citoquininas proviene de los derivados de la adenina. La biosíntesis de este regulador está asociada a regiones de la planta con actividad meristemática (meristemas apicales y cámbium), especialmente en tejidos en crecimiento.

Las semillas también están relacionadas con la síntesis de las citoquininas a lo largo de todo su desarrollo, desde su formación en el fruto hasta la germinación (Pérez & Martínez, 1994)

En su estructura química puede distinguirse un grupo hidrofílico específico (la adenina), cuyas alteraciones reducen o alteran la actividad de la citoquinina y un grupo lipofílico de poca o nula actividad, correspondiente a la cadena lateral que puede sustituirse dando compuestos con menor o mayor actividad (Devlin, 1976).

Actualmente se han aislado citoquininas de muchas especies diferentes de plantas, encontrándose fundamentalmente en órganos cuyos tejidos se están dividiendo de forma activa, es decir, semillas, frutos y raíces.

Recientemente, han sido identificadas en dos plantas vasculares sin semillas, un equiseto (*Equisetum arvense*) y el helecho (*Dryopteris crassirhizoma*) (García, 2006)

1.4.3.1.3 Brasinoesteroides

Mazorra (2001) describe a los brasinoesteroides como compuestos de estructura esteroideal que se caracterizan por producir estimulación en el crecimiento vegetal,

producción de biomasa en diferentes cultivos y aceleramiento de la maduración de cosechas.

Además, aumentan la resistencia a plagas y factores de estrés como salinidad, sequía, bajas y altas temperaturas, agentes químicos agresivos como plaguicidas y herbicidas. Se ha evidenciado que estos compuestos incrementan la actividad de determinados metabolitos y enzimas asociadas con los mecanismos de resistencia a patógenos (Núñez & Mazorra, 2001).

En la actualidad se conocen más de 45 miembros de la familia de los brasinoesteroides, por lo que constituyen una amplia familia de compuestos, de potente actividad biológica (Terry *et al.*, 2001).

Dentro de este grupo se encuentran las brasinolidas, que promueven varios procesos a nivel celular. Éstas tienen un papel fundamental en el desarrollo de las plantas bajo el efecto de la luz. Han sido identificadas en la mayor parte de las plantas superiores y pruebas *in vivo* muestran excelentes resultados en procesos de repique. Esta hormona vegetal favorece el crecimiento, la división celular en tallos, proliferación del follaje, crecimiento de tubos de polen y germinación de la planta (Castillo, 2004).

Además, estudios previos indican que dosis pequeñas aplicadas por aspersión (0,5 – 1 ppm) en cosechas de tomate y papa han acelerado el crecimiento vegetativo, incrementando el rendimiento y calidad de las cosechas. Sin embargo estos ensayos no han sido realizados *in vitro*, razón por la cual no existe bibliografía al respecto (Henderson *et al.*, 2001).

1.4.3.1.4 Giberelinas

Las giberelinas son el grupo más numeroso de reguladores de crecimiento que se conoce en la actualidad. Éstas son sustancias químicamente relacionadas con el ácido giberélico (GA₃). Todas las giberelinas poseen el esqueleto hidrocarbonado del gibano y

presentan como mínimo un grupo carboxílico en el carbono siete, por tanto se comportan como ácidos débiles fácilmente en un medio alcalino (Pérez & Martínez, 1994).

Las giberelinas se encuentran en grandes cantidades en órganos jóvenes de las plantas, especialmente en los puntos de crecimiento del vegetal y en las hojas jóvenes en proceso de expansión. Su desplazamiento se debe a un transporte pasivo a través del floema (Salisbury & Ross, 1994).

Los efectos más relevantes de las giberelinas son: retraso en la maduración de los frutos, inducción del alargamiento de entrenudos en tallos, inducción de la partenocarpia en algunas especies frutales, germinación de semillas, aumento en el porcentaje de flores masculinas y juvenilidad (Pérez & Martínez, 1994).

1.4.3.1.5 Otros reguladores de crecimiento

1.4.3.1.5.1 Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es la última hormona vegetal descubierta. Se caracteriza por inhibir muchos fenómenos de crecimiento en las plantas superiores. Es un compuesto derivado del ácido mevalónico por una serie de reacciones bien conocidas. La biosíntesis del ABA tiene lugar en frutos, semillas, hojas raíces y tallos (Salisbury & Ross, 1994).

Es un hecho que en las hojas se produce un aumento considerable en la producción de ABA como respuesta a una situación de déficit hídrico (Pérez & Martínez, 1994).

Desde los lugares donde es producido, el ABA se transporta rápidamente a toda la planta a través del xilema y el floema. Sus efectos participan en la regulación de la apertura estomática, dormición de yemas y semillas, abscisión de hojas y frutos, inhibición del crecimiento de hojas y raíces e interacciona con las auxinas en los diferentes procesos relacionados con el crecimiento vegetal (Pérez & Martínez, 1994).

1.4.3.1.5.2 Etileno

Es la única hormona vegetal conocida, hasta el momento, que se presenta en estado gaseoso en condiciones normales de presión y temperatura. La mayor cantidad de etileno se produce en las flores y frutos (Pérez & Martínez, 1994)

El etileno está relacionado con la senescencia y abscisión de las hojas, así como con la maduración de algunos frutos, la estimulación del crecimiento de raíces, inhibición del transporte de auxinas, estimulación de la síntesis de algunas enzimas, inducción de la maduración de frutos climatéricos e eliminación de la dormición de yemas (Salisbury & Ross, 1994).

1.4.3.2 Factores Químicos

Para mantener la viabilidad de un cultivo *in vitro*, estimular su diferenciación y guiar su crecimiento, éste requiere de una dieta balanceada de nutrientes. Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas que permiten el desarrollo óptimo de especies vegetales.

Sus ingredientes principales son: sales inorgánicas (minerales), carbohidratos, vitaminas, aminoácidos y agentes gelificantes.

1.4.3.2.1 Sales inorgánicas

Los esfuerzos realizados para optimizar las necesidades de las especies vegetales, han dado como resultado numerosas formulaciones de sales inorgánicas. Sin embargo, los elementos esenciales que forman parte de la mayoría de fórmulas son: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Azufre (S), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Hierro (Fe) (Esquivel & Escalant, 1994).

Además de estos elementos, existen algunos elementos menores, que son importantes pero que se requieren en cantidades pequeñas: Boro (B), Molibdeno (Mo), Manganeso (Mn), Cobalto (Co), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Cloro (Cl) y Iodo (I) (Esquivel & Escalant, 1994).

Una de las formulaciones de sales más usadas de es la descrita por Murashige y Skoog (1962) conocida como formulación MS (Tabla 1.2). La característica principal de ésta es el alto contenido de nitrato, potasio y amonio en comparación con otras formulaciones.

Tabla 1.2 Composición de cinco sales inorgánicas en la formulación Murashige y Skoog (Smith, 2000).

Sales inorgánicas	Concentración (g.L ⁻¹ stock)
Stock de nitrato	
NH ₄ NO ₃	165
KNO ₃	190
Stock de sulfato	
MgSO ₄ .7H ₂ O	37
MnSO ₄ .H ₂ O	1,69
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025
Stock de PBMo	
KH ₂ PO ₄	17
H ₃ BO ₃	0,62
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
Stock de NaFeEDTA	
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,784
Na ₂ EDTA	3,724
Stock de KCl	
CaCl ₂ .2H ₂ O	44
KI	0,083
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025

1.4.3.2.2 Carbohidratos

Sustancias orgánicas como los azúcares que proveen tres elementos relevantes: Hidrógeno (H), Carbono (C) y Oxígeno (O) (Esquivel & Escalant, 1994).

Células vegetales en cultivo *in vitro* no son fotosintéticamente activas y requieren una fuente de carbono. La sucrosa o glucosa al 2- 5% (p/v) son comúnmente utilizadas en esta técnica. Bajas concentraciones de carbohidratos pueden ser usados en cultivo de protoplastos y altas concentraciones pueden ser usados en embriogénesis (Smith, 2000).

1.4.3.2.3 Vitaminas

Las vitaminas tienen funciones catalíticas en reacciones enzimáticas. La vitamina más importante en el cultivo de tejidos vegetales es la tiamina (B_1). Otras vitaminas como el ácido nicotínico, biotina y piridoxina son añadidas a los medios de cultivo para mejorar la respuesta celular (Smith, 2000).

1.4.3.2.4 Aminoácidos

Aminoácidos y aminos con importantes en la morfogénesis vegetal. Todas las formas L de los aminoácidos son detectadas de manera natural por las especies vegetales. Por ejemplo: L – tirosina contribuye a la formación brotes, L- arginina facilita el enraizamiento y L- serina es utilizada para obtener embriones haploides (Smith, 2000).

Hoy en día es usual analizar de manera individual a los aminoácidos con el fin de obtener respuestas específicas (Smith, 2000).

Otros compuestos orgánicos comúnmente utilizados son el inositol, adenina, sulfato de adenina, ácido cítrico y ascórbico; éstos dos últimos para evitar la oxidación de los tejidos vegetales (Esquivel & Escalant, 1994).

1.4.3.2.5 Agentes gelificantes

Actúa como agente de soporte en el medio de cultivo, brindando dureza y forma al mismo. El agar es el agente gelificante más utilizado en el proceso de micropropagación vegetal derivado de algas marinas (Esquivel & Escalant, 1994).

Varios estudios indican que el tipo y la concentración de los agentes gelatinizadores pueden afectar sustancialmente la efectividad de varios sistemas de cultivo como el cultivo de protoplastos y anteras. Fitigel y gelrite son agentes gelificantes con apariencia transparente producto de la fermentación por varias especies de *Pseudomonas* (Esquivel & Escalant, 1994).

1.4.3.3 Factores Físicos

Los factores físicos juegan un papel importante dentro del proceso de micropropagación vegetal; temperatura, luz y pH han sido los factores físicos más estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 – 28 °C. Se han variado los regímenes de temperatura en el día y en la noche y sólo pocas especies presentan variaciones ventajosas (Roca & Mroginsky, 1993).

La luz es un factor fundamental en el proceso de morfogénesis. El papel de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como la intensidad, el fotoperíodo y la calidad. El espectro útil para las especies vegetales varía de 400 – 700 nanómetros, razón por la cual se recomienda mantener un espectro de luz adecuado (Esquivel & Escalant, 1994).

En el caso del pH, el grado de acidez o alcalinidad, es importante y específico para cada tipo de especie vegetal. Al igual que ocurre en el suelo, el pH debe mantenerse en un rango de 5,2 – 5,9 con el fin de mantener un desarrollo vegetativo óptimo (Roca & Mroginsky, 1993).

1.4.3.4 Etapas de la micropropagación

La regeneración de plantas *in vitro* presenta cuatro etapas principales:

- 1) Establecimiento del cultivo *in vitro*
- 2) Multiplicación *in vitro*
- 3) Enraizamiento
- 4) Aclimatación de las plántulas.

Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. Es importante considerar una etapa previa (Etapa 0), en la cual se preparan los explantes para el establecimiento (Olmos & Luciani, 2005).

1.4.3.4.1 Preparación del material vegetal

Explantes que se encuentran expuestos a patógenos externos e internos pueden presentar altos índices contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro*.

Para obtener estos explantes es recomendable tratar químicamente las plantas madre, es decir, plantas donadoras, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas, controlando la nutrición y riego para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Henderson *et al.*, 2001).

Por otro lado, la época del año en que se colecta el material juega un papel importante en la desinfección de los mismos. Las épocas lluviosas aumentan la formación de hongos y bacterias razón por la cual los procesos de desinfección suelen ser ineficaces.

Para la desinfección se puede utilizar hipoclorito de calcio o sodio, peróxido de hidrógeno, agua de bromo, nitrato de plata y dicloruro de mercurio. Otro método

frecuentemente empleado es el lavado con alcohol al 70% y luego colocarlos en desinfectante (Navarro & Perea, 1996).

1.4.3.4.2 Establecimiento del cultivo *in vitro*

Una vez elegida la planta madre, se extraen los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes realiza una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos.

Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se los debe mantener en condiciones de asepsia (Olmos & Luciani, 2005).

Luego de la desinfección superficial, el material seleccionado se siembre en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo, 2004).

1.4.3.4.3 Multiplicación *in vitro*

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron a las fases anteriores originen brotes (axilares o adventicios). Periódicamente estos nuevos brotes se pueden subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas (Devlin, 1976).

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la

micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Henderson *et al.*, 2001).

1.4.3.4.4 Enraizamiento

Para enraizar los explantes se utilizan plantines individuales de aproximadamente 2 centímetros de largo. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio de cultivo libre de biorreguladores de crecimiento o que sólo contenga auxinas.

Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y 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 (Castillo, 2004).

El enraizamiento *ex vitro* permite que la fase enraizamiento y aclimatación se logren paralelamente, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la evapotranspiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento adecuadas para brindar temperatura y humedad relativa moderadas, que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva (Devlin, 1976).

Bajo condiciones *ex vitro* se utilizan diferentes sustratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales deben estar esterilizados.

1.4.3.4.5 Aclimatación de las plántulas

Los explantes recién enraizados son sensibles a cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso del proceso depende de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufren cambios que permiten la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales (Castillo, 2004).

En el momento en que se extraen los explantes enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que éstos han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada, generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante (Olmos & Luciani, 2005).

Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

1.4.4 Propagación de especies forestales

Tradicionalmente, las especies forestales fueron propagadas vegetativamente mediante el enraizamiento de estacas, de braquiblastos en coníferas, así como también por injertos. La propagación por estacas de *Cryptomeria japonica* (kiri), *Populus* (álamo) y *Salix* (sauce) ha sido llevada a cabo durante siglos en Asia y Europa. Sin embargo, para la mayoría de los árboles propagados por estacas se observa una rápida pérdida de capacidad de rizogénesis al aumentar la edad de la planta donante de las estacas (Reyes & Hewstone, 1994).

En este sentido, una de las principales ventajas de la micropropagación es la capacidad potencial de desarrollar protocolos de multiplicación optimizados para multiplicar árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores (Reyes & Hewstone, 1994).

1.5 Sistema de hipótesis

Los tratamientos más efectivos evaluados en cada una de las fases actúan positivamente para la determinación del protocolo de establecimiento y multiplicación *in vitro* de Quishuar a partir de yemas axilares de plantas madre.

CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Fase de campo

2.1.1 Ubicación geográfica del vivero

El vivero se encuentra dentro de las instalaciones de la Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas (EPMMOP) situado en el nororiente del Distrito Metropolitano de Quito (Provincia de Pichincha) sector Cununyacu con Latitud 0°17'44" S y Longitud 78°27'85" W a una altura de 2.300 m.s.n.m.

2.1.1.1 Plantas madre de vivero

La especie forestal utilizada en este proyecto es Quishuar (*Buddleja incana*), comúnmente conocida como "Quishuara". Las plantas madre de dos años de edad pertenecen al vivero de la Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas (EPMMOP). Éstas fueron seleccionadas y ubicadas en lotes de 0.70 m x 1.25 m identificados de acuerdo a su nombre común, familia, especie y sitio de origen (Fig.2.1).



Figura 2.1 Plantas madre de Quishuar pertenecientes al vivero de la EPMMOP.

2.1.1.2 Tratamiento preliminar

Las plantas madre de dos años de edad fueron tratadas previamente con el fin de eliminar la mayor cantidad de agentes patógenos y mantener el buen estado de los lotes durante todo el proyecto. Se utilizaron dos tipos de fungicidas (Kocide y Mancozeb) y un fertilizante foliar (Kristalón). Los primeros fueron alternados a razón de 1 g.L⁻¹ cada dos semanas. El fertilizante foliar fue usado cada dos semanas en la misma dosis que los fungicidas. La aplicación de estos productos se realizó mediante aspersión durante las horas de la mañana.

2.1.1.3 Selección de explantes

Quishuar presenta un gran número de yemas vegetativas. Este es el explante más utilizado en propagación *in vitro* debido a la inducción de respuestas morfológicas, como la división celular y el crecimiento vegetativo. En este proyecto se seleccionaron yemas axilares. Éstas son las más numerosas en esta especie, presentan un tamaño adecuado y alto índice de brotación (Fig.2.2).



Figura 2.2 Cuatro yemas axilares (YAX) una yema apical (YAP) de tallos jóvenes de Quishuar.

2.1.1.4 Corte de explantes

Los brotes fueron cortados transversalmente desde su base. Las hojas fueron separadas de los brotes mediante cortes laterales en la base. Se separaron las yemas axilares a través de cortes laterales en la parte superior e inferior (Fig.2.3). En todos estos procedimientos se usaron hojas de bisturí # 22 sumergidas en alcohol al 70% para evitar otras fuentes de contaminación.



Figura 2.3 Yemas axilares cortadas, cada una con aprox. 3 cm de longitud.

2.2 Fase de laboratorio

2.2.1 Ubicación geográfica del laboratorio

El Laboratorio de Micropropagación de la EPMMOP (Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas de Quito) se encuentra situado en el nororiente del Distrito Metropolitano de Quito (Provincia de Pichincha) Sector Cununyacu con Latitud $0^{\circ}13'59''S$ y Longitud $78^{\circ}25'70''W$ a una altura de 2.300 m.s.n.m.

2.2.2 Período de investigación

El período de investigación se extendió desde Enero 2010 hasta Noviembre 2010.

2.2.3 Desinfección de explantes

Se desarrolló el protocolo de desinfección con yemas axilares extraídas de plantas madre seleccionadas de vivero de dos años de edad previamente tratadas. Éste permitió obtener la mayor cantidad de explantes libres de contaminantes microbianos exógenos y un alto porcentaje de supervivencia.

En esta etapa se realizaron las siguientes actividades: las yemas axilares de Quishuar fueron depositadas en recipientes plásticos ETA. A continuación, se prepararon tres lavados con agua potable durante diez minutos y posteriormente se añadió agua destilada y detergente para realizar tres lavados continuos en agitación durante 10 minutos utilizando planchas eléctricas Bearnetead (USA) con agitadores magnéticos (Fig.2.4)



Figura 2.4 Lavado de explantes con detergente en agitación constante.

Se añadió alcohol al 70% durante 1 minuto en agitación constante, y finalmente se realizaron cuatro tratamientos con hipoclorito de sodio en concentraciones y tiempos diferentes proporcionados por la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Tratamientos utilizados en la fase de desinfección de explantes.

Concentración Cloro (%) + Tween 20	Tiempo (minutos)	
	10	15
1.5	T1	T2
2	T3	T4

En esta etapa del proyecto los explantes fueron sembrados en medios de cultivo MSVG y MSVG/2. Éstos fueron seleccionados a través de ensayos anteriores los cuales demostraron el mayor porcentaje de supervivencia y crecimiento vegetativo. Cada tratamiento utilizó 10 unidades experimentales con 3 repeticiones por cada medio de cultivo.

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizó el medio MSVG Sigma-Aldrich, sucrosa grado I, agar Sigma, agua destilada y vasos de precipitación de 1000 ml BOECO. Se utilizó el peachímetro digital Jenway (England) cuyo valor óptimo alcanzado fue de 5.8. El medio fue calentado en horno microondas hasta alcanzar su punto de ebullición. Éste fue dispensado en tubos de ensayo IVA de 16 x 1.60 cm. Finalmente, los tubos de ensayo junto con el medio de cultivo fueron esterilizados durante 1 hora en autoclave vertical Trident EA-632.

Las variables evaluadas en esta primera fase fueron: Porcentaje de contaminación, porcentaje de descarte y número de explantes vivos (% supervivencia). Éstas indicaron el número de explantes que pasaron a la siguiente fase de acuerdo al tratamiento y medio de cultivo empleado.

A continuación, cada uno de los porcentajes de contaminación, descarte y supervivencia fueron evaluados mediante observación de explantes contaminados, vivos y

mueritos cada siete días. Éstos fueron contados y presentados a través de valores porcentuales de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Contaminación} = (\text{Exp. contaminados} * 100) / \text{Total explantes}$$

$$\% \text{ Descarte} = (\text{Exp. mueritos} * 100) / \text{Total explantes}$$

$$\% \text{ Supervivencia} = (\text{Exp. vivos} * 100) / \text{Total explantes}$$

El mejor tratamiento fue elegido en base a los resultados obtenidos de cada una de las variables.

El análisis estadístico para los ensayos de desinfección consistió en tablas de contingencia, que determinaron el éxito (1) o fracaso (0) de los diferentes tratamientos, para cada una de las variables. A continuación se realizó un conteo de los resultados los cuales fueron expresados en forma gráfica con valores proporcionales.

2.2.4 Establecimiento *in vitro* de explantes

Una vez definido cual es el mejor tratamiento de desinfección (mayor porcentaje de supervivencia), se procedió al establecimiento *in vitro* del explante, el cual se sembró en medio MSVG y MSVG/2 junto con el regulador de crecimiento BAP en concentraciones de: 0; 2,5; 5 y 7,5 μM (Tabla 2.2)

Tabla 2.2 Diferentes tratamientos con BAP en la fase de establecimiento *in vitro* de explantes.

	BAP μM (mg.L⁻¹)			
Medio Cultivo	0 (0)	2,5 (0,56)	5 (1,12)	7,5 (1,68)
MSVG	T1	T2	T3	T4
MSVG ½	T5	T6	T7	T8

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizó el medio MSVG Sigma-Aldrich, sucrosa grado I, agar Sigma, biorregulador BAP Sigma- Aldrich, agua destilada y vasos de precipitación de 1000 ml BOECO. Se utilizó el peachímetro digital Jenway (England) cuyo valor óptimo alcanzado fue de 5.8. El medio fue calentado en horno microondas hasta alcanzar su punto de ebullición. Éste fue dispensado en tubos de ensayo IVA de 16 x 1.60 cm. Finalmente, los tubos de ensayo junto con el medio de cultivo fueron esterilizados durante 1 hora en autoclave vertical Trident EA-632.

A continuación, se realizó la siembra de los explantes en cada uno de los medios de cultivo de manera aséptica en una cámara de flujo laminar Streamline (Singapur), utilizando alcohol al 70% para la desinfección de materiales dentro de la misma.

Pinzas y mangos de bisturí fueron previamente envueltos en papel aluminio y esterilizados en autoclave horizontal Tuttnauer 2540M durante 40 minutos. Estos materiales fueron abiertos dentro de cámara para evitar fuentes externas de contaminación y ubicados en frascos de vidrio con alcohol al 70% para desinfección constante.

Posteriormente, se realizaron tres lavados a los explantes dentro de cámara con agua destilada estéril los cuales fueron colocados en frascos de vidrio de 500 ml autoclavados con anterioridad (Fig. 2.5).



Figura 2.5 Lavado de explantes dentro de la cámara de flujo laminar.

En esta etapa del proyecto los explantes fueron sembrados en medios de cultivo MSVG y MSVG/2 con diferentes dosis de BAP. Estas dosis de BAP fueron probadas en ensayos anteriores, mostrando un mayor índice de crecimiento en comparación con otros biorreguladores. Cada uno de los 8 tratamientos realizados consistieron de 10 unidades experimentales con 3 repeticiones por cada medio de cultivo.

Las variables evaluadas en esta segunda fase fueron: Porcentaje de contaminación, longitud de brotes (mm), número de yemas basales por brote e índice de brotación. Estas variables fueron indispensables para determinar el crecimiento vegetativo y número de brotes en cada uno de los tratamientos.

En el caso del porcentaje de contaminación, su evaluación se realizó mediante la observación de explantes contaminados. Éstos fueron contados y presentados a través de valores porcentuales de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Contaminación} = (\text{Exp. contaminados} * 100) / \text{Total explantes}$$

La longitud de brotes fue medida con una regla milimetrada desde la inserción del brote hacia la base. Este valor fue tomado cada siete días y su resultado se presentó de acuerdo a los valores obtenidos (Fig.2.6).

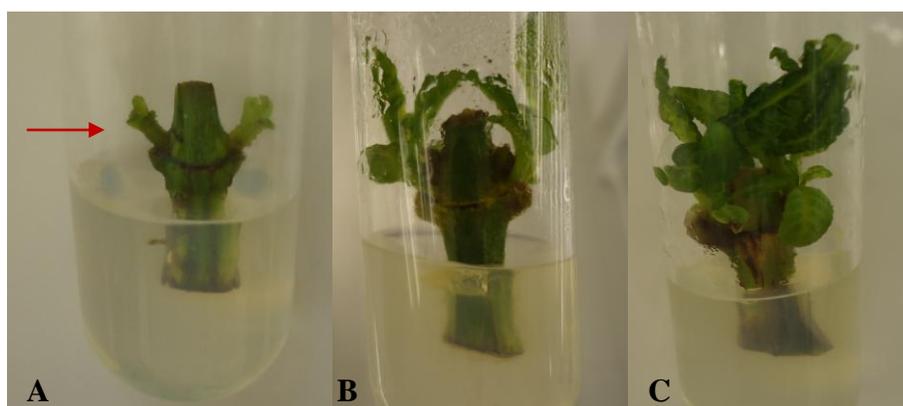


Figura 2.6 Variación en la longitud de brotes durante la fase de establecimiento *in vitro* A) siete días B) catorce días y C) veintiún días después de la fase de desinfección.

En cuanto al número de yemas basales, éstas fueron contadas desde su formación en la yema axilar cada siete días y sus resultados fueron presentados de acuerdo a los valores obtenidos previamente.

El índice de brotación fue medido de acuerdo al número de nudos y la distancia entre cada uno según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice Brotación} = (\text{Número de nudos} / \text{Distancia entre nudos})$$

Finalmente, el análisis estadístico para los diferentes tratamientos de la fase de establecimiento *in vitro* consistió en un diseño experimental completamente al azar (DCA), dado por ocho tratamientos con diferentes concentraciones de BAP. Después se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el software SPSS donde se aplicó SNK al 0.05% para separación de medias.

2.2.5 Multiplicación *in vitro* de explantes

En esta fase se utilizaron diferentes concentraciones de BAP (5, 10 y 15 μM) y KIN (5, 10 y 15 μM) proporcionados por las tablas 2.3 y 2.4 respectivamente, con el propósito de comparar la eficacia de ambos biorreguladores al producir brotes a partir de explantes establecidos previamente. A continuación, se colocaron en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad.

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizó el medio MSVG Sigma-Aldrich, sucrosa grado I, agar Sigma, biorregulador BAP Sigma-Aldrich, biorregulador KIN Sigma-Aldrich, agua destilada y vasos de precipitación de 1000 ml BOECO. Se utilizó el peachímetro digital Jenway (England) cuyo valor óptimo alcanzado fue de 5.8. El medio fue calentado en horno microondas hasta alcanzar su punto de ebullición. Éste fue dispensado en frascos de vidrio. Finalmente, los tubos de ensayo junto con el medio de cultivo fueron esterilizados durante 1 hora en autoclave vertical Trident EA-632.

Tabla 2.3 Tratamientos realizados con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

	BAP μM (mg.L⁻¹)		
Medio Cultivo	5 (1,12)	10 (2,25)	15 (3,37)
MSVG	T1	T2	T3
MSVG ½	T4	T5	T6

Tabla 2.4 Tratamientos realizados con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

	KIN μM (mg.L⁻¹)		
Medio Cultivo	5 (1,12)	10 (2,25)	15 (3,37)
MSVG	T1	T2	T3
MSVG ½	T4	T5	T6

En el caso de los ensayos con Brassinolida se realizaron diferentes concentraciones (0,4; 0,8 y 1,2 ppm) debido a las características del producto. Los datos y resultados se determinaron de manera independiente con relación a los otros ensayos realizados en esta etapa (Tabla 2.5)

Tabla 2.5 Tratamientos independientes realizados con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

	BRS (ppm)		
Medio Cultivo	0,4	0,8	1,2
MSVG	T1	T2	T3
MSVG ½	T4	T5	T6

En esta etapa final del proyecto los brotes obtenidos en la fase anterior fueron sembrados en medios de cultivo MSVG y MSVG/2 con diferentes dosis de BAP, KIN y BRS respectivamente. Dosis previas de BAP y KIN fueron probadas en ensayos anteriores, mostrando un mayor índice de brotación en comparación con otros biorreguladores. Cada uno de los 6 tratamientos realizados por biorregulador consistieron de 10 unidades experimentales con 3 repeticiones por cada medio de cultivo.

En el caso de BRS, las dosis utilizadas fueron obtenidas por bibliografía de ensayos *ex vitro* aplicadas por aspersión. Cada uno de los 6 tratamientos realizados consistieron de 10 unidades experimentales con 3 repeticiones por cada medio de cultivo.

Las variables evaluadas en esta fase final fueron: Porcentaje de contaminación, longitud de los brotes (mm), número de brotes por explante e índice de brotación. Estas variables fueron indispensables para determinar el número de brotes en cada uno de los tratamientos.

En el caso de las variables, el porcentaje de contaminación fue evaluado mediante observación de explantes contaminados. Éstos fueron contados y presentados a través de valores porcentuales de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Contaminación} = (\text{Exp. contaminados} * 100) / \text{Total explantes}$$

La longitud de brotes fue medida con una regla milimetrada desde la inserción del brote hacia la base. Este valor fue evaluado cada siete días y su resultado se presentó de acuerdo a los valores obtenidos.

El número de brotes por explante fue numerado mediante observación cada siete días y sus resultados fueron presentados de acuerdo a los valores obtenidos.

El índice de brotación se midió de acuerdo al número de nudos y la distancia entre cada uno según la siguiente fórmula:

Índice Brotación = (Número de nudos/ Distancia entre nudos)

El análisis para las pruebas de multiplicación consistió en un diseño experimental completamente al azar (DCA), dado por seis tratamientos con biorreguladores (BAP y KIN) respectivamente.

Los tratamientos con brassinólida (BRS) tuvieron concentraciones diferentes y sus resultados fueron independientes a los ensayos con biorreguladores. A continuación se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el software SPSS donde aplicamos SNK al 0.05% para separación de medias.

CAPITULO 3: RESULTADOS

3.1. Fase I: Desinfección de explantes

En esta primera etapa se utilizaron cuatro tratamientos de desinfección T1 (1,5% cloro y 10 min), T2 (1,5% cloro y 15 min), T3 (2% cloro y 10 min) y T4 (2% cloro y 15 min) con variaciones en el tiempo de exposición y concentración de cloro. Los explantes desinfectados fueron sembrados en MSVG y MSVG/2. Los resultados mostraron altos índices de supervivencia y bajos porcentajes de mortalidad en ambos medios de cultivo para cada tratamiento (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Porcentajes de supervivencia y mortalidad para MSVG y MSVG/2 de acuerdo a cada tratamiento.

Variables	Mortalidad (%)		Supervivencia (%)	
	MSVG	MSVG/2	MSVG	MSVG/2
1 (1,5% Cl - 10')	43,3	46,7	56,7	53,3
2 (1,5% Cl - 15')	36,7	36,7	63,3	63,3
3 (2,0% Cl - 10')	33,3	33,3	66,7	66,7
4 (2,0% Cl - 15')	30,0	23,3	70,0	76,7

Los resultados muestran que el tratamiento 4 presentó el porcentaje más bajo de mortalidad para MSVG (30%) y MSVG/2 (23,3%) mientras que el tratamiento 1 estableció los valores más altos (43,3%) y (46,7%) para ambos medios de cultivo respectivamente. Los tratamientos 2 y 3 presentaron porcentajes similares (36,7%) y (33,3%) para los medios evaluados anteriormente (Figura 3.1)

Los medios de cultivo MSVG y MSVG/2 fueron evaluados mediante un análisis de varianza (Tabla 3.2) para la variable mortalidad. El valor p de la prueba no fue significativo (0,89). Es probable que la mortalidad de los explantes no esté relacionada con los medios de cultivo, ya que tanto MSVG como MSVG/2 son estadísticamente iguales.

Tabla 3.2 Análisis de varianza para la variable mortalidad en la fase de desinfección.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F	Significación
Tratamientos	1,36	1	0,02	0,89
Error	376,51	6		
Total	377,87	7		

En el caso de la variable supervivencia, el tratamiento 4 estableció el valor más alto para MSVG (70,0%) y MSVG/2(76,7%). El tratamiento 2 presentó porcentajes iguales para ambos medios de cultivo (63,3%). Finalmente, el tratamiento 1 determinó un 56,7% para MSVG y un 53,3% para MSVG/2, siendo éstos los porcentajes más bajos con relación a esta variable (Figura 3.1 y Tabla 3.1)

Se realizó un análisis de varianza (Tabla 3.3) para la variable supervivencia. El valor bajo de significancia (0,86) que se encontró para MSVG y MSVG/2 determinó que la supervivencia de yemas axilares es independiente con respecto a los medios de cultivo evaluados.

Tabla 3.3 Análisis de varianza para la variable supervivencia en la fase de desinfección.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F	Significación
Tratamientos	1,39	1	0,021	0,86
Error	367,51	6		
Total	379,87	7		

Al evaluar la variable mortalidad se observaron valores entre el 23,3 y 46,7% para MSVG. En el caso de MSVG/2 los porcentajes de contaminación estuvieron entre 30 y 43,3%. Los valores para supervivencia estuvieron entre el 53,3 y 76,7 para ambos medios de cultivo (Figura 3.1).

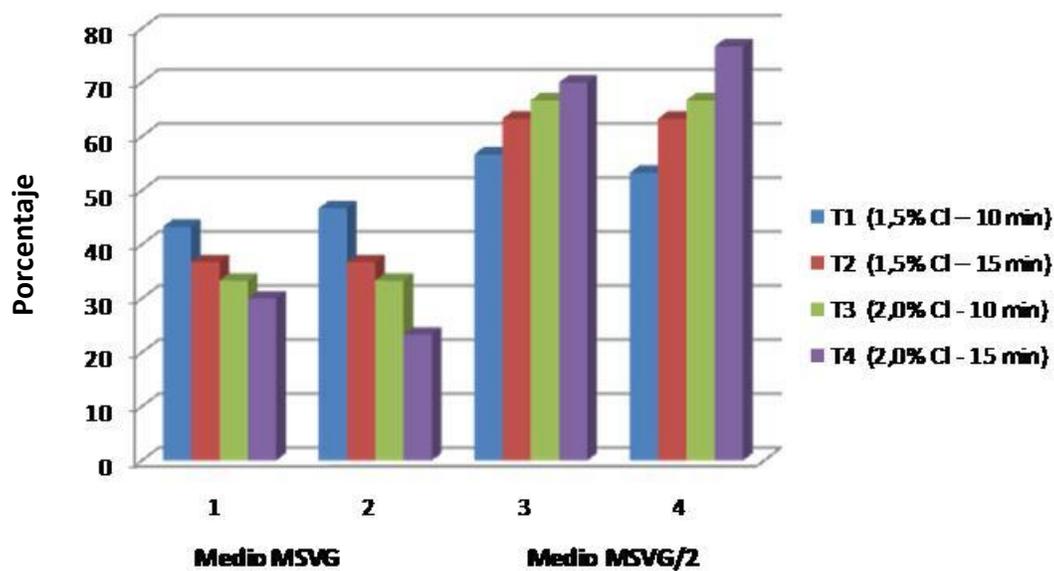


Figura 3.1 Porcentajes de mortalidad y supervivencia de acuerdo a los tratamientos de desinfección.

De manera general, los resultados de las variables mortalidad y supervivencia, muestran altos índices de supervivencia y bajos porcentajes de mortalidad tanto para el medio MSVG y MSVG/2 (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Porcentajes globales de mortalidad y supervivencia con relación a los medio de cultivo MSVG/2 y MSVG.

Medio de Cultivo	Mortalidad	Supervivencia
Medio MSVG	43 35,8%	77 64,2%
Medio MSVG/2	42 35,0%	78 65,0%

Se observa que el medio MSVG/2 presentó el porcentaje más bajo de mortalidad (35,0%) y el valor más alto de supervivencia (65,0%). En el caso de MSVG, el índice de mortalidad (35,8%) y supervivencia (64,2%) establecieron valores matemáticamente

similares a MSVG/2, razón por la cual se determinó que ambos medios de cultivo son iguales para ambas variables (Figura 3.2).

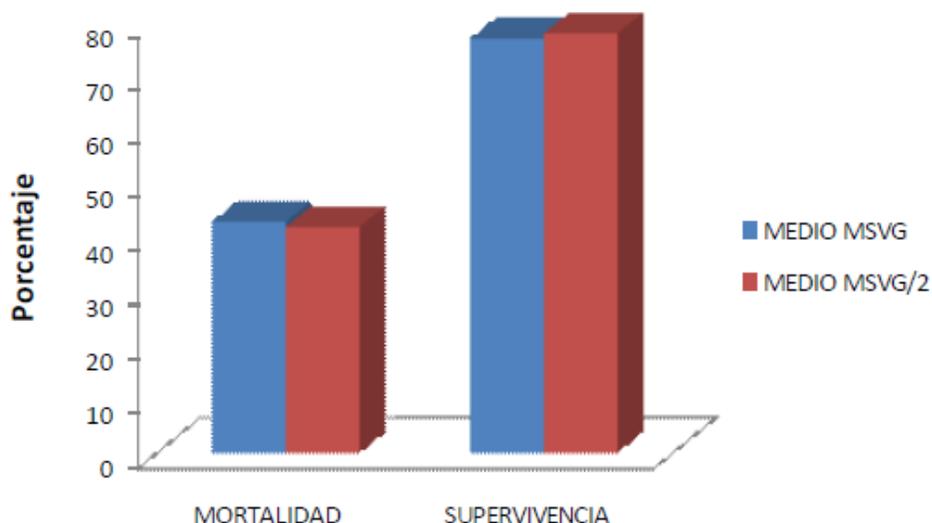


Figura 3.2 Porcentajes globales de mortalidad y supervivencia de acuerdo a los medios de cultivo MSVG y MSVG/2.

Se evaluó el porcentaje de contaminación (hongos, bacterias) (Tabla 3.5), porcentaje de descarte y supervivencia (Tabla 3.6), de acuerdo a cada tratamiento y medio de cultivo con el fin de obtener los valores totales de cada una de las variables en esta primera etapa.

Los datos estadísticos de las variables contaminación fúngica y bacteriana mediante la prueba chi cuadrado y análisis de varianza establecieron valores altos de significancia (0,027) y (0,001) respectivamente, lo que señala que los tratamientos en ambos medios de cultivo influyen en la contaminación (hongos y bacterias) (Tabla 3.5)

Tabla 3.5 Prueba Chi- cuadrado y análisis de varianza para contaminación fúngica y bacteriana en la fase de desinfección de explantes.

	Contaminación fúngica	Contaminación bacteriana
Chi-cuadrado de Pearson	9,97	8,45
Grados de libertad	3	3
Sig. Asintótica	0,027	0,001
F	7,071	6,393
Probabilidad	0,031	0,017

Con respecto a los porcentajes de contaminación fúngica en MSVG/2 y MSVG se observaron valores entre el 10 y 26,7% de los explantes desinfectados, mientras que los índices de contaminación bacteriana estuvieron entre el 3,3 y 16,7% para MSVG y MSVG/2 respectivamente (Figura 3.3 y Tabla 3.6).

Tabla 3.6 Porcentajes totales de contaminación de los tratamientos de desinfección.

Variables	Contaminación hongos (%)		Contaminación Bacterias (%)	
	MSVG	MSVG/2	MSVG	MSVG/2
1 (1,5% CI – 10')	20	26,7	13,3	16,7
2 (1,5% CI – 15')	26,7	23,3	3,3	10
3 (2,0% CI - 10')	26,7	23,3	3,3	10
4 (2,0% CI - 15')	26,7	10	3,3	6,7
Promedio	25,0	20,85	5,80	10,85

Si analizamos el medio MSVG, el tratamiento 1 (1,5% CI – 10') mostró el porcentaje más bajo de contaminación fúngica (20%) con relación a los otros tratamientos cuyos porcentajes (26,7%) fueron iguales para esta variable (Figura 3.3).

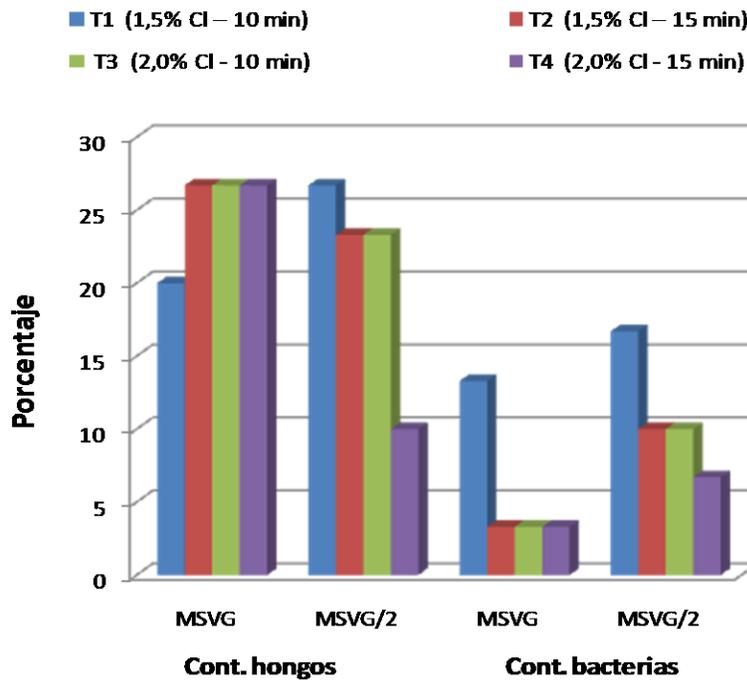


Figura 3.3 Porcentajes de contaminación fúngica y bacteriana de acuerdo a los tratamientos de desinfección

En el caso de MSVG/2, el tratamiento 4 (2,0% Cl - 15') presentó el porcentaje más bajo de contaminación fúngica (10%) mientras que el tratamiento 1 estableció el valor más alto de contaminación por hongos (26,7%). No se observó supervivencia de los explantes contaminados.

El tratamiento 4 estableció un valor de 3,3% para el medio MSVG y un 6,7% para MSVG/2 con relación a la variable contaminación bacteriana. Ambos porcentajes fueron los más bajos comparándolos con el tratamiento 1 (1,5% Cl - 10') cuyos valores fueron los más altos para los medios de cultivo analizados. Los tratamientos 2 (1,5% Cl - 15') y 3 (2,0% Cl - 10') presentaron porcentajes de 3,3% y 10% en MSVG y MSVG/2 (Tabla 3.3 y Figura 3.4).

Los índices de descarte y supervivencia fueron analizados estadísticamente al igual que las variables de contaminación. El medio MSVG mostró que el tratamiento 4 presentó un 0% de descarte, siendo éste el más efectivo de todos los tratamientos utilizados para esta variable. Los tratamientos 1 y 2 mostraron los valores más altos (10%) y (6,7%) respectivamente (Tabla 3.6).

La prueba chi cuadrado y análisis de varianza determinaron valores bajos de significancia (0,3) para la variable descarte y (0,14) para supervivencia de los explantes. La baja significancia que se encontró en las pruebas estadísticas indica que los cuatro tratamientos y medios de cultivo no influyen en las variables analizadas (Tabla 3.7)

Tabla 3.7 Prueba Chi- cuadrado y análisis de varianza para descarte y supervivencia en la fase de desinfección de explantes.

	Descarte	Supervivencia
Chi-cuadrado de Pearson	6,88	4,06
Grados de libertad	3	3
Sig. Asintótica	0,3	0,14
F	0,400	0,230
Probabilidad	0,530	0,880

Analizando el medio de cultivo MSVG/2 el tratamiento 3 (2,0% CI - 10') mostró 0% de descarte. Sin embargo, el tratamiento 4 evidenció el mayor porcentaje de descarte (6,7%). Los tratamientos 1 (1,5% CI - 10') y 2 (1,5% CI - 15') obtuvieron valores iguales (3,3%) para esta variable. Estos datos fueron los más bajos en relación con la contaminación y supervivencia (Figura 3.4 y Tabla 3.8).

Tabla 3.8 Porcentajes totales de descarte y supervivencia de los tratamientos de desinfección.

Variables	Descarte (%)		Supervivencia (%)	
	MSVG	MSVG/2	MSVG	MSVG/2
1 (1,5% CI – 10')	10	3,3	56,7	53,3
2 (1,5% CI – 15')	6,7	3,3	63,3	63,3
3 (2,0% CI - 10')	3,3	0	66,7	66,7
4 (2,0% CI - 15')	0	6,7	70	76,7
Promedio	5,0	3,33	64,20	65,0

Referente a los índices de supervivencia, el tratamiento 4 (2,0% CI - 15') para MSVG y MSVG/2 determinó que el 70% y 76,7% de los individuos sobrevivieron en ambos medios de cultivo respectivamente, siendo éstos los valores más altos para esta variable. (Tabla 3.8)

El tratamiento 1 estableció los porcentajes más bajos (56,7%) y (53,3%) para MSVG y MSVG/2 respectivamente. Mientras que los tratamientos 2 y 3 mostraron que el 63,3% y 66,7% de los individuos evaluados sobrevivieron en cada uno de los tratamientos para ambos medios de cultivo (Figura 3.4 y Tabla 3.8).

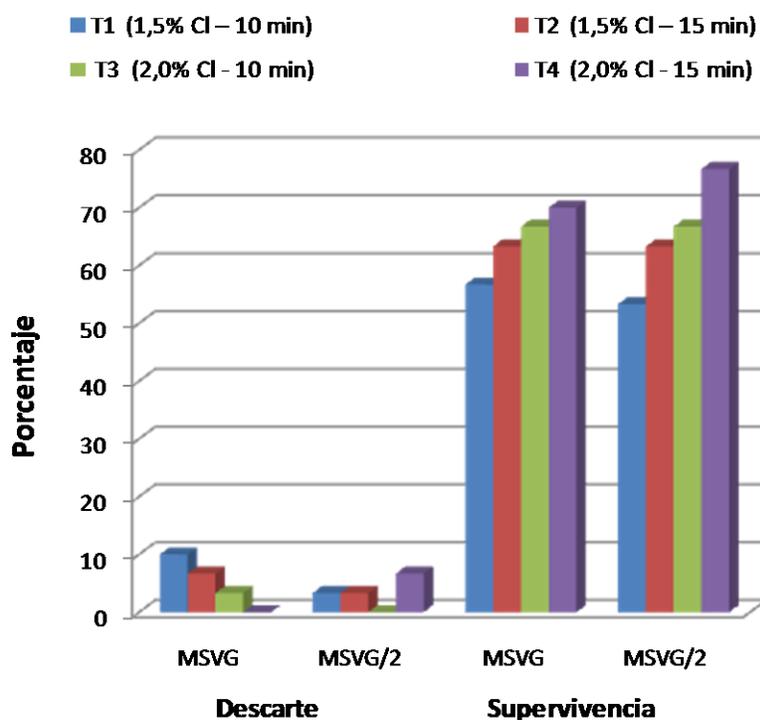


Figura 3.4 Porcentajes de descarte y supervivencia de acuerdo a los tratamientos de desinfección.

3.2. Fase II: Establecimiento *in vitro* de explantes

3.2.1. Longitud de brote

Una vez desinfectados los explantes, éstos fueron establecidos en diferentes concentraciones de BAP (0; 0,56; 1,12 y 1,68 mg/L) correspondientes a las dosis 1, 2, 3 y 4 en el medio 1 (MSVG), para formar los tratamientos 1, 2, 3 y 4. Mientras que las mismas dosis de BAP se aplicaron en el medio 2 (MSVG/2) para formar los tratamientos 5, 6, 7 y 8.

Los brotes laterales de cada uno de los explantes fueron medidos cada siete días. La evaluación de longitud de brote se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (Tabla 3.9). Sus resultados presentan la significancia de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.9 Análisis de varianza para longitud de brotes en la fase de establecimiento *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	11097,07	7	1585,29	2,63	,006
Med_Cul	2442,80	1	2442,80	1,99	,070
Dos_BAP	4999,77	3	1666,59	2,99	,001
Med_Cul*Dos_BAP	4654,50	3	1551,50	2,47	,000
Error	201697,65	165	1222,41		
Total	213794,72	172			

Los resultados muestran que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BAP presenta significancia estadística (0,000) al igual que las dosis de BAP (0,001). Por otro lado, los medios de cultivo no demostraron significancia estadística (0,70) para esta variable.

Al realizar la prueba SNK (Student – Newman Kelus) al 5%¹ se observaron tres rangos de significancia, siendo los tratamientos T5 y T1 aquellos que tenían las dosis más bajas de BAP (0 mg/L) y los valores más altos en promedios de longitud de brotes con respecto a los otros ensayos (Tabla 3.10 y Figura 3.5).

Tabla 3.10 Rangos de significancia para longitud de brote según la prueba SNK al 5% en la fase de establecimiento *in vitro*.

Tratamientos	Codificación	Promedio (mm)	Rango de significancia
T5	M2*D1	13,36	a
T1	M1*D1	13,15	a
T6	M2*D2	12,79	b
T2	M1*D2	10,53	b
T7	M2*D3	10,20	b
T3	M1*D3	9,36	b
T8	M2*D4	7,77	c
T4	M1*D4	6,90	c

¹ Letras iguales indican promedios iguales, según prueba SNK al 5%.

El tratamiento 5 estableció el mejor promedio estadístico (13,36 mm) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 8 y 4 mostraron los promedios más bajos (7,77 mm) y (6,90 mm) con relación a los otros tratamientos (Tabla 3.10 y Figura 3.5).

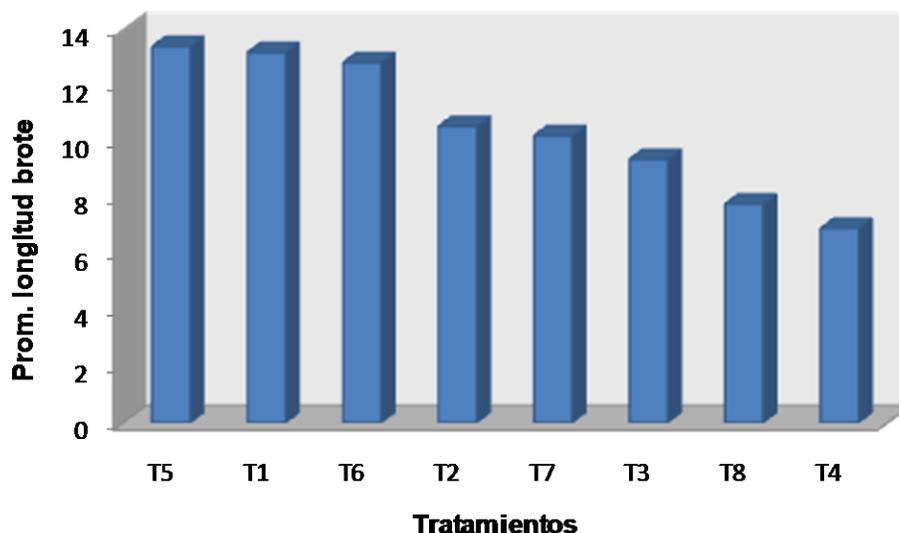


Figura 3.5 Promedios de longitud de brotes de acuerdo a cada tratamiento en la fase de establecimiento *in vitro*.

Si analizamos ambos medios de cultivo con la prueba SNK al 5%, observamos que el medio MSVG/2 (M2) mostró el promedio más alto de longitud de brotes (11,03 mm) en comparación con MSVG (M1) cuyo promedio fue el más bajo (9,99 mm) (Tabla 3.11 y Figura 3.6).

Tabla 3.11 Promedios para longitud de brote en ambos medios de cultivo con la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio (mm)
MSVG	M1	9,99
MSVG/2	M2	11,03

El mejor promedio para la variable longitud de brotes fue determinado por medio de cultivo MSVG (9,99 mm) a diferencia de MSVG/2, cuyo valor (11,03 mm) fue menor para esta variable (Figura 3.9).

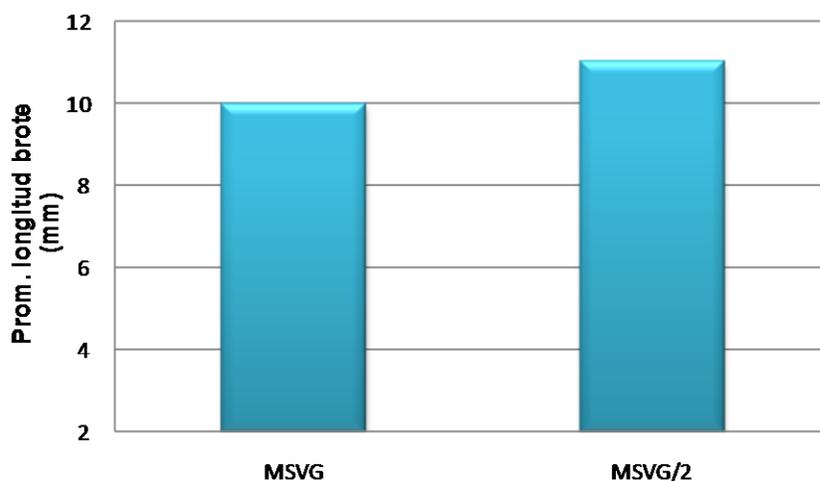


Figura 3.6 Promedios de longitud de brotes para cada medio de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro*.

En el caso de las dosis de BAP, la prueba SNK al 5% estableció tres rangos de significancia donde se observó que la dosis D1 presentó alto promedio de longitud de brotes (0 mg/L) a diferencia de la dosis D4 cuyo valor fue el más bajo (1,68 mg/L) (Tabla 3.12).

Tabla 3.12 Promedios para longitud de brote según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.

Dosis BAP	Codificación	Promedio (mm)	Rango de significancia
0,00 mg/L	D1	13,25	a
0,56 mg/L	D2	11,66	b
1,12 mg/L	D3	10,37	b
1,68 mg/L	D4	7,34	c

La dosis más baja (0 mg/L) mostró mayor longitud de brotes (13,25 mm) en comparación con la dosis más alta del ensayo (1,68 mg/L) cuya longitud fue de 7,34 mm.

Dosis intermedias (0,56 mg/L) y (1,12 mg/L) establecieron promedios iguales para esta variable (Tabla 3.12 y Figura 3.7).

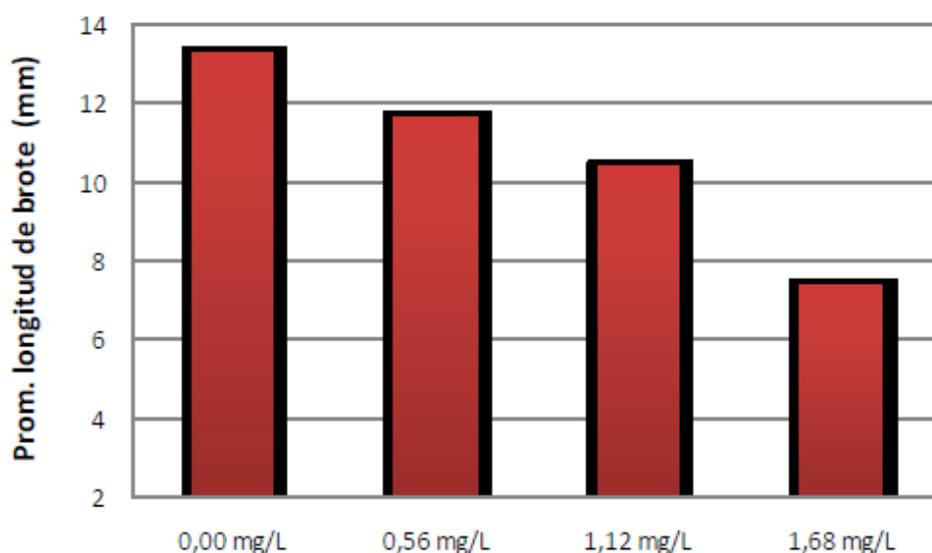


Figura 3.7 Promedios de longitud de brotes para cada dosis de BAP en la fase de establecimiento *in vitro*.

3.2.2. Número de yemas basales por brote

En este caso, se observaron y contaron el número de yemas basales por brote en cada uno de los explantes establecidos cada 7 días. Los resultados se presentan de acuerdo al análisis de varianza (Tabla 3.13) cuyos resultados indican la significancia de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.13 Análisis de varianza para número de yemas basales por brotes en la fase de establecimiento *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	1434,29	7	204,89	1,77	,066
Med_Cul	229,44	1	229,41	1,98	,054
Dos_BAP	634,88	3	272,62	2,35	,002
Med_Cul*Dos_BAP	469,97	3	256,65	2,21	,0013
Error	19097,10	165	115,74		
Total	20431,39	172			

Los datos evaluados para la variable número de yemas basales por brote muestran que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BAP presenta significancia estadística (0,0013) al igual que las dosis de BAP (0,002) analizadas. En esta prueba estadística, los medios de cultivo no señalaron significancia estadística (0,090). Al realizar la prueba SNK al 5% se observaron tres rangos de significancia, siendo los tratamientos T5 y T1 aquellos que tenían las dosis más bajas de BAP (0 mg/L) y el número más alto de yemas basales en relación a otros tratamientos (Tabla 3.14 y Figura 3.8).

Tabla 3.14 Rangos de significancia para número de yemas basales por brote según la prueba SNK al 5% en la fase de establecimiento *in vitro*.

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T5	M2*D1	1,25	a
T1	M1*D1	1,12	a
T6	M2*D2	1,05	b
T2	M1*D2	0,80	b
T7	M2*D3	0,78	b
T3	M1*D3	0,73	b
T8	M2*D4	0,57	c
T4	M1*D4	0,53	c

El tratamiento 5 estableció el mejor promedio estadístico (1,25) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 8 y 4 mostraron los promedios más bajos (0,57) y (0,53) para número de yemas basales por brote con relación a los otros tratamientos (Figura 3.8).

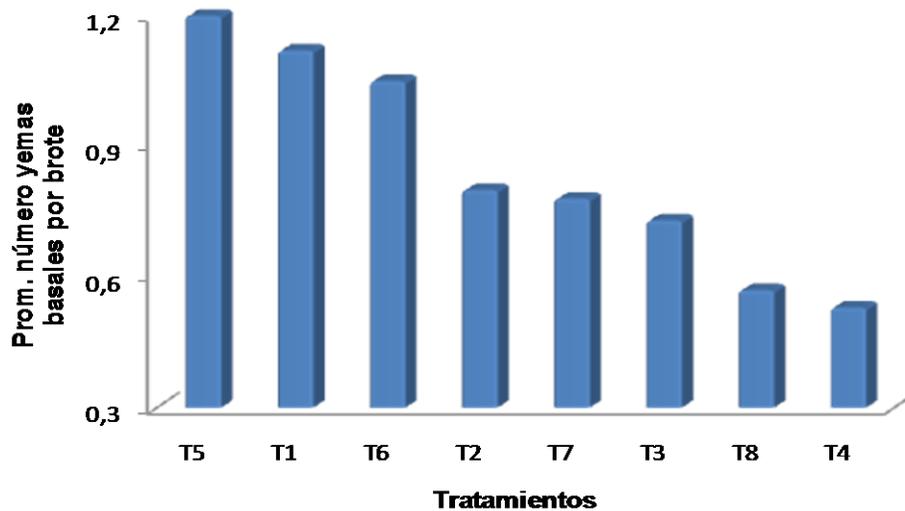


Figura 3.8 Promedios de número de yemas basales por brote de acuerdo a cada tratamiento en la fase de establecimiento *in vitro*.

Al analizar los medios de cultivo con la prueba SNK al 5%, observamos que el medio MSVG/2 presentó el mejor promedio para el número de yemas basales por brote en comparación con MSVG cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.15 y Figura 3.9).

Tabla 3.15 Promedios para el número de yemas basales por brote en ambos medios de cultivo con la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio
MSVG	M1	0,79
MSVG/2	M2	0,91

El promedio de yemas basales por brote más alto fue para medio de cultivo MSVG/2 (0,91) a diferencia de MSVG, cuyo valor (0,79) fue menor para esta variable (Figura 3.9).

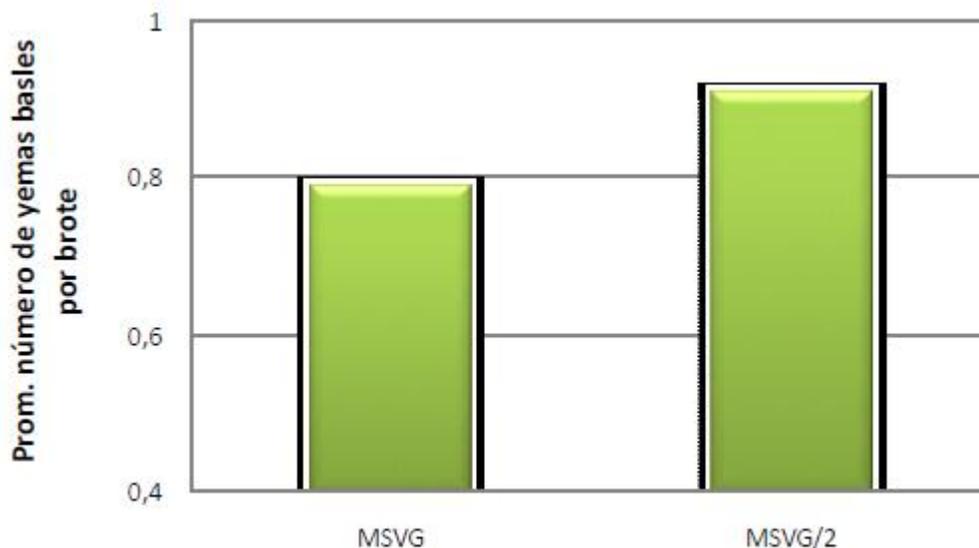


Figura 3.9 Promedios de número de yemas basales por brote para cada medio de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro*.

De acuerdo a las dosis de BAP, la prueba SNK al 5% determinó tres rangos de significancia donde se observó que la dosis presentó el mayor número de yemas basales por brotes D1 (1,19) a diferencia de la dosis D4 cuyo promedio fue el más bajo (0,55) (Tabla 3.16).

Tabla 3.16 Promedios para el número de yemas basales por brote según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.

Dosis BAP	Codificación	Promedio	Rango de significancia
0,00 mg/L	D1	1,19	A
0,56 mg/L	D2	0,93	b
1,12 mg/L	D3	0,76	b
1,68 mg/L	D4	0,55	c

La dosis más baja (0 mg/L) mostró el mejor promedio para número de yemas basales por brotes (1,19) en comparación con la dosis más alta del ensayo (1,68 mg/L) cuya promedio fue de 0,55. Dosis intermedias (0,56 mg/L) y (1,12 mg/L) establecieron promedios iguales (0,93) y (0,76) respectivamente (Tabla 3.16 y Figura 3.10).

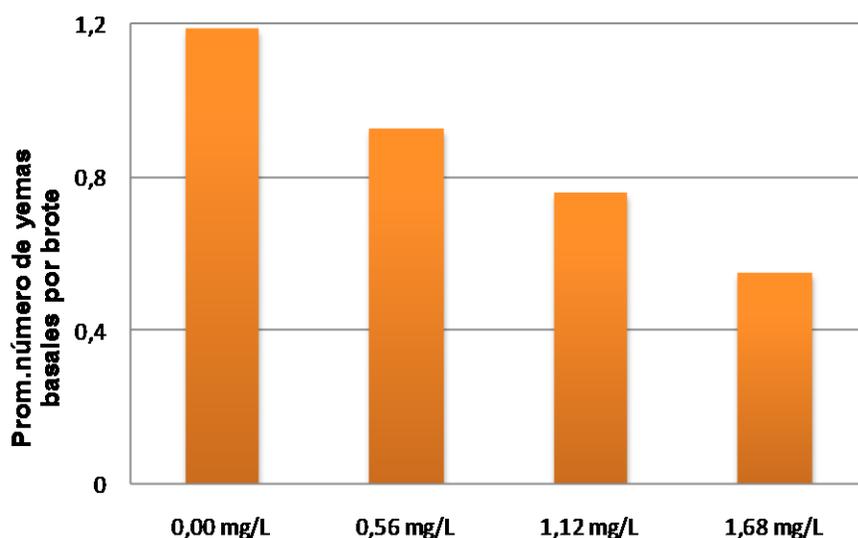


Figura 3.10 Promedios de número de yemas basales por brote para cada dosis de BAP en la fase de establecimiento *in vitro*.

3.2.3. Índice de contaminación

Los porcentajes de contaminación se determinaron mediante observación de los explantes durante 7, 14 y 21 días. La medición final se realizó el día 21, etapa en la cual terminó la fase de establecimiento *in vitro*. Los resultados de esta variable se presentan mediante un análisis de varianza (Tabla 3.17) junto con la significancia de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.17 Análisis de varianza para el índice de contaminación en la fase de establecimiento *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	152,46	7	21,78	2,00	,048
Med_Cul	12,78	1	12,78	1,11	,065
Dos_BAP	76,65	3	25,55	2,43	,002
Med_Cul*Dos_BAP	63,03	3	21,01	2,01	,0001
Error	1788,60	165	10,84		
Total	1891,06	172			

Los resultados analizados indican que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BAP presenta significancia estadística (0,0001) al igual que las dosis de BAP (0,002) evaluadas. En este caso, no se observó significancia estadística (0,065) para los medios de cultivo (MSVG y MSVG/2).

La prueba SNK al 5% estableció dos rangos de significancia, siendo los tratamientos T5 y T1 aquellos que tenían las dosis más bajas de BAP (0 mg/L) y el promedio más bajo de contaminación en MSVG/2 y MSVG respectivamente (Tabla 3.18 y Figura 3.11).

Tabla 3.18 Rangos de significancia para promedios de porcentajes de contaminación de cada tratamiento con la prueba SNK al 5% en la fase de establecimiento *in vitro*.

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T5	M2*D1	4,1	a
T1	M1*D1	4,9	a
T6	M2*D2	5,6	a
T2	M1*D2	6,1	a
T7	M2*D3	7,4	b
T3	M1*D3	8,9	b
T8	M2*D4	9,4	b
T4	M1*D4	11,2	b

El tratamiento 5 estableció el mejor promedio (4,1%) para los individuos evaluados en relación al índice de contaminación. Los tratamientos 8 y 4 mostraron los valores más altos (9,4%) y (11,2%) con relación a los otros tratamientos (Figura 3.11).

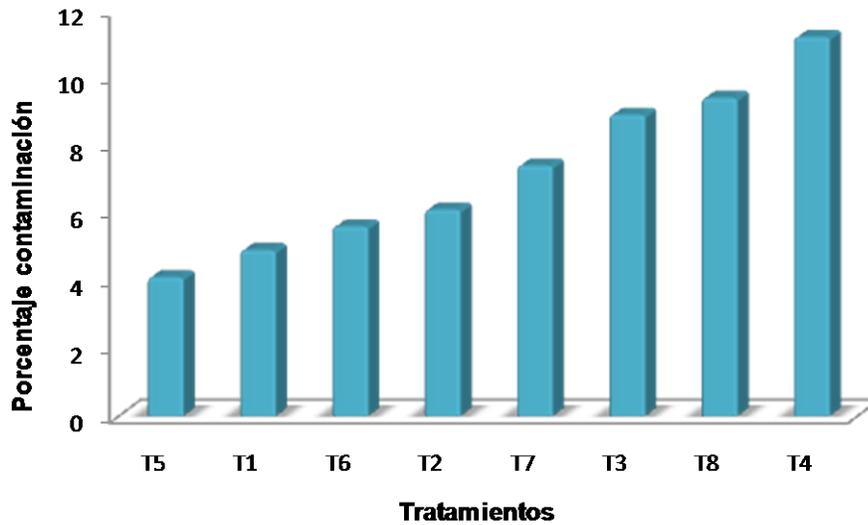


Figura 3.11 Promedios del índice de contaminación de acuerdo a cada tratamiento en la fase de establecimiento *in vitro*.

Los medios de cultivo fueron evaluados con la prueba SNK al 5% determinaron que MSVG presentó el porcentaje más bajo de contaminación en comparación con MSVG/2 cuyo valor fue más alto (Tabla 3.19 y Figura 3.12).

Tabla 3.19 Porcentajes para el índice de contaminación en ambos medios de cultivo con la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Porcentaje
MSVG	M1	6,63
MSVG/2	M2	9,91

El promedio más alto de contaminación fue para medio de cultivo MSVG/2 (9,91%) a diferencia de MSVG, cuyo valor (6,63%) fue menor para esta variable (Figura 3.12).

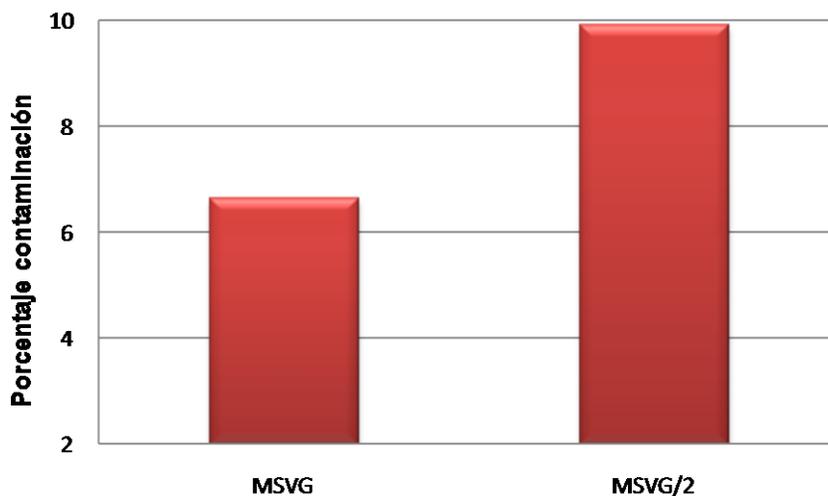


Figura 3.12 Promedio de porcentajes de contaminación por cada medio de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro*.

Evaluando las dosis de BAP con la prueba SNK al 5% se encontraron dos rangos de significancia, siendo la dosis D1 el menor promedio de contaminación (4,50%) a diferencia de la dosis D4 cuyos índices fueron los más altos (10,30%) (Tabla 3.20).

Tabla 3.20 Promedios del porcentaje de contaminación en ambos medios de cultivo con la prueba SNK al 5%.

Dosis BAP	Codificación	Promedio	Rango de significancia
0,00 mg/L	D1	4,50	A
0,56 mg/L	D2	5,85	A
1,12 mg/L	D3	8,15	b
1,68 mg/L	D4	10,30	b

Las dosis más bajas (0 mg/L) y (0,56 mg/L) determinaron los mejores promedios de índices de contaminación (4,50) y (5,85) en comparación con las dosis más altas del ensayo (1,12 mg/L) y (1,68 mg/L) cuyos valores fueron 8,15 y 10,30 respectivamente (Figura 3.13)

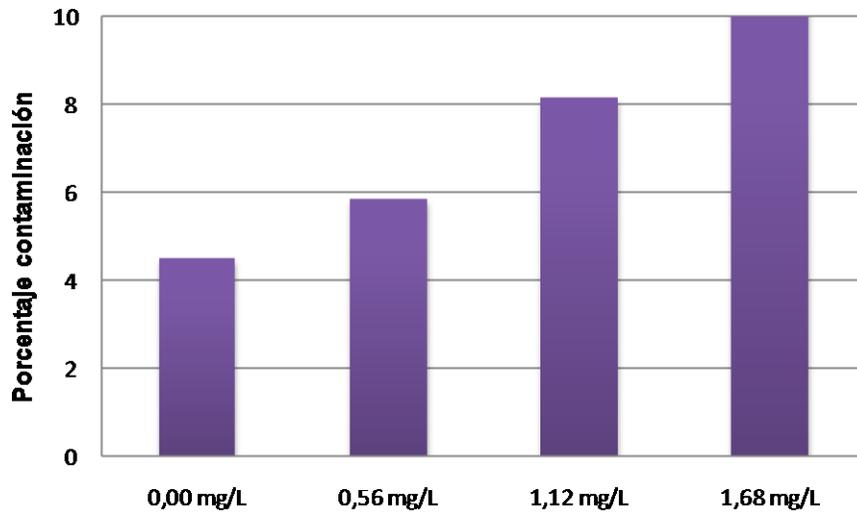


Figura 3.13 Promedios del porcentaje de contaminación para cada dosis de BAP en la fase de establecimiento *in vitro*.

3.2.4. Índice de brotación

Referente al índice de brotación, se observaron y contaron el número de nudos de cada uno de los explantes. Por otro lado, la distancia entre nudos fue medida con una regla milimetrada. Estos dos datos fueron necesarios para encontrar el índice de brotación. Los resultados se presentan de acuerdo al análisis de varianza (Tabla 3.21) de acuerdo a la significancia de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.21 Análisis de varianza para índice de brotación en la fase de establecimiento *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	8136,70	7	1162,38	2,25	,009
Med_Cul	1023,88	1	1023,88	1,78	,076
Dos_BAP	3434,19	3	1144,73	2,22	,004
Med_Cul*Dos_BAP	3678,63	3	1226,21	2,37	,001
Error	85204,35	165	516,39		
Total	291429,73	172			

El análisis estadístico establece que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BAP muestra significancia estadística (0,001) al igual que las dosis de BAP (0,004) evaluadas. Con respecto a los medios de cultivo, éstos no presentaron significancia estadística (0,076).

Al analizar la prueba SNK al 5% se observaron tres rangos de significancia, siendo los tratamientos T5 y T1 aquellos que tenían las dosis más bajas de BAP (0 mg/L) y el índice más alto de brotación (Tabla 3.22 y Figura 3.14)

Tabla 3.22 Rangos de significancia para índice de brotación según la prueba SNK al 5% en la fase de establecimiento *in vitro*

Tratamientos	Codificación	Porcentaje	Rango de significancia
T5	M2*D1	4,28	a
T1	M1*D1	4,01	a
T6	M2*D2	3,89	b
T2	M1*D2	3,20	b
T7	M2*D3	3,09	b
T3	M1*D3	2,90	b
T8	M2*D4	1,95	c
T4	M1*D4	1,80	c

El tratamiento 5 estableció el mejor promedio estadístico (4,28%) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 8 y 4 mostraron los promedios más bajos (1,95%) y (1,80%) con relación a los otros tratamientos (Figura 3.14).

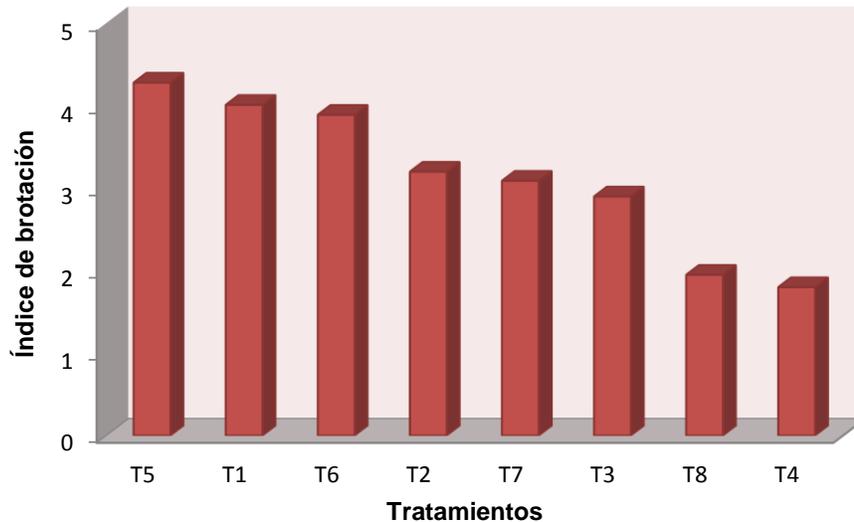


Figura 3.14 Promedios del índice de brotación de acuerdo a cada tratamiento en la fase de establecimiento *in vitro*.

Los medios de cultivo fueron evaluados con la prueba SNK al 5%, estableciendo que MSVG mostró el porcentaje más bajo de contaminación en comparación con MSVG/2 cuyo valor fue más alto (Tabla 3.23 y Figura 3.15).

Tabla 3.23 Promedios para el índice de brotación en ambos medios de cultivo con la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio
MSVG	M1	2,98
MSVG/2	M2	3,23

El promedio más alto para el índice de brotación fue para los ensayos con el medio de cultivo MSVG/2 (3,23%) a diferencia de MSVG, cuyo valor (2,98%) fue menor para esta variable (Figura 3.15).

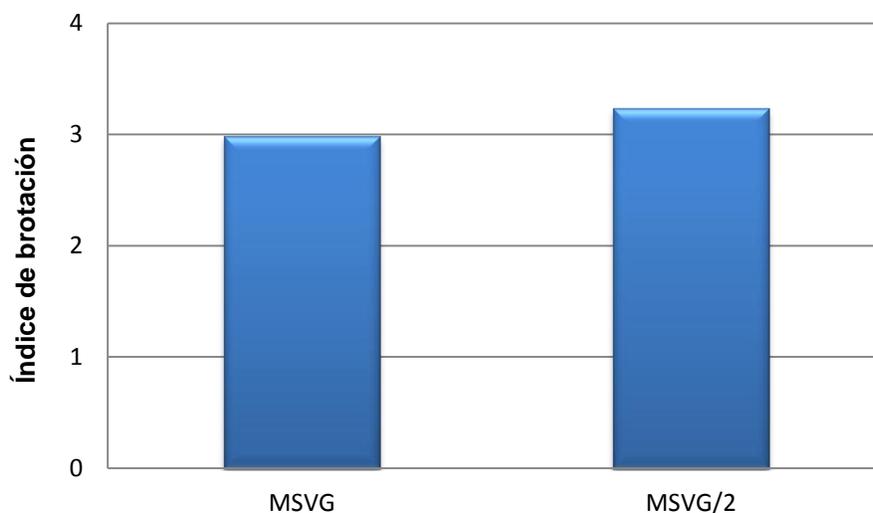


Figura 3.15 Promedios del índice de brotación por cada medio de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro*.

Al evaluar las dosis de BAP con la prueba SNK al 5% se establecieron tres rangos de significancia, siendo la dosis D1 el promedio de brotación más alto (4,13%) a diferencia de la dosis D4 cuyo índice fue el más alto (1,88%) (Tabla 3.24).

Tabla 3.24 Promedios para el índice de brotación según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.

Dosis BAP	Codificación	Promedios	Rango de significancia
0,00 mg/L	D1	4,13	a
0,56 mg/L	D2	3,55	b
1,12 mg/L	D3	2,99	b
1,68 mg/L	D4	1,88	c

Las dosis más bajas (0 mg/L) y (0,56 mg/L) determinaron los mejores índices de brotación (4,13%) y (3,55%) en comparación con las dosis más altas del ensayo (1,12 mg/L) y (1,68 mg/L) cuyos valores fueron 2,99% y 1,88% respectivamente (Figura 3.16)

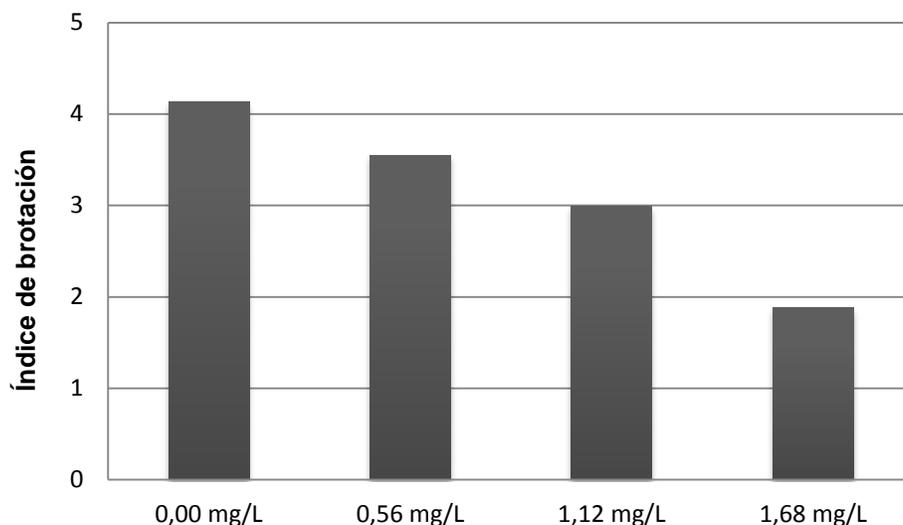


Figura 3.16 Promedios del índice de brotación para cada dosis de BAP en la fase de establecimiento *in vitro*.

3.3. Fase III: Multiplicación *in vitro* de explantes

3.3.1. Longitud de brote

Después de la fase de establecimiento *in vitro*, los explantes fueron multiplicados utilizando varias concentraciones de BAP, KIN (1,12; 2,25 y 3,37 mg/L) y BRS (0,4; 0,8 y 1,2 ppm) para las dosis 1, 2 y 3 respectivamente en el medio de cultivo 1 (MSVG) correspondientes a los tratamientos 1,2 y 3.

En el caso del medio de cultivo 2 (MSVG/2) se utilizaron las mismas dosis para formar los tratamientos 4, 5 y 6. En esta etapa final, los resultados se determinaron mediante un análisis de varianza (Tabla 3.25) cuyos resultados indican la significancia de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.25 Análisis de varianza para longitud de brotes según ensayos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	6403,87	5	1280,77	1,25	,054
Med_C	1228,13	1	1228,13	1,21	,062
Dosis_BAP	4283,32	2	2141,66	2,56	,004
Med_C*Dosis_BAP	4892,42	2	2446,21	2,40	,0025
Error	164067,05	161	1019,05		
Total	174470,92	166			

Los resultados indican que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BAP presenta significancia estadística (0,0025) al igual que las dosis de BAP (0,04) analizadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,062).

La prueba SNK al 5% determinó tres rangos de significancia, siendo los tratamientos T3 y T6 aquellos que tenían las dosis más altas de BAP (3,37 mg/L) y el promedio más alto para longitud de brotes (Tabla 3.26 y Figura 3.17)

Tabla 3.26 Rangos de significancia para longitud de brotes por tratamientos con BAP según la prueba SNK al 5% en la fase de multiplicación *in vitro*.

Tratamientos	Codificación	Promedio (mm)	Rango de significancia
T3	M1*D3	6,33	a
T6	M2*D3	5,98	a
T2	M1*D2	5,01	b
T5	M2*D2	4,87	b
T1	M1*D1	4,15	b c
T4	M2*D1	3,55	b c

De acuerdo con los valores de las medias de cada tratamiento, se observó que el tratamiento 6 estableció el mejor promedio estadístico (6,33 mm) para los individuos

evaluados en los ensayos con BAP. En comparación con otros tratamientos, el tratamiento 4 presentó un valor de 3,55 mm siendo éste el más bajo para esta variable (Figura 3.17).

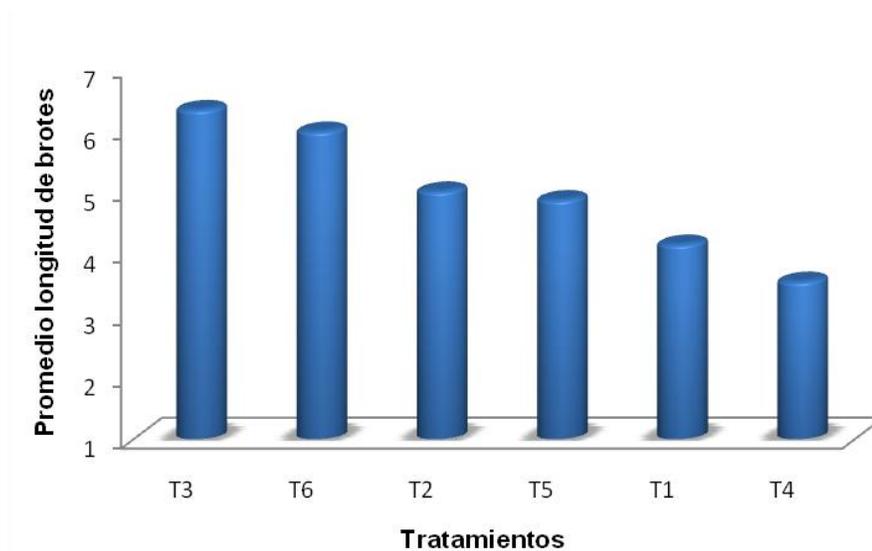


Figura 3.17 Promedios de longitud de brote por tratamientos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

Los medios de cultivo analizados con la prueba SNK al 5% determinaron que el medio MSVG presentó el mejor promedio para longitud de brotes en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.27 y Figura 3.18).

Tabla 3.27 Promedios para longitud de brotes en ambos medios de cultivo según ensayos con BAP mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio (mm)
MSVG	M1	5,16
MSVG/2	M2	4,80

El promedio de longitud de brotes más alto fue para el medio de cultivo MSVG (5,16 mm) a diferencia de MSVG/2, cuyo valor (4,80 mm) fue menor para esta variable (Figura 3.9).

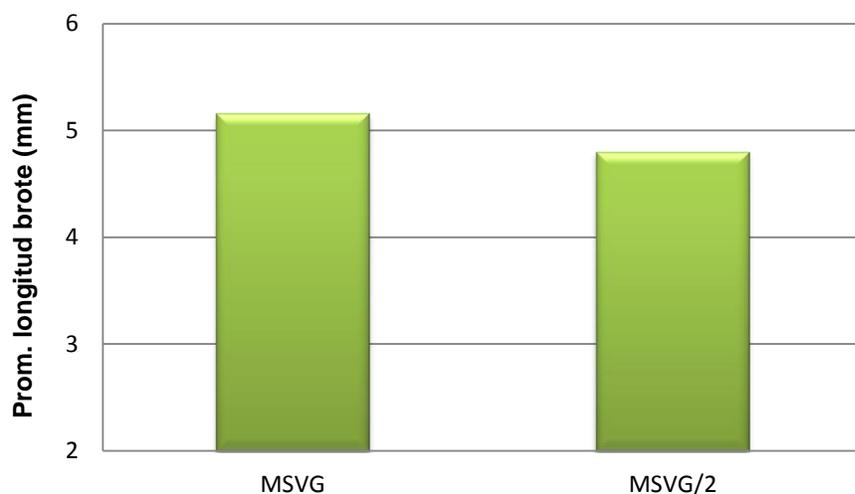


Figura 3.18 Promedios de longitud de brotes para cada medio de cultivo según ensayos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

De acuerdo a las dosis de BAP, la prueba SNK al 5% comprobó tres rangos de significancia donde se observó que la dosis D3 presentó el mayor número de yemas basales por brotes (6,15 mm) a diferencia de la dosis D1 (3,85 mm) cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.28).

Tabla 3.28 Promedios para longitud de brote según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.

Dosis BAP	Codificación	Promedio (mm)	Rango de significancia
3,37 mg/L	D3	6,15	a
2,25 mg/L	D2	4,94	b
1,12 mg/L	D1	3,85	b c

La dosis más baja (1,12 mg/L) mostró el promedio más bajo para longitud de brote (3,85 mm) en comparación con las dosis más altas del ensayo (2,25 mg/L) y (3,37 mg/L) cuyos promedios fueron iguales (4,44mm) y (6,15 mm) respectivamente. (Tabla 3.28 y Figura 3.19).

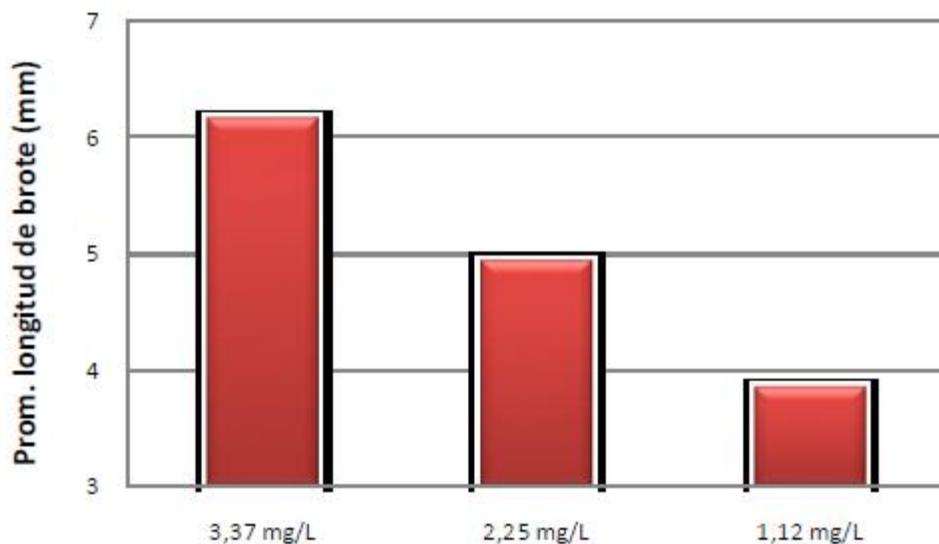


Figura 3.19 Promedios de longitud de brotes para cada dosis de BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

Con respecto a los tratamientos con KIN, el análisis de varianza (Tabla 3.29) estableció los valores de significancia de cada uno de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.29 Análisis de varianza para longitud de brotes según ensayos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	7650,87	5	1530,18	1,36	,080
Med_C	2561,17	1	2561,17	1,28	,095
Dosis_KIN	4642,50	2	2321,25	2,17	,0015
Med_C*Dosis_KIN	4852,20	2	2426,10	2,29	,0000
Error	168183,00	150	1121,22		
Total	180238,87	155			

Los resultados demuestran que la interacción entre medios de cultivo y dosis de KIN presenta significancia estadística (0,0000) al igual que las dosis de KIN (0,0015) evaluadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,095).

La prueba SNK al 5% determinó tres rangos de significancia, siendo los tratamientos T1 y T2 aquellos que tenían las dosis más bajas de KIN (1,12 mg/L y 2,25 mg/L) en el medio MSVG y el promedio más alto para longitud de brotes (Tabla 3.30 y Figura 3.20)

Tabla 3.30 Rangos de significancia para longitud de brotes por tratamientos con KIN según la prueba SNK al 5% en la fase de multiplicación *in vitro*.

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T1	M1*D1	10,05	a
T2	M1*D2	9,78	a
T3	M1*D3	8,73	b
T4	M2*D1	8,36	b
T5	M2*D2	6,84	c
T6	M2*D3	6,42	c

El tratamiento 1 estableció el mejor promedio estadístico (10,25 mm) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 5 y 6 mostraron los promedios más bajos (6,84 mm) y (6,42 mm) con relación a los otros tratamientos (Figura 3.10).

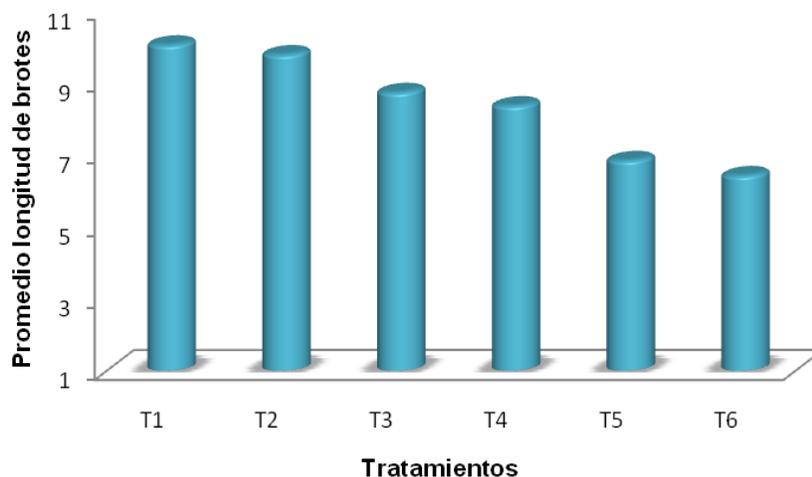


Figura 3.20 Promedios de longitud de brote por tratamientos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*

Los medios de cultivo evaluados con la prueba SNK al 5% establecieron que el medio MSVG presentó el mejor promedio para longitud de brotes en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.31 y Figura 3.21).

Tabla 3.31 Promedios para longitud de brotes en ambos medios de cultivo según ensayos con KIN mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio (mm)
MSVG	M1	9,52
MSVG/2	M2	7,21

El promedio de longitud de brotes más alto fue para el medio de cultivo MSVG (9,52 mm) a diferencia de MSVG/2, cuyo valor (7,21 mm) fue menor para esta variable (Figura 3.21).

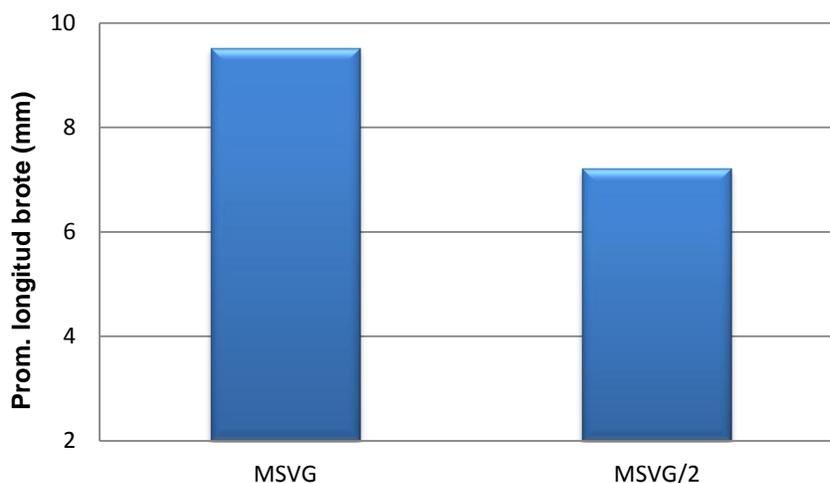


Figura 3.21 Promedios de longitud de brotes para cada medio de cultivo según ensayos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Según las dosis de KIN, la prueba SNK al 5% estableció tres rangos de significancia donde se observó que la dosis D1 presentó la mayor longitud de brotes (9,20 mm) a diferencia de la dosis D3 cuyo promedio fue el más bajo (7,57 mm) (Tabla 3.32).

Tabla 3.32 Promedios para longitud de brote según dosis de KIN con la prueba SNK al 5%.

Dosis KIN	Codificación	Promedio (mm)	Rango de significancia
1,12 mg/L	D1	9,20	a
2,25 mg/L	D2	8,31	b
3,37 mg/L	D3	7,57	b

La dosis más baja (1,12 mg/L) mostró el promedio más alto para longitud de brote (9,20 mm) en comparación con las dosis más altas del ensayo (2,25 mg/L) y (3,37 mg/L) cuyos promedios fueron iguales (8,31 mm) y (7,57 mm) respectivamente. (Tabla 3.28 y Figura 3.22).

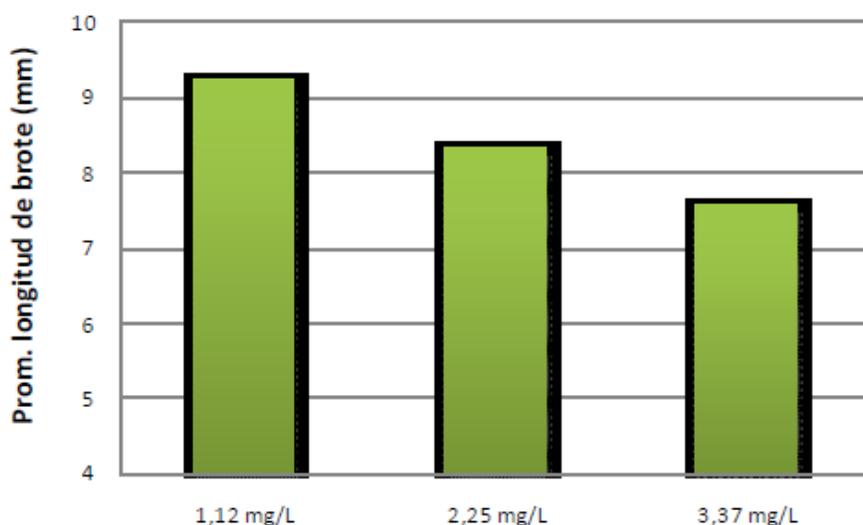


Figura 3.22 Promedios de longitud de brotes para cada dosis de KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

De acuerdo con los ensayos con BRS, los resultados fueron presentados a través de un análisis de varianza (Tabla 3.33) donde se observaron los valores de significancia de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.33 Análisis de varianza para longitud de brotes según ensayos con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	11613,23	5	2322,64	2,06	,064
Med_C	1333,17	1	1333,17	1,18	,072
Dosis_BRS	5941,96	2	2970,98	2,63	022
Med_C*Dosis_BRS	5382,10	2	2691,05	2,39	,0015
Error	157610,60	140	1125,79		
Total	170267,83	145			

Los resultados muestran que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BRS presenta significancia estadística (0,0015) al igual que las dosis de BRS (0,022) evaluadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,072).

La prueba SNK al 5% determinó dos rangos de significancia, siendo los tratamientos T1 y T4 aquellos que tenían las dosis más bajas de BRS (1,12 mg/L) y el promedio más alto para longitud de brotes (Tabla 3.34 y Figura 3.23)

Tabla 3.34 Rangos de significancia para longitud de brotes por tratamientos con BRS según la prueba SNK al 5% en la fase de multiplicación *in vitro*.

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T1	M1*D1	8,25	a
T4	M2*D1	7,97	a
T2	M1*D2	7,52	a
T5	M2*D2	6,05	b
T3	M1*D3	5,52	b
T6	M2*D3	4,99	b

El tratamiento 1 estableció el promedio estadístico más alto (8,25 mm) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 3 y 6 mostraron los promedios más bajos (5,52 mm) y (4,99 mm) con relación a los otros tratamientos (Figura 3.23).

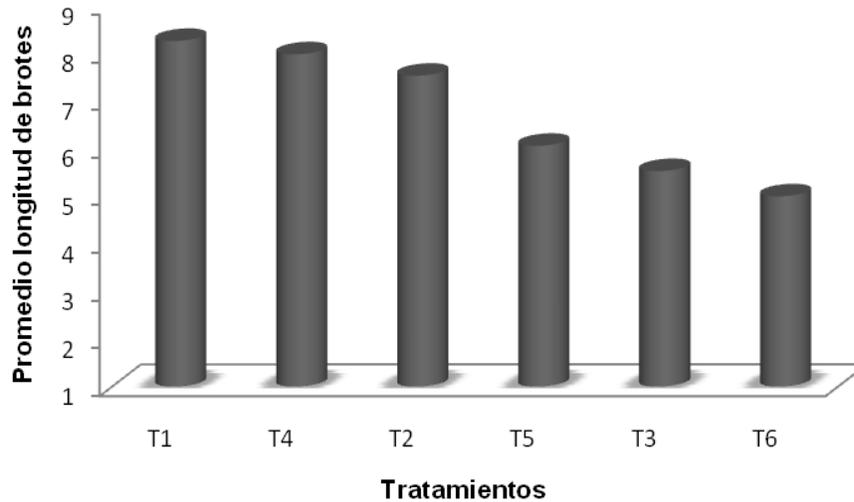


Figura 3.23 Promedios de longitud de brote por tratamientos con BRS en la fase de multiplicación in vitro.

Los medios de cultivo evaluados con la prueba SNK al 5% establecieron que el medio MSVG presentó el mejor promedio para longitud de brotes en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.35 y Figura 3.24).

Tabla 3.35 Promedios para longitud de brotes en ambos medios de cultivo según ensayos con BRS mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio (mm)
MSVG	M1	7,09
MSVG/2	M2	6,33

El promedio de longitud de brotes más alto fue para el medio MSVG (7,09 mm) a diferencia de MSVG/2, cuyo valor (6,33 mm) fue menor para esta variable (Figura 3.24).

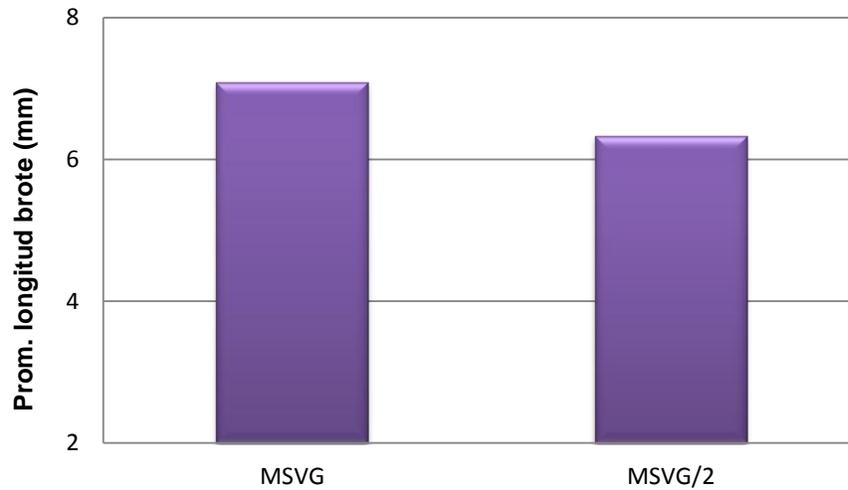


Figura 3.24 Promedios de longitud de brotes para cada medio de cultivo según ensayos con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

Las dosis de BRS con la prueba SNK al 5% constituyeron dos rangos de significancia donde se observó que la dosis D1 presentó la mayor longitud de brotes (8,11 mm) a diferencia de la dosis D3 cuyo promedio fue el más bajo (5,25 mm) (Tabla 3.36).

Tabla 3.36 Promedios para longitud de brote según dosis de BRS con la prueba SNK al 5%.

Dosis BRS	Codificación	Promedio (mm)	Rango de significancia
0,4 ppm	D1	8,11	a
0,8 ppm	D2	6,70	b
1,2 ppm	D3	5,25	b

La dosis más baja (0,4 ppm) estableció el promedio más alto para longitud de brote (8,11 mm) en comparación con las dosis más altas del ensayo (0,8 ppm) y (1,2 ppm) cuyos promedios fueron iguales (6,70 mm) y (5,25 mm) respectivamente. (Tabla 3.36 y Figura 3.25).

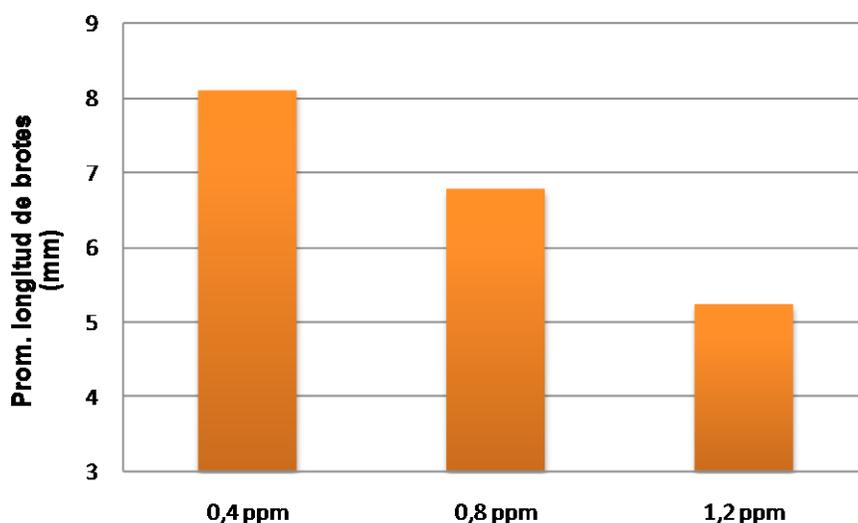


Figura 3.25 Promedios de longitud de brotes para cada dosis de BRS en la fase de multiplicación *in vitro*

3.3.2. Número de brotes por explante

Referente a esta variable, se observaron y contaron el número de brotes por cada uno de los explantes multiplicados con BAP, KIN y BRS. Los resultados se presentan de acuerdo al análisis de varianza (Tabla 3.37) cuyos resultados indican la significancia de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.37 Análisis de varianza para número de brotes por explante según ensayos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	1237,96	5	247,59	2,25	,003
Med_C	139,70	1	139,70	1,27	,058
Dosis_BAP	503,32	2	251,66	2,29	,002
Med_C*Dosis_BAP	594,94	2	297,47	2,70	,000
Error	17682,63	161	109,83		
Total	18920,59	166			

Los resultados muestran que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BAP presenta significancia estadística (0,00) al igual que las dosis de BAP (0,002) evaluadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,058).

Al realizar la prueba SNK al 5% se establecieron tres rangos de significancia, siendo los tratamientos T3 y T6 aquellos que tenían las dosis más altas de BAP (3,37 mg/L) y el promedio más alto para número de brotes por explante (Tabla 3.38 y Figura 3.26)

Tabla 3.38 Rangos de significancia para número de brotes por explante según ensayos con BAP dada por la prueba SNK al 5% en la fase de multiplicación *in vitro*.

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T3	M1*D3	1,80	a
T6	M2*D3	1,71	a
T2	M1*D2	1,57	b
T5	M2*D2	1,50	b
T1	M1*D1	1,44	c
T4	M2*D2	1,37	c

Con respecto a los valores de las medias de cada tratamiento, se observó que el tratamiento 3 obtuvo el mejor promedio estadístico (1,80 mm) para los individuos evaluados en los ensayos con BAP. En comparación con otros tratamientos, el tratamiento 4 presentó un valor de 1,37 mm siendo éste el más bajo para esta variable (Figura 3.26).

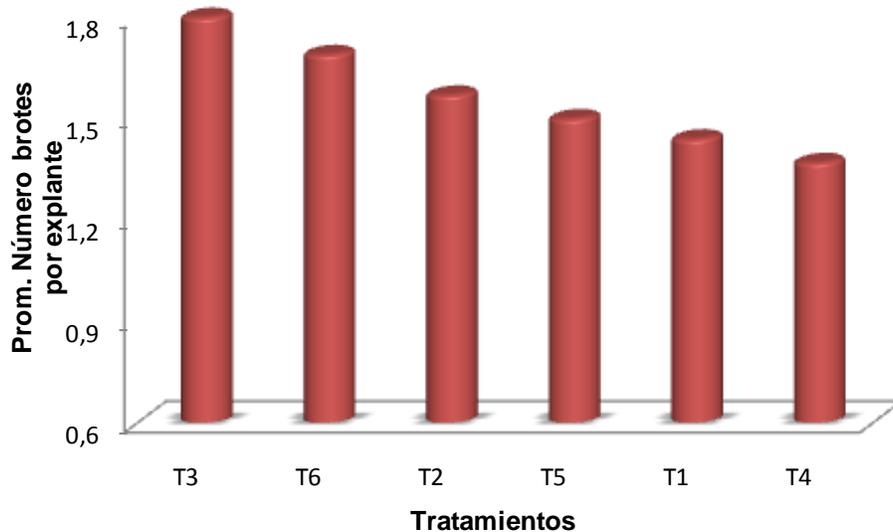


Figura 3.26 Promedios de número de brotes por explante según tratamientos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

En relación a los medios de cultivo analizados, la prueba SNK al 5% determinó que el medio MSVG presentó el mejor promedio para longitud de brotes en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.37 y Figura 3.27).

Tabla 3.39 Promedios para número de brotes por explante en ambos medios de cultivo según ensayos con BAP mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio
MSVG	M1	1,61
MSVG/2	M2	1,52

El mejor promedio según el número de brotes por explante fue para los ensayos con el medio MSVG (1,61) a diferencia de MSVG/2, cuyo valor (1,52) fue menor para esta variable (Figura 3.27).

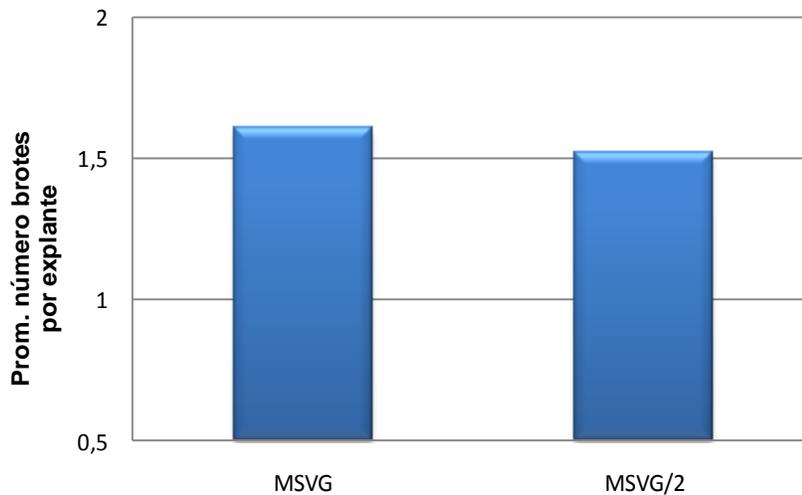


Figura 3.27 Promedios de número de brotes por explante para cada medio de cultivo según ensayos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

Las dosis de BAP fueron analizadas con la prueba SNK al 5% estableciendo dos rangos de significancia donde se observó que la dosis D3 presentó el mayor número de brotes por explante (1,76) a diferencia de la dosis D1 cuyo promedio fue el más bajo (1,41) de todos los ensayos (Tabla 3.40).

Tabla 3.40 Promedios para número de brotes por explante según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.

Dosis BAP	Codificación	Promedio (mm)	Rango de significancia
3,37 mg/L	D3	1,76	a
2,25 mg/L	D2	1,54	b
1,12 mg/L	D1	1,41	b

La dosis más alta de BAP (3,37 mg/L) mostró el promedio más alto para número de brotes por explante (1,76) en comparación con las dosis más bajas del ensayo (2,25 mg/L) y (1,12 mg/L) cuyos promedios fueron iguales (1,54) y (1,41) respectivamente. (Tabla 3.38 y Figura 3.28).

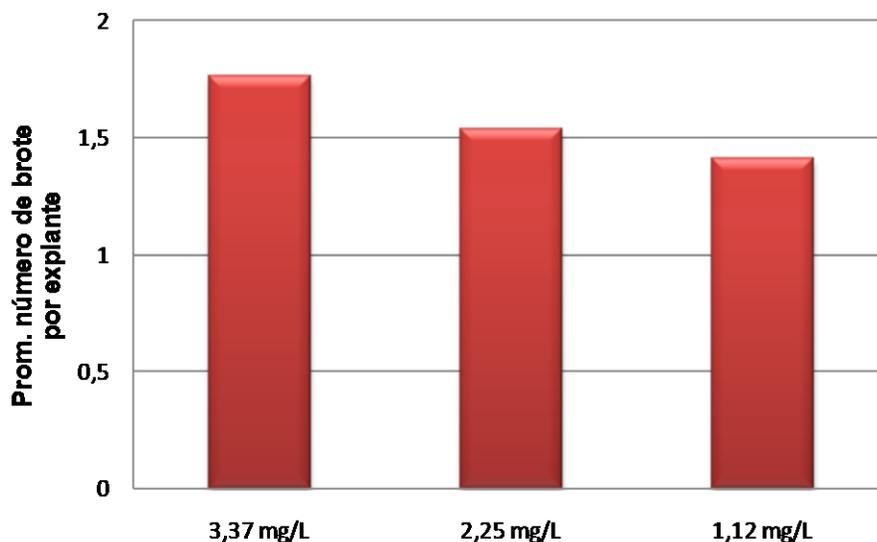


Figura 3.28 Promedio de número de brotes por explante para cada dosis de BAP en la fase de multiplicación *in vitro*

De acuerdo a los ensayos con KIN, el análisis de varianza (Tabla 3.41) determinó los valores de significancia de cada uno de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.41 Análisis de varianza para número de brotes por explante según ensayos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	761,80	5	153,38	1,31	,066
Med_C	225,77	1	225,77	1,93	,071
Dosis_KIN	675,92	2	337,96	2,89	,0009
Med_C*Dosis_KIN	590,20	2	295,10	2,52	,0000
Error	17511,00	150	116,74		
Total	19002,89	155			

Los resultados indican que la interacción entre medios de cultivo y dosis de KIN muestra significancia estadística (0,0000) al igual que las dosis de KIN (0,0009) analizadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,071).

Al realizar la prueba SNK al 5% se formaron tres rangos de significancia, siendo los tratamientos T1 y T2 aquellos que tenían las dosis más bajas de KIN (1,12 mg/L y 2,25 mg/L) en el medio MSVG y el promedio más alto para número de brotes por explante (Tabla 3.42 y Figura 3.29).

Tabla 3.42 Rangos de significancia para número de brotes por explante según ensayos con KIN dada por la prueba SNK al 5% en la fase de multiplicación *in vitro*.

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T1	M1*D1	2,46	a
T2	M1*D2	2,37	a
T3	M1*D3	2,21	b
T4	M2*D1	2,15	b
T5	M2*D2	2,03	c
T6	M2*D3	1,96	c

El tratamiento 1 estableció el mejor promedio estadístico (2,46) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 5 y 6 mostraron los promedios más bajos (2,03) y (1,96) con relación a los otros tratamientos (Figura 3.29).

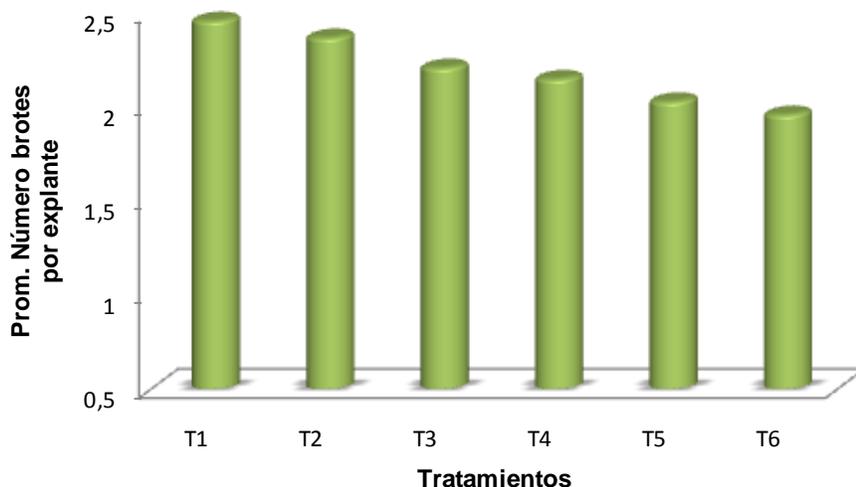


Figura 3.29 Promedio de número de brotes por explante según tratamientos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

En relación a los medios de cultivo evaluados, la prueba SNK al 5% estableció que el medio MSVG presentó el mejor promedio para longitud de brotes en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.43 y Figura 3.30).

Tabla 3.43 Promedios para número de brotes por explante en ambos medios de cultivo según ensayos con KIN mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio
MSVG	M1	2,34
MSVG/2	M2	2,05

El mejor promedio según el número de brotes por explante fue para los ensayos con el medio MSVG (2,34) a diferencia de MSVG/2, cuyo valor (2,05) fue menor para esta variable (Figura 3.30).

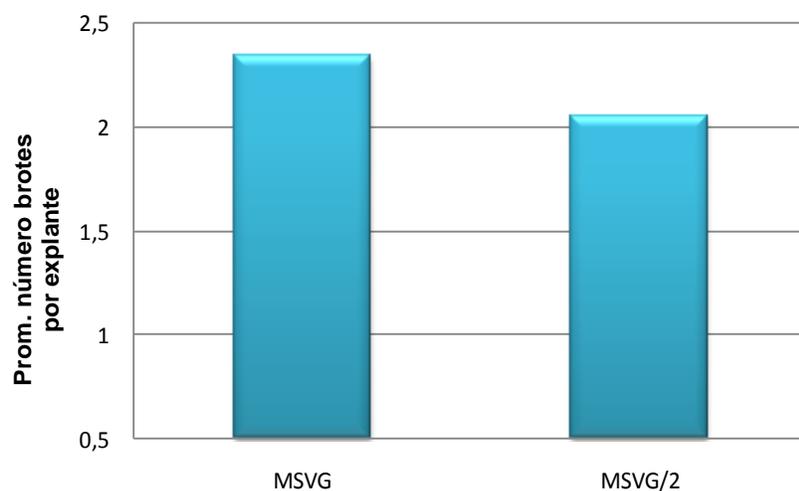


Figura 3.30 Promedios de número de brotes por explante para cada medio de cultivo según ensayos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Las dosis de KIN fueron analizadas con la prueba SNK al 5% estableciendo dos rangos de significancia donde se observó que la dosis D1 presentó el mayor número de

brotos por explante (1,76) a diferencia de la dosis D3 cuyo promedio fue el más bajo (1,41) de todos los ensayos (Tabla 3.44).

Tabla 3.44 Promedios para número de brotes por explante según dosis de KIN con la prueba SNK al 5%.

Dosis KIN	Codificación	Promedio	Rango de significancia
1,12 mg/L	D1	2,31	a
2,25 mg/L	D2	2,20	b
3,37 mg/L	D3	2,09	b

La dosis más baja de KIN (1,12 mg/L) demostró el promedio más alto para número de brotes por explante (2,31) en comparación con las dosis más altas del ensayo (2,25 mg/L) y (3,37 mg/L) cuyos promedios fueron iguales (2,10) y (2,09) respectivamente. (Tabla 3.44 y Figura 3.31).

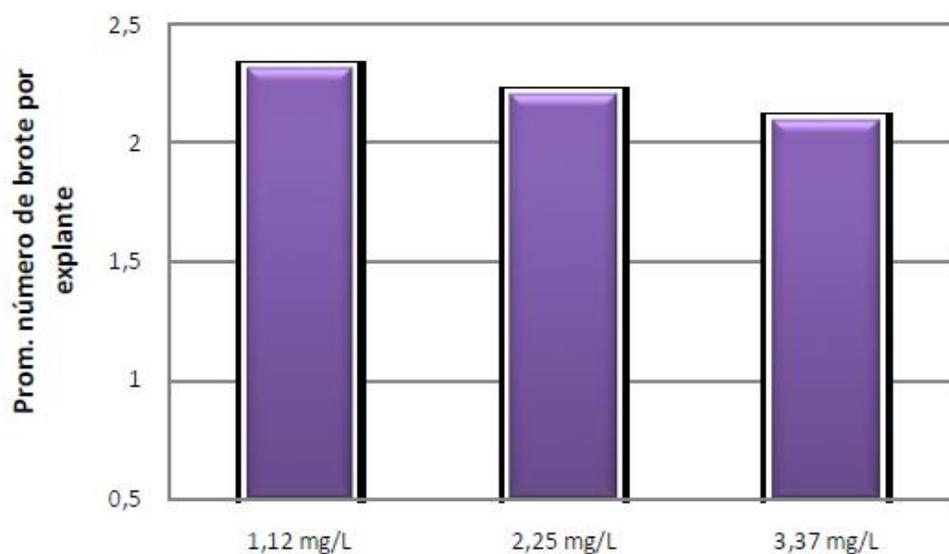


Figura 3.31 Promedios de número de brotes por explante para cada dosis de KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Referente a los tratamientos con BRS, los resultados se presentaron a través de un análisis de varianza (Tabla 3.45) cuyos resultados indican la significancia de cada uno de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.45 Análisis de varianza para número de brotes por explante según ensayos con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	1498,67	5	299,73	2,55	,003
Med_C	128,17	1	128,17	1,63	,069
Dosis_BRS	678,72	2	339,36	2,89	,000
Med_C*Dosis_BRS	691,78	2	345,89	2,95	,0002
Error	16408,00	140	117,20		
Total	17906,67	145			

Los resultados presentan que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BRS muestra significancia estadística (0,0002) al igual que las dosis de BRS (0,000) analizadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,069).

Al realizar la prueba SNK al 5% se formaron tres rangos de significancia, siendo los tratamientos T1 y T4 aquellos que tenían las dosis más bajas de BRS (1,12 mg/L) y el promedio más alto para número de brotes por explante (Tabla 3.46 y Figura 3.32).

Tabla 3.46 Rangos de significancia para número de brotes por explante según ensayos con BRS dada por la prueba SNK al 5% en la fase de multiplicación *in vitro*.

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T1	M1*D1	2,18	a
T4	M2*D1	2,14	a
T2	M1*D2	2,07	b
T5	M2*D2	1,88	b
T3	M1*D3	1,78	c
T6	M2*D3	1,70	c

El tratamiento 1 estableció el promedio estadístico más alto (2,18) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 3 y 6 mostraron los promedios más bajos (1,78) y (1,70) con relación a los otros tratamientos (Figura 3.32).

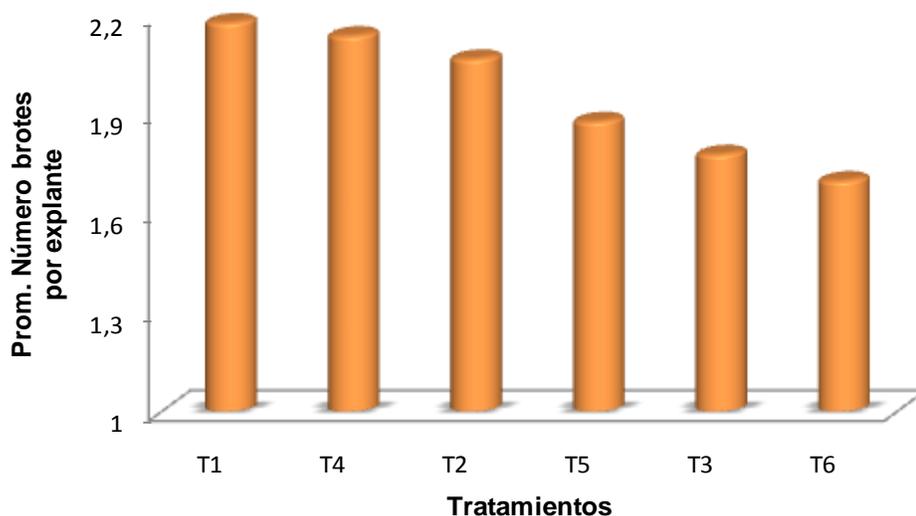


Figura 3.32 Promedios de número de brotes por explante según tratamientos con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

En relación a los medios de cultivo evaluados, la prueba SNK al 5% estableció que el medio MSVG presentó el mejor promedio para longitud de brotes en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.47 y Figura 3.33).

Tabla 3.47 Promedios para número de brotes por explante en ambos medios de cultivo según ensayos con BRS mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio
MSVG	M1	2,01
MSVG/2	M2	1,90

El mejor promedio según el número de brotes por explante fue para los ensayos con el medio MSVG (2,01) a diferencia de MSVG/2, cuyo valor (1,90) fue menor para esta variable (Figura 3.33).

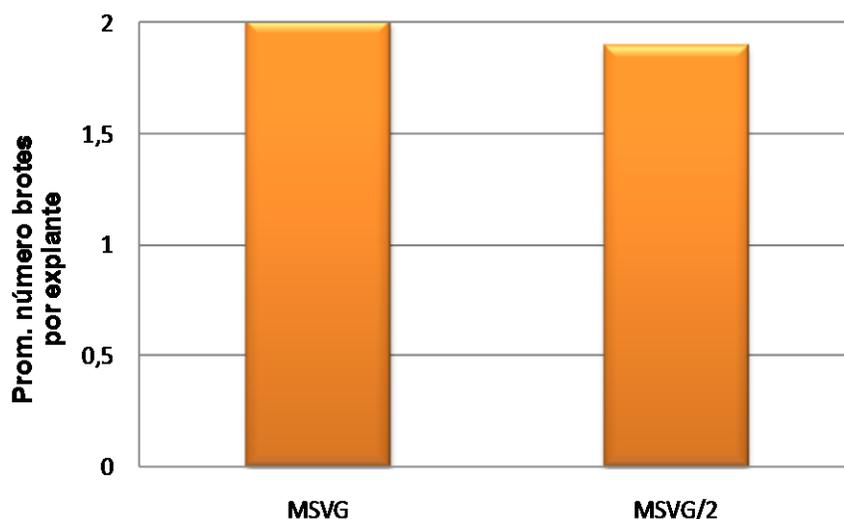


Figura 3.33 Promedios de número de brotes por explante para cada medio de cultivo según ensayos con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

Las dosis de BRS analizadas con la prueba SNK al 5% mostraron dos rangos de significancia donde se observó que la dosis D1 presentó el mayor número de brotes por explante (1,76) a diferencia de la dosis D3 cuyo promedio fue el más bajo (1,41) de todos los ensayos (Tabla 3.48).

Tabla 3.48 Promedios para número de brotes por explante según dosis de BRS con la prueba SNK al 5%.

Dosis BRS	Codificación	Promedio	Rango de significancia
0,4 ppm	D1	2,16	a
0,8 ppm	D2	1,88	b
1,2 ppm	D3	1,74	b

La dosis más baja de BRS (0,4 ppm) estableció el promedio más alto para número de brotes por explante (2,16) en comparación con las dosis más altas del ensayo (0,8 ppm) y (1,2 ppm) cuyos promedios fueron iguales (1,88) y (1,74) respectivamente. (Tabla 3.46 y Figura 3.34).

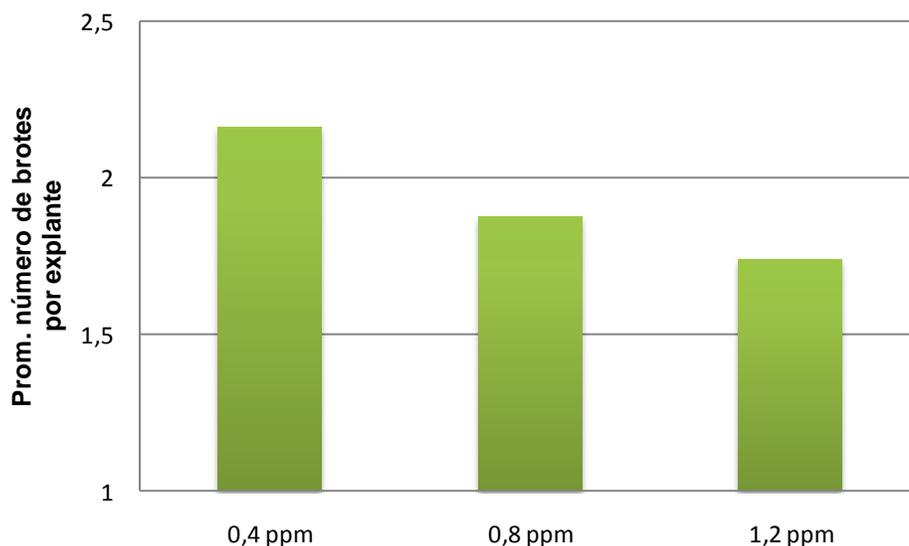


Figura 3.34 Promedios de número de brotes por explante para cada dosis de BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

3.3.3. Índice de contaminación

Los porcentajes de contaminación se determinaron mediante observación de los explantes durante 7, 14 y 21 días en medios de cultivo con BAP, KIN y BRS respectivamente.

La medición final se realizó el día 21, etapa en la cual terminó la fase de establecimiento *in vitro*. Los resultados de esta variable se muestran mediante un análisis de varianza (Tabla 3.49) cuyos resultados indican la significancia de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.49 Análisis de varianza para el índice de contaminación según ensayos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	134,99	5	26,98	2,26	,001
Med_Cul	22,41	1	22,41	1,87	,060
Dos_BAP	45,12	2	22,56	4,39	,000
Med_Cul*Dos_BAP	31,33	2	31,33	2,61	,003
Error	1925,56	161	11,96		
Total	2024,42	166			

Los resultados indican que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BAP muestra significancia estadística (0,003) al igual que las dosis de BAP (0,000) analizadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,060).

Al realizar la prueba SNK al 5% se formaron tres rangos de significancia, siendo los tratamientos T1 y T4 aquellos que tenían las dosis más bajas de BAP (1,12 mg/L) y el promedio más bajo para índice de contaminación (Tabla 3.50 y Figura 3.35).

Tabla 3.50 Promedios del porcentaje de contaminación según ensayos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

Tratamientos	Codificación	Porcentaje	Rango de significancia
T1	M1*D1	2,19	a
T4	M2*D1	2,77	a
T2	M1*D2	3,26	b
T5	M2*D2	3,41	b
T3	M1*D3	4,00	c
T6	M2*D3	4,20	c

El tratamiento 1 estableció el promedio estadístico más bajo (2,18) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 3 y 6 mostraron los promedios más altos (4,00%) y (4,20%) con relación a los otros tratamientos (Figura 3.35).

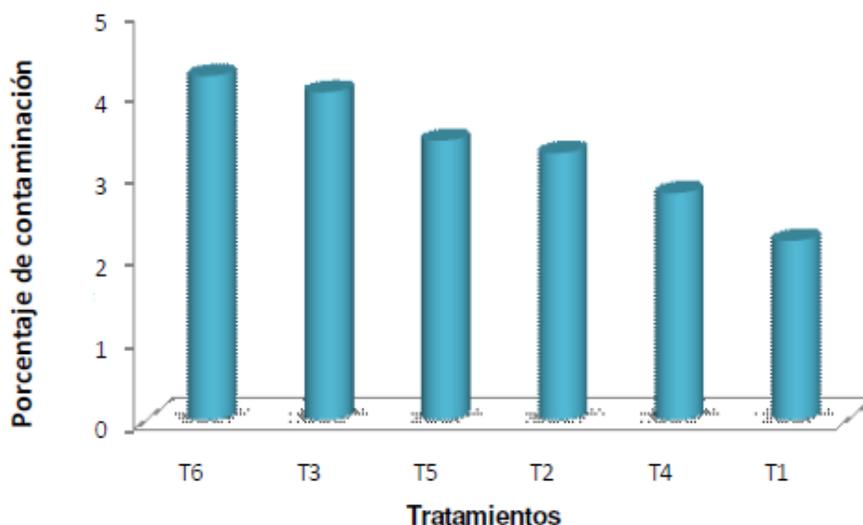


Figura 3.35 Promedios del Índice de contaminación según tratamientos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

En relación a los medios de cultivo analizados, la prueba SNK al 5% determinó que el medio MSVG presentó el mejor promedio para índice de contaminación en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.51 y Figura 3.36).

Tabla 3.51 Promedios del porcentaje de contaminación en ambos medios de cultivo según ensayos con BAP mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio
MSVG	M1	4,83
MSVG/2	M2	5,19

El promedio más alto según índice de contaminación fue para los ensayos con el medio MSVG/2 (5,19%) a diferencia de MSVG, cuyo valor (4,83%) fue menor para esta variable (Figura 3.36).

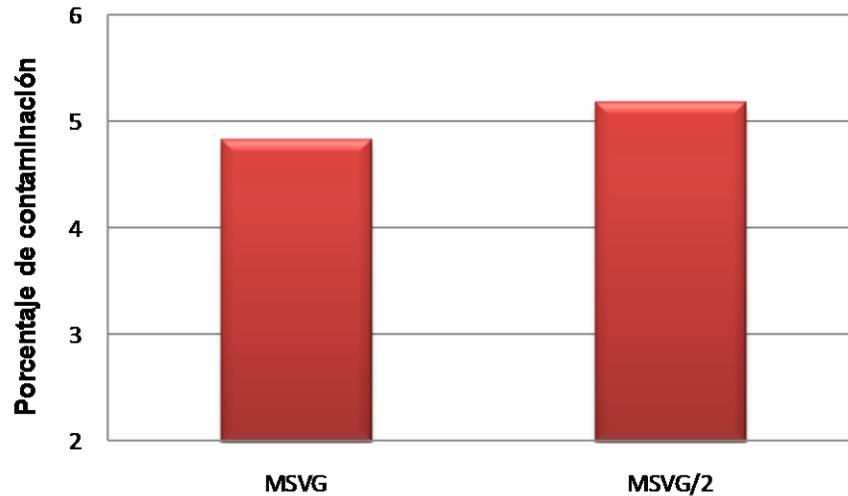


Figura 3.36 Promedios de los porcentajes de contaminación para cada medio de cultivo según ensayos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

Las dosis de BAP fueron analizadas con la prueba SNK al 5% estableciendo dos rangos de significancia donde se observó que la dosis D1 presentó el menor promedio del índice de contaminación (2,48%) a diferencia de la dosis D3 cuyo promedio fue el más alto (4,10%) de todos los ensayos (Tabla 3.52).

Tabla 3.52 Promedios de índices de contaminación según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.

Dosis BAP	Codificación	Promedio	Rango de significancia
1,12 mg/L	D1	2,48	a
2,25 mg/L	D2	3,76	b
3,37 mg/L	D3	4,10	b

La dosis más altas de BAP (3,37 mg/L) y (2,25 mg/L) mostraron los promedios más altos para índice de contaminación (4,10%) y (3,76%) respectivamente en

comparación con la dosis más baja del ensayo y (1,12 mg/L) cuyo promedio fue el más bajo de todos los ensayos (2,48%). (Tabla 3.52 y Figura 3.37).

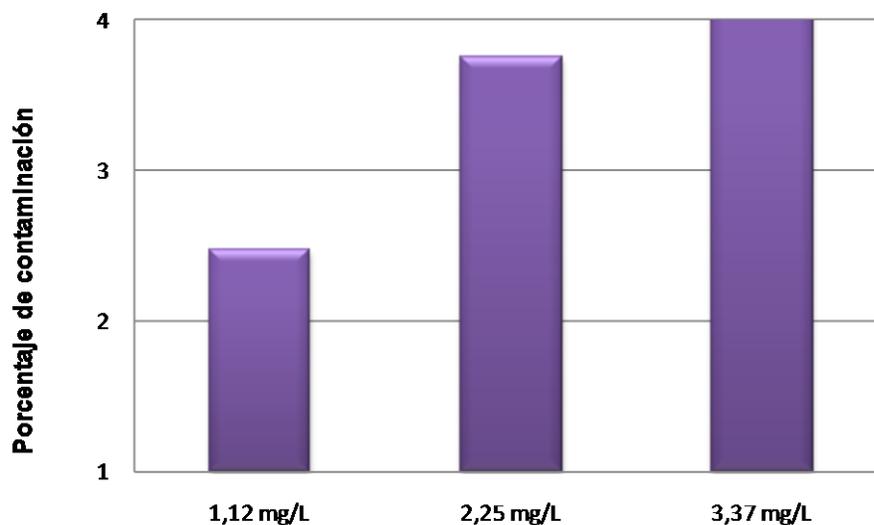


Figura 3.37 Promedios del índice de contaminación para cada dosis de BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

De acuerdo a los ensayos con KIN, el análisis de varianza (Tabla 3.53) determinó los valores de significancia de cada uno de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.53 Análisis de varianza para el índice de contaminación según ensayos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	112,05	5	22,41	2,18	,017
Med_C	15,33	1	15,33	1,49	,053
Dosis_KIN	54,34	2	27,17	2,64	,013
Med_C*Dosis_KIN	66,10	2	33,05	3,22	,010
Error	1487,70	145	10,26		
Total	1623,47	155			

Los resultados establecen que la interacción entre medios de cultivo y dosis de KIN muestra significancia estadística (0,010) al igual que las dosis de KIN (0,013)

analizadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,053). Al realizar la prueba SNK al 5% se formaron cuatro rangos de significancia, siendo los tratamientos T1 y T4 aquellos que tenían las dosis más bajas de BAP (1,12 mg/L) y el promedio más bajo para índice de contaminación (Tabla 3.54 y Figura 3.38).

Tabla 3.54 Promedios del índice de contaminación según tratamientos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T1	M1*D1	4,83	a
T2	M1*D2	4,91	a
T3	M1*D3	5,66	b
T4	M2*D1	5,94	b c
T5	M2*D2	6,25	c
T6	M2*D3	6,61	c

El tratamiento 1 estableció el mejor promedio estadístico (6,61%) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 5 y 6 mostraron los promedios más bajos (4,91%) y (4,83%) con relación a los otros tratamientos (Figura 3.38).

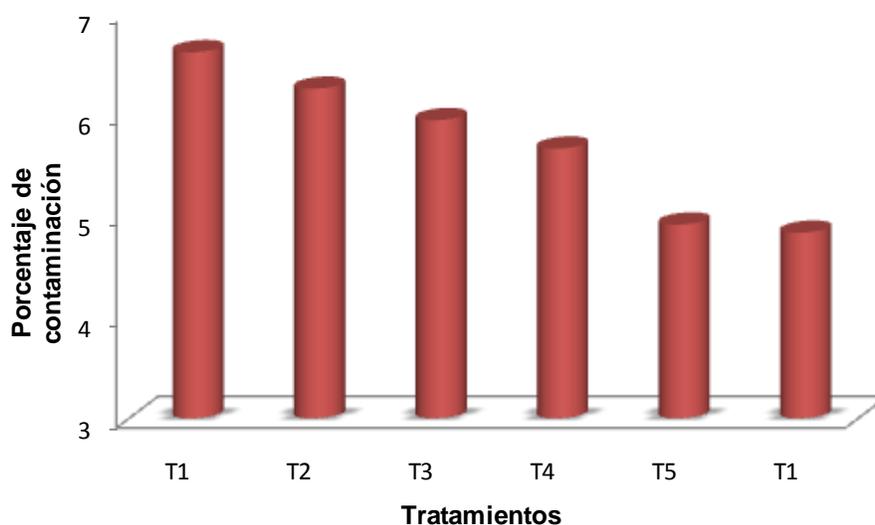


Figura 3.38 Promedios del índice de contaminación según ensayos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

En relación a los medios de cultivo analizados, la prueba SNK al 5% determinó que el medio MSVG presentó el mejor promedio para porcentaje de contaminación en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.55 y Figura 3.39).

Tabla 3.55 Promedios del índice de contaminación en ambos medios de cultivo según ensayos con KIN mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio
MSVG	M1	6,26
MSVG/2	M2	7,70

El promedio más alto según índice de contaminación fue para los ensayos con el medio MSVG/2 (7,70%) a diferencia de MSVG, cuyo valor (6,26%) fue menor para esta variable (Figura 3.39).

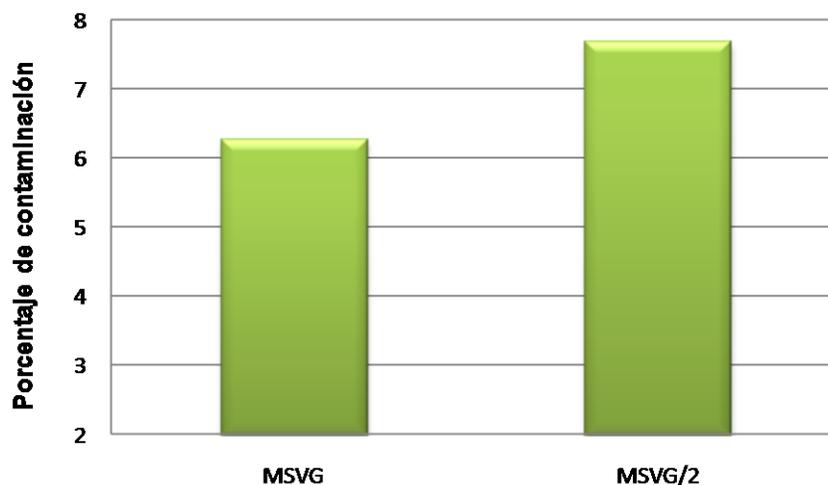


Figura 3.39 Promedios de porcentaje de contaminación para cada medio de cultivo según ensayos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Las dosis de KIN fueron evaluadas con la prueba SNK al 5% estableciendo dos rangos de significancia donde se observó que la dosis D1 presentó el menor promedio del índice de contaminación (5,39%) a diferencia de la dosis D3 cuyo promedio fue el más alto (6,43%) de todos los ensayos (Tabla 3.56).

Tabla 3.56 Promedios de índices de contaminación según dosis de KIN con la prueba SNK al 5%.

Dosis KIN	Codificación	Promedio	Rango de significancia
1,12 mg/L	D1	5,39	A
2,25 mg/L	D2	5,58	a
3,37 mg/L	D3	6,43	B

La dosis más alta de KIN (3,37 mg/L) mostró el promedio más alto para índice de contaminación (6,43%) en comparación con las dosis más bajas del ensayo (2,25 mg/L) y (1,12 mg/L) cuyos promedios fueron iguales (5,58%) y (6,43%) respectivamente. (Tabla 3.56 y Figura 3.40).

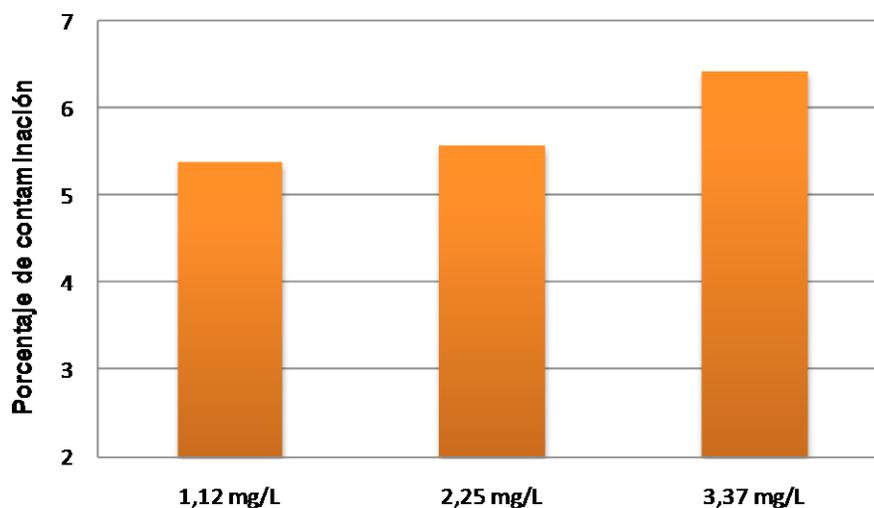


Figura 3.40 Promedios del índice de contaminación para cada dosis de KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Referente a los tratamientos con BRS, los resultados se presentaron a través de un análisis de varianza (Tabla 3.57) cuyos resultados indican la significancia de cada uno de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.57 Análisis de varianza para el índice de contaminación según ensayos con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	145,95	5	29,19	1,64	,063
Med_C	23,76	1	23,76	1,33	,070
Dosis_BRS	79,62	2	39,81	2,23	,0039
Med_C*Dosis_BRS	82,72	2	41,63	2,33	,0021
Error	2499,00	140	17,85		
Total	2685,10	145			

Los resultados determinan que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BRS muestra significancia estadística (0,0021) al igual que las dosis de BRS (0,0039) analizadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,070). Al realizar la prueba SNK al 5% se formaron cuatro rangos de significancia, siendo los tratamientos T1 y T4 aquellos que tenían las dosis más bajas de BRS (1,12 mg/L) y el promedio más bajo para índice de contaminación (Tabla 3.58 y Figura 3.41).

Tabla 3.58 Porcentajes de contaminación según ensayos con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T1	M1*D1	3,86	a
T4	M2*D1	4,03	a
T2	M1*D2	4,36	b
T5	M2*D2	4,45	b c
T3	M1*D3	5,91	c
T6	M2*D3	6,06	c

El tratamiento 1 estableció el mejor promedio estadístico (6,06%) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 3 y 6 mostraron los promedios más bajos (4,03%) y (3,86%) con relación a los otros tratamientos (Figura 3.41).

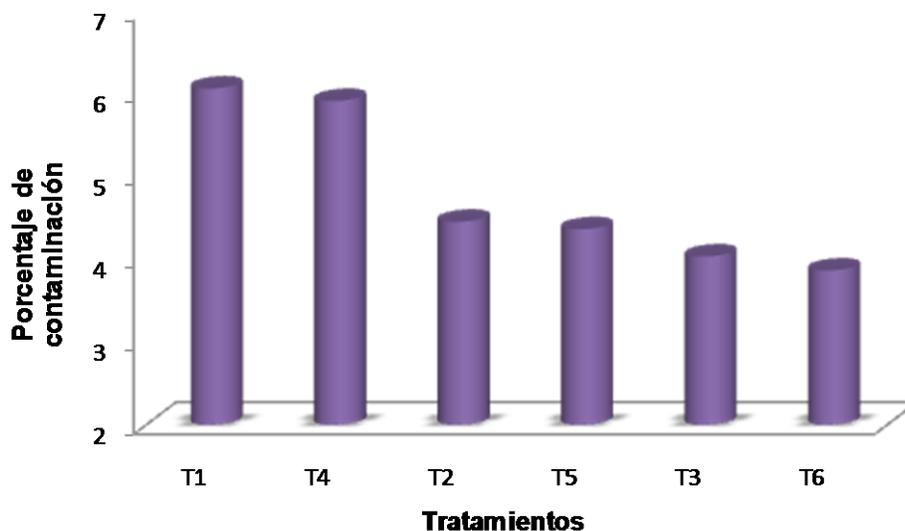


Figura 3.41 Promedios del índice de contaminación según ensayos con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

En relación a los medios de cultivo analizados, la prueba SNK al 5% determinó que el medio MSVG presentó el mejor promedio para porcentaje de contaminación en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.59 y Figura 3.42).

Tabla 3.59 Promedios del índice de contaminación en ambos medios de cultivo según ensayos con BRS mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio
MSVG	M1	4,71
MSVG/2	M2	4,90

El promedio más alto según índice de contaminación fue para los ensayos con el medio MSVG/2 (4,90%) a diferencia de MSVG, cuyo valor (4,71%) fue menor para esta variable (Figura 3.42).

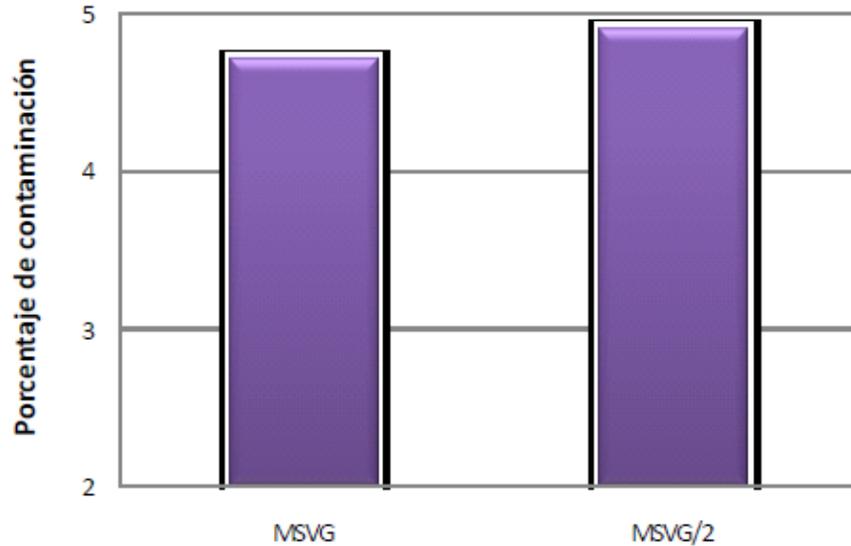


Figura 3.42 Promedios del porcentaje de contaminación para cada medio de cultivo según ensayos con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

Las dosis de BRS fueron evaluadas con la prueba SNK al 5% estableciendo dos rangos de significancia donde se observó que la dosis D1 presentó el menor promedio del índice de contaminación (3,95%) a diferencia de la dosis D3 cuyo promedio fue el más alto (4,76%) de todos los ensayos (Tabla 3.60).

Tabla 3.60 Promedios del índice de contaminación según dosis de BRS con la prueba SNK al 5%.

Dosis BRS	Codificación	Promedios	Rango de significancia
0,4 ppm	D1	3,95	a
0,8 ppm	D2	4,41	b
1,2 ppm	D3	4,76	b

La dosis más alta de BRS (1,2 ppm) determinó el promedio más alto para índice de contaminación (4,76%) en comparación con las dosis más bajas del ensayo (0,8 ppm) y (1,2 ppm) cuyos promedios fueron iguales (4,41%) y (4,76%) respectivamente. (Tabla 3.60 y Figura 3.43).

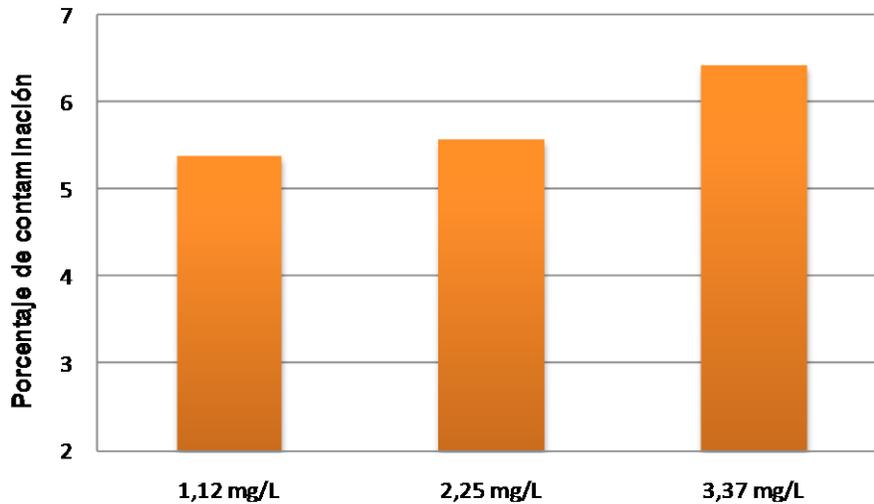


Figura 3.43 Promedios del índice de contaminación para cada dosis de BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

3.3.4. Índice de brotación

Con respecto al índice de brotación, se observaron y contaron el número de nudos de cada uno de los explantes en los de acuerdo a los ensayos con BAP, KIN y BRS. Por otro lado, la distancia entre nudos fue medida con una regla milimetrada.

Estos dos datos fueron necesarios para encontrar el índice de brotación. Los resultados se presentan de acuerdo al análisis de varianza (Tabla 3.61) cuyos resultados indican la significancia de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.61 Análisis de varianza para el índice de brotación según ensayos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	1148,48	5	229,69	2,20	,056
Med_C	125,62	1	125,62	1,81	,061
Dosis_BAP	478,26	2	239,13	2,76	,004
Med_C*Dosis_BAP	544,60	2	272,30	2,98	,000
Error	16771,37	161	104,17		
Total	17919,85	166			

Los resultados determinan que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BAP muestra significancia estadística (0,000) al igual que las dosis de BRS (0,004) analizadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,061).

Al realizar la prueba SNK al 5% se formaron dos rangos de significancia, siendo los tratamientos T3 y T6 aquellos que tenían las dosis más altas de BAP (3,37 mg/L) y el promedio más alto para índice de brotación (Tabla 3.62 y Figura 3.44).

Tabla 3.62 Rangos de significancia para índice de brotación según ensayos con BAP dada por la prueba SNK al 5%.

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T3	M1*D3	3,03	a
T6	M2*D3	2,97	a
T2	M1*D2	2,60	b
T5	M2*D2	2,42	b
T1	M1*D1	2,36	b
T4	M2*D1	2,17	b

Con respecto a los valores de las medias de cada tratamiento, se observó que el tratamiento 3 obtuvo el mejor promedio estadístico (3,47) para los individuos evaluados en

los ensayos con BAP. En comparación con otros tratamientos, el tratamiento 4 presentó un valor de 2,17 siendo éste el más bajo para esta variable (Figura 3.44).

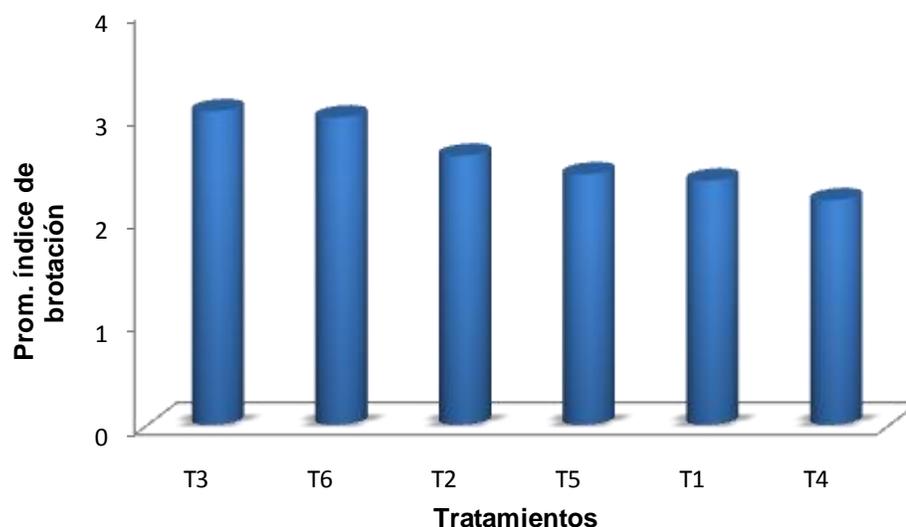


Figura 3.44 Promedios de índice de brotación según tratamientos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

En relación a los medios de cultivo analizados, la prueba SNK al 5% determinó que el medio MSVG presentó el mejor promedio para índice de brotación en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.63 y Figura 3.45).

Tabla 3.63 Promedios del índice de brotación en ambos medios de cultivo según ensayos con BAP mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio
MSVG	M1	2,66
MSVG/2	M2	2,52

El promedio más alto según índice de brotación fue para los ensayos con el medio MSVG (2,66%) a diferencia de MSVG/2, cuyo valor (2,52%) fue menor para esta variable (Figura 3.45).

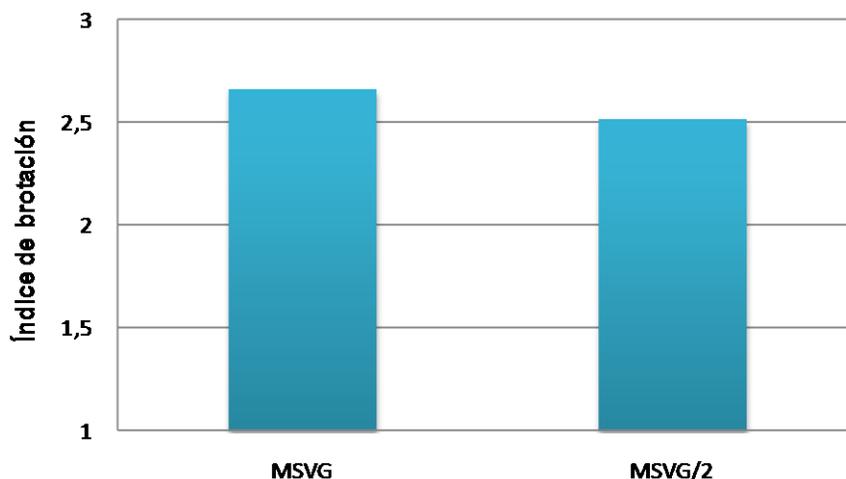


Figura 3.45 Promedios del porcentaje de brotación para cada medio de cultivo según ensayos con BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

Las dosis de BAP fueron evaluadas con la prueba SNK al 5% estableciendo dos rangos de significancia donde se observó que la dosis D1 presentó el menor promedio del índice de brotación (2,27%) a diferencia de la dosis D3 cuyo promedio fue el más alto (3,00%) de todos los ensayos (Tabla 3.64).

Tabla 3.64 Promedios de índices de brotación según dosis de BAP con la prueba SNK al 5%.

Dosis BAP	Codificación	Promedios	Rango de significancia
3,37 mg/L	D3	3,00	a
2,25 mg/L	D2	2,51	b
1,12 mg/L	D1	2,27	b

La dosis más alta de BAP (3,37 mg/L) determinó el promedio más alto para índice de brotación (3,00%) en comparación con las dosis más bajas del ensayo (2,25 mg/L) y (1,12 mg/L) cuyos promedios fueron iguales (2,51%) y (2,27%) respectivamente. (Tabla 3.64 y Figura 3.46).

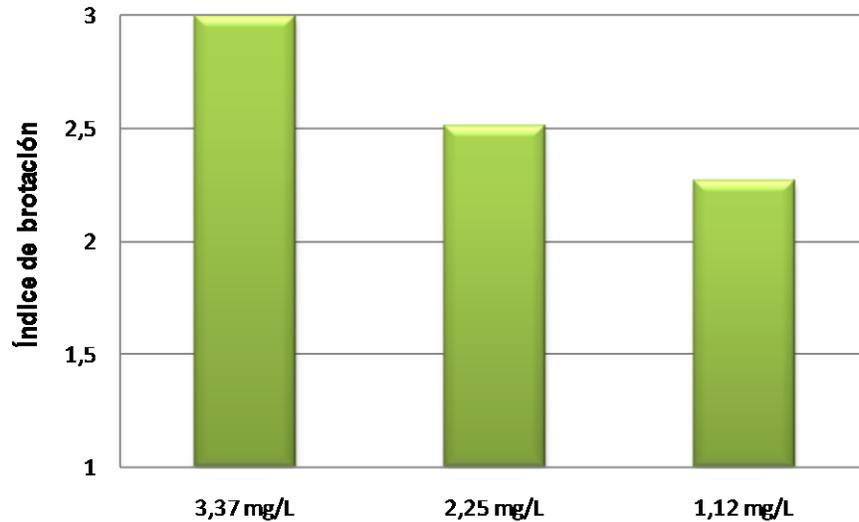


Figura 3.46 Promedios del índice de brotación para cada dosis de BAP en la fase de multiplicación *in vitro*.

De acuerdo a los ensayos con KIN, el análisis de varianza (Tabla 3.65) determinó los valores de significancia de cada uno de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.65 Análisis de varianza para el índice de brotación según ensayos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	1589,94	5	317,98	2,73	,007
Med_C	224,78	1	224,78	1,93	,068
Dosis_KIN	686,44	2	343,22	2,95	,0026
Med_C*Dosis_KIN	678,72	2	339,36	2,42	,0021
Error	17404,50	150	116,03		
Total	18994,44	155			

Los resultados determinan que la interacción entre medios de cultivo y dosis de KIN muestra significancia estadística (0,0021) al igual que las dosis de KIN (0,0026) analizadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,068).

Al realizar la prueba SNK al 5% se formaron cuatro rangos de significancia, siendo los tratamientos T3 y T6 aquellos que tenían las dosis más altas de BAP (3,37 mg/L) y el promedio más alto para índice de brotación (Tabla 3.66 y Figura 3.47).

Tabla 3.66 Rangos de significancia para índice de brotación según ensayos con KIN dada por la prueba SNK al 5%.

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T1	M1*D1	4,05	a
T2	M1*D2	3,91	a
T3	M1*D3	3,56	a b
T4	M2*D1	3,45	b
T5	M2*D2	3,02	b
T6	M2*D3	2,88	b c

El tratamiento 1 estableció el mejor promedio estadístico (4,05) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 5 y 6 mostraron los promedios más bajos (3,02) y (2,88) con relación a los otros tratamientos (Figura 3.47).

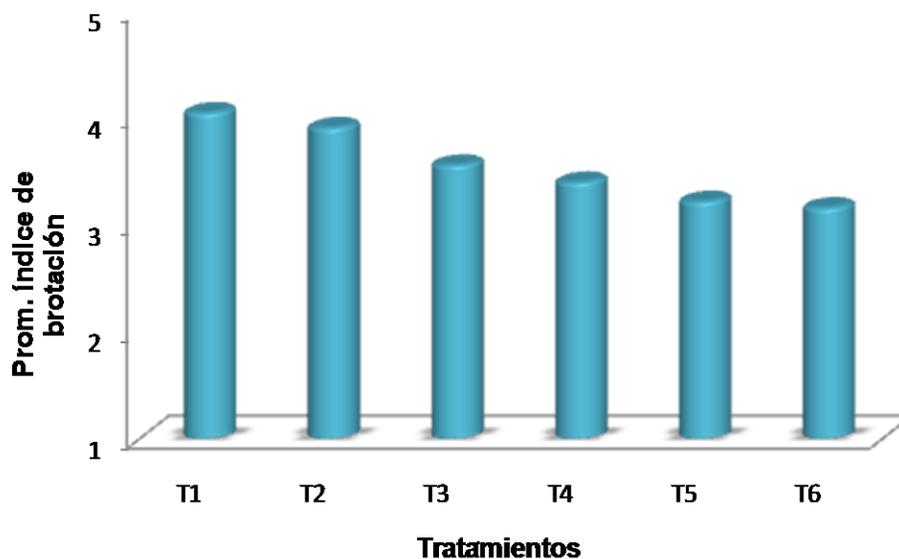


Figura 3.47 Promedio de índice de brotación según tratamientos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*

En relación a los medios de cultivo analizados, la prueba SNK al 5% determinó que el medio MSVG presentó el mejor promedio para índice de brotación en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.67 y Figura 3.48).

Tabla 3.67 Promedios del índice de brotación en ambos medios de cultivo según ensayos con KIN mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio
MSVG	M1	3,84
MSVG/2	M2	3,11

El promedio más alto según índice de brotación fue para los ensayos con el medio MSVG (3,84%) a diferencia de MSVG/2, cuyo valor (3,11%) fue menor para esta variable (Figura 3.48).

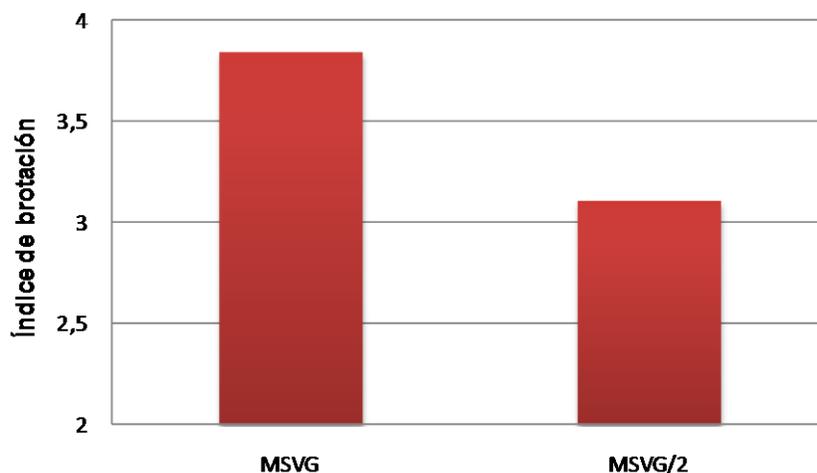


Figura 3.48 Porcentajes de brotación para cada medio de cultivo según ensayos con KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Las dosis de KIN fueron evaluadas con la prueba SNK al 5% estableciendo dos rangos de significancia donde se observó que la dosis D1 presentó el menor promedio del

índice de contaminación (3,62%) a diferencia de la dosis D3 cuyo promedio fue el más alto (3,35%) de todos los ensayos (Tabla 3.68).

Tabla 3.68 Promedios de índices de brotación según dosis de KIN con la prueba SNK al 5%.

Dosis KIN	Codificación	Promedios	Rango de significancia
1,12 mg/L	D1	3,72	a
2,25 mg/L	D2	3,47	b
3,37 mg/L	D3	3,35	b

La dosis más baja de KIN (1,12 mg/L) determinó el promedios más alto para índice de brotación (3,72%) en comparación con las dosis más altas del ensayo (1,12 mg/L) y (3,37 mg/L) cuyos valores fueron iguales (3,47%) y (3,35%) respectivamente (Tabla 3.68 y Figura 3.49).

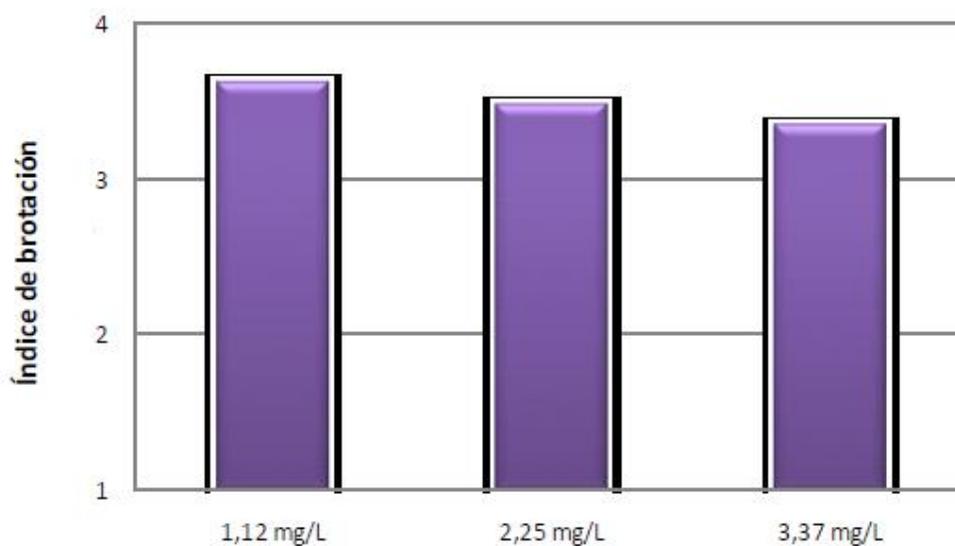


Figura 3.49 Promedios del índice de brotación para cada dosis de KIN en la fase de multiplicación *in vitro*.

Referente a los tratamientos con BRS, los resultados se presentaron a través de un análisis de varianza (Tabla 3.69) estableció los valores de significancia de cada uno de los factores evaluados y su interacción.

Tabla 3.69 Análisis de varianza para el índice de brotación según ensayos con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Tratamiento	1492,83	5	298,56	2,54	,002
Med_C	119,23	1	119,23	1,02	,054
Dosis_BRS	681,90	2	340,95	2,90	,000
Med_C*Dosis_BRS	691,70	2	345,85	2,94	,007
Error	15839,55	135	117,33		
Total	2532,98	145			

Los resultados indican que la interacción entre medios de cultivo y dosis de BRS muestra significancia estadística (0,007) al igual que las dosis de BRS (0,000) analizadas. Por otro lado, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,054).

Al realizar la prueba SNK al 5% se formaron dos rangos de significancia, siendo los tratamientos T1 y T4 aquellos que tenían las dosis más bajas de BRS (0,4 ppm) y el promedio más alto para índice de brotación (Tabla 3.70 y Figura 3.50).

Tabla 3.70 Presentación de medias para índice de brotación según ensayos con BRS dada por la prueba SNK al 5%.

Tratamientos	Codificación	Promedio	Rango de significancia
T1	M1*D1	4,12	a
T4	M2*D1	4,03	a
T2	M1*D2	3,98	a
T5	M2*D2	3,36	b
T3	M1*D3	3,27	b
T6	M2*D3	3,10	b

El tratamiento 1 estableció el promedio estadístico más alto (4,12) para los individuos evaluados en esta variable. Mientras que los tratamientos 3 y 6 mostraron los promedios más bajos (3,27) y (3,10) con relación a los otros tratamientos (Figura 3.50).

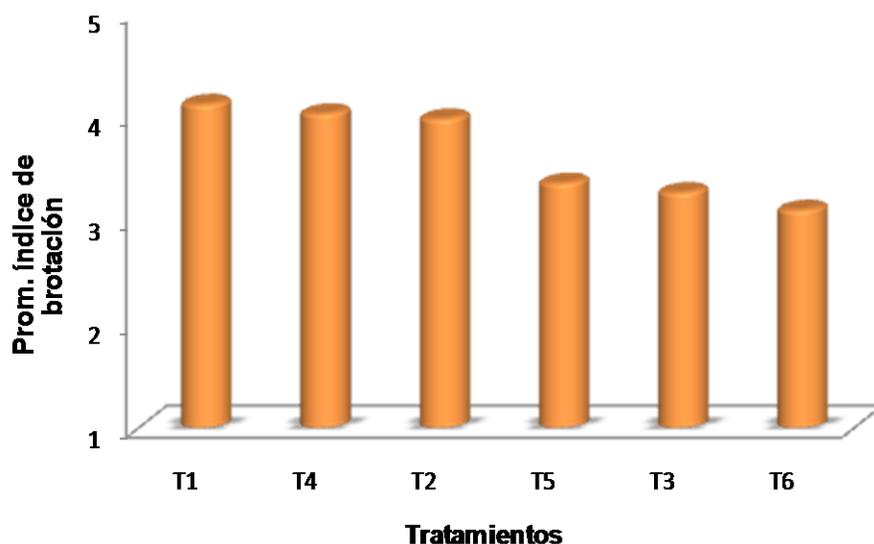


Figura 3.50 Promedio de índice de brotación de acuerdo a cada tratamiento con BRS utilizado en la fase de multiplicación *in vitro*.

En relación a los medios de cultivo analizados, la prueba SNK al 5% determinó que el medio MSVG presentó el mejor promedio para índice de brotación en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue el más bajo (Tabla 3.71 y Figura 3.51).

Tabla 3.71 Promedios del índice de brotación en ambos medios de cultivo según ensayos con KIN mediante la prueba SNK al 5%.

Medio de cultivo	Codificación	Promedio
MSVG	M1	3,79
MSVG/2	M2	3,48

El promedio más alto según índice de brotación fue para los ensayos con el medio MSVG (3,79%) a diferencia de MSVG/2, cuyo valor (3,48%) fue menor para esta variable (Figura 3.48).

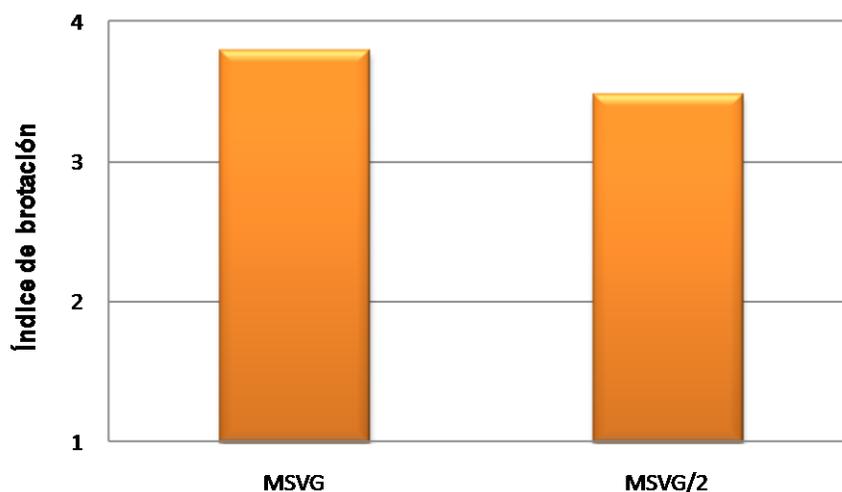


Figura 3.51 Porcentajes de brotación para cada medio de cultivo según ensayos con BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

Las dosis de BRS fueron evaluadas con la prueba SNK al 5% estableciendo dos rangos de significancia donde se observó que la dosis D1 presentó el mayor promedio del índice de brotación (4,08%) a diferencia de la dosis D3 cuyo valor fue el más bajo (3,41%) de todos los ensayos (Tabla 3.72).

Tabla 3.72 Promedios de índices de brotación según dosis de BRS con la prueba SNK al 5%.

Dosis BRS	Codificación	Promedios	Rango de significancia
0,4 ppm	D1	4,08	a
0,8 ppm	D2	3,67	b
1,2 ppm	D3	3,41	b

La dosis más baja de BRS (0,4 ppm) determinó el promedio más alto para índice de brotación (4,08%) en comparación con las dosis más altas del ensayo (0,8 ppm) y (1,2 ppm) cuyos promedios fueron iguales (3,67%) y (3,41%) respectivamente. (Tabla 3.70 y Figura 3.52).

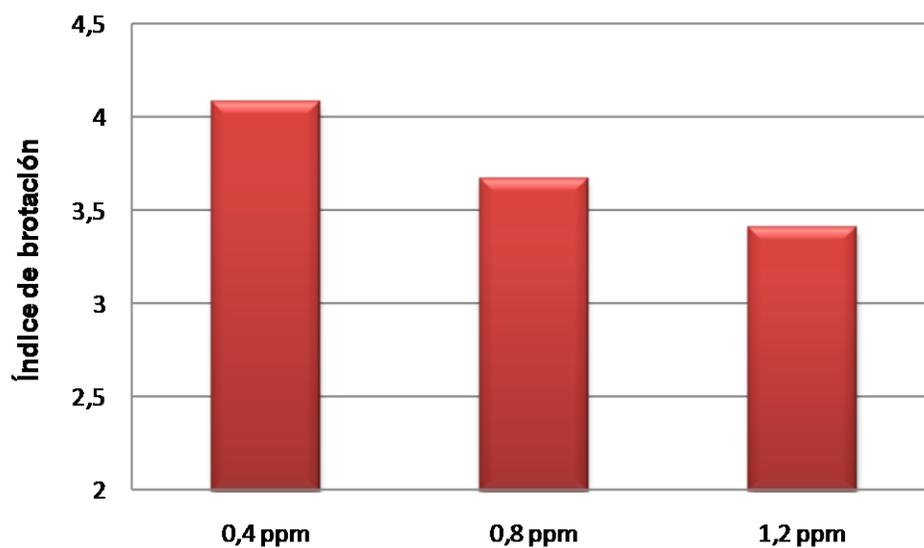


Figura 3.52 Promedios del índice de brotación para cada dosis de BRS en la fase de multiplicación *in vitro*.

CAPITULO 4: DISCUSIÓN

4.1. Fase I: Desinfección de explantes

En esta fase del proyecto, los porcentajes globales de supervivencia y mortalidad, entendidos como contaminación y descarte, en medio MSVG fueron de 64,2% y 35,8% respectivamente. Respecto de MSVG/2, los porcentajes obtenidos fueron 65% y 35% con lo cual se podría inferir igualdad entre ambos medios debido a que no hubo influencia de la concentración de sales inorgánicas en la supervivencia, contaminación y descarte de los explantes. En este caso, el medio MSVG/2 contiene la mitad de sales inorgánicas en comparación con MSVG.

La concentración de nutrientes y sales inorgánicas en el medio de cultivo pueden modificarse de acuerdo a formulaciones establecidas o experimentales que establecen la dosificación ideal para una especie o etapa *in vitro* determinada (Berthouly & Guzman, 1985).

Debergh (1982) explica que, el medio MSVG, es altamente utilizado cuando el objetivo es regenerar plantas. En este sentido, existen numerosas variaciones comerciales de este medio. Por tanto, existe una combinación ideal de macro, micronutrientes y vitaminas que permitiría un desarrollo vegetativo superior en comparación con otros medios de cultivo.

Respecto de los medios de cultivo evaluados, el análisis estadístico determinó que los explantes sembrados tanto MSVG como MSVG/2, tienen el mismo comportamiento (Tabla 3.2 y Tabla 3.3) lo cual aumenta el porcentaje de supervivencia y disminuye consecuentemente la mortalidad. Esto, a pesar de que MSVG/2 posee la mitad de sales inorgánicas en comparación con MSVG.

Por tanto, para la obtención masiva de plantas, se podría intuir que el costo de este proceso se reduce cuando al utilizar MSVG/2 obtengo los mismos resultados respecto de supervivencia y mortalidad que con MSVG.

Por otra parte, al evaluar cada uno de los tratamientos, el T4² presentó el mayor índice de supervivencia, tanto para el medio MSVG (70%) como para el medio MSVG/2 (76,7%). El índice de mortalidad para ambos medios fue de 30% y 23,3% respectivamente. En este contexto, el T1³ presentó los porcentajes de supervivencia más bajos y los índices más altos de mortalidad (Tabla 3.1). Esto indicaría que el tiempo de exposición y la concentración de cloro tendrían una relación directamente proporcional con el porcentaje de supervivencia entre tratamientos como los afirma George & Sherrington (1984) en su disertación sobre desinfección de estacas de cerezo.

Referente al índice de contaminación bacteriana, el T4 nuevamente fue el ensayo más efectivo con bajos porcentajes en MSVG (0%) y MSVG/2 (6,7%). En el caso de los tratamientos T2⁴ y T3⁵ en ambos medios se obtuvieron índices iguales de contaminación (2,2% y 10%) respectivamente. En este caso, el mayor tiempo de exposición y concentración de cloro disminuyó considerablemente los valores de contaminación. Por otro lado, el valor de la prueba chi-cuadrado fue significativo (0,001) determinando que los tratamientos en MSVG y MSVG/2 influyeron en la contaminación bacteriana (Tabla 3.7).

Respecto del índice de contaminación fúngica entre tratamientos, este presentó algunas discrepancias en el medio MSVG. El T1 obtuvo un índice de contaminación de 20% menor al obtenido por el T4 equivalente a 26,7%. Este resultado podría deberse a una fuente de contaminación externa (cámara de flujo, instrumentos, etc.) lo cual pudo haber incidido en el aumento del porcentaje de contaminación en el T4.

² T4 (2,0% [Cl] – 15 minutos)

³ T1(1,5% [Cl] – 10 minutos)

⁴ T2 (1,5% [Cl] – 15 minutos)

⁵ T3 (2,0% [Cl] – 10 minutos)

En el medio MSVG/2 el tratamiento 1 tuvo un índice mayor de contaminación fúngica (26,7%) en comparación con el tratamiento 4 (10%). Estos valores son consistentes con aquellos analizados anteriormente (supervivencia y contaminación bacteriana). El análisis estadístico estableció que los tratamientos en MSVG y MSVG/2 influyeron en la contaminación por hongos (Tabla 3.7).

En relación al porcentaje de descarte, la prueba chi- cuadrado no fue significativa (0,3) lo que indicaría que los tratamientos de desinfección en MSVG y MSVG/2 no influyeron en esta variable. Sin embargo, el T4 en MSVG presentó un índice del 0%, mientras que en MSVG/2 se observó un 6,7%. Este valor podría suponer una fuente de contaminación que alteró el índice de descarte para este medio de cultivo.

4.2. Fase II: Establecimiento *in vitro* de explantes

4.2.1 Longitud de brote

En esta fase, se evaluaron los brotes de cada uno de los explantes mediante varias dosis de BAP (0; 0,56; 1,12 y 1,68 mg/L) en MSVG y MSVG/2. A pesar de que los medios de cultivo no resultaron estadísticamente significativos (0,070), la interacción entre dosis de BAP*medios de cultivo fue altamente significativa (0,000), determinando así que la longitud de brotes difiere por la interacción entre dosis de BAP y medios de cultivo.

Igualmente, el valor de la significancia para dosis de BAP (0,001) muestra que el comportamiento de éstas influye sobre la longitud de brotes por explante.

La prueba SNK al 5% identificó tres grupos estadísticamente diferentes para las dosis de BAP, donde se observó que las dosis D1 (0 mg/L) y D2 (0,56 mg/L) presentaron la mayor longitud de brotes (13,36mm) y (13,15 mm), a diferencia de la dosis más alta D4 (1,68 mg/L) cuyo promedio fue el más bajo de todos los ensayos (6,90 mm). En este caso, la ausencia o bajas concentraciones de BAP forman brotes más largos.

Estos resultados concuerdan con Ikekawa & Zhao (1991), quienes mencionan que la aplicación de bajas dosis de BAP mejoran la elongación celular en procesos *in vitro*.

Referente a los medios de cultivo, MSVG/2 presentó el mejor promedio para esta variable (11,03 mm) en comparación con MSVG cuyo promedio fue 9,99 mm, es decir que la reducción de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría favorecer el crecimiento vegetativo de los explantes.

4.2.2 Número de yemas basales por brote

Para el número de número de yemas basales por brote, el análisis de varianza presentó significancia estadística para la interacción entre dosis de BAP*medios de cultivo (0,0013) estableciendo que ambos factores influyen en el desarrollo de yemas basales. Las dosis de BAP también presentaron alta significancia (0,002). Esto indicaría que la concentración de BAP está relacionada con la obtención de yemas basales.

Posteriormente, la prueba SNK al 5% estableció tres grupos estadísticamente diferentes para las dosis de BAP, donde se observó la dosis D1 (0 mg/L) presentó la mayor cantidad de yemas basales por brote (1,25) y (1,12), a diferencia de la dosis más alta D4 (1,68 mg/L) cuyo promedio fue el más bajo de todos los ensayos (0,55). En este caso, dosis intermedias (0,56 mg/L y 1,12 mg/L) presentaron promedios iguales (0,93 y 0,76).

Con respecto a los medios de cultivo, MSVG/2 presentó el mejor promedio para esta variable (0,91) con relación a MSVG, cuyo promedio fue 0,79, es decir que la reducción de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría ayudar a incrementar la formación de yemas basales.

4.2.3 Índice de contaminación

De acuerdo con el índice de contaminación, el análisis estadístico determinó significancia estadística para la interacción entre dosis de BAP*medios de cultivo (0,0001), es decir, ambos factores participan en la contaminación. Consecuentemente, los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,065). Esto mostraría que estos no tienen relación con el porcentaje de contaminación.

De esta manera determinamos que las dosis de BAP y medios de cultivo siguen interactuando entre sí 21 días después de la siembra.

Por otro lado, la prueba SNK al 5% presentó dos grupos estadísticamente diferentes para las dosis de BAP, donde se observó la dosis D1 (0 mg/L) mostró el menor porcentaje por contaminación (4,10%), a diferencia de la dosis más alta D4 (1,68 mg/L) cuyos tratamientos determinaron los promedios más altos (9,40%) y (11,20%), con lo cual se podría establecer que bajas concentraciones de BAP disminuyen los porcentajes de contaminación significativamente y como menciona Andrade *et al.* (1996) mantener cultivo *in vitro* viables.

Con respecto a los medios de cultivo, MSVG presentó el mejor promedio para esta variable (6,63%) con relación a MSVG/2, cuyo promedio fue 9,91%, es decir que la adición completa de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría disminuir los índices de contaminación.

4.2.4 Índice de brotación

Con respecto al índice de brotación, los resultados del análisis de varianza mostraron significancia estadística para la interacción entre dosis de BAP*medios de cultivo (0,001), estableciendo que esta variable difiere por la interacción entre ambos

factores. Igualmente, las dosis de BAP presentaron significancia estadística (0,004), lo que indicaría que la concentración de BAP influye en el porcentaje de brotación.

Por otra parte, la prueba SNK al 5% presentó tres grupos estadísticamente diferentes para las dosis de BAP, donde se observó que los tratamientos con la dosis D1 (0 mg/L) mostraron los porcentajes más altos para brotación (4,28%) y (4,01%), a diferencia de la dosis más alta D4 (1,68 mg/L) cuyos tratamientos determinaron los promedios más bajos (1,95%) y (1,80%), con lo cual se podría establecer que bajas concentraciones de BAP podrían favorecer a la formación de nudos, y por ende, el índice de brotación.

Con respecto a los medios de cultivo, MSVG/2 presentó el mejor promedio para esta variable (3,23%) con relación a MSVG, cuyo promedio fue 2,98%, es decir que la reducción de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría mejorar el número de nudos en cada uno de los brotes.

4.3. Fase III: Multiplicación *in vitro* de explantes

4.3.1. Longitud de brote

En esta última fase, se utilizaron varias concentraciones de BAP, KIN (1,12; 2,25 y 3,37 mg/L) y BRS (0,4; 0,8 y 1,2 ppm) en MSVG y MSVG/2. El análisis estadístico para los ensayos con BAP determinó que los medios de cultivo no presentaron significancia estadística (0,070), mientras que la interacción entre dosis de BAP*medios de cultivo fue altamente significativa (0,0025), estableciendo que la longitud de brotes difiere por la interacción entre dosis de BAP y medios de cultivo.

De igual manera, el valor de la significancia para dosis de BAP (0,004) muestra que el comportamiento de éstas influye sobre la longitud de brotes.

A continuación, la prueba SNK al 5% identificó tres grupos estadísticamente diferentes para las dosis de BAP, donde se observó que los tratamientos con la dosis D3

(3,37 mg/L) presentó la mayor longitud de brotes (6,33 mm) y (5,98 mm), a diferencia de los tratamientos con la dosis más baja D1 (1,12 mg/L) cuyos promedios fueron los más bajos (4,15 mm) y (3,55 mm) respectivamente. En este caso, altas concentraciones de BAP podrían mejorar el desarrollo de brotes.

De acuerdo con los medios de cultivo, MSVG presentó el mejor promedio para esta variable (5,16 mm) en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue 4,80 mm, es decir que el uso completo de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría favorecer el crecimiento vegetativo de los explantes en la etapa de multiplicación *in vitro*.

Referente a las dosis de KIN y BRS, el análisis estadístico para los ensayos determinó que la interacción entre dosis*medios de cultivo fue altamente significativa (0,000) y (0,015) respectivamente, estableciendo que la longitud de brotes difiere por la interacción entre dosis de biorreguladores y medios de cultivo.

Seguidamente, la prueba SNK al 5% identificó dos grupos estadísticamente diferentes para las dosis de KIN y BRS, donde se observó que la dosis D1 (1,12 mg/L) y (0,4 ppm) presentaron el menor promedio para longitud de brotes (9,20 mm) y (8,11 mm) respectivamente a diferencia de los tratamientos con la dosis más alta D3 (3,37 mg/L) y (1,2 ppm) cuyos promedios fueron los más bajos. En la evaluación de esta variable, el mejor tratamiento fue T1 (1,12 mg/L KIN en MSVG/2) el cual presentó mayor longitud de brotes.

Referente a los medios de cultivo, MSVG/2 presentó el mejor promedio para longitud de brotes con KIN y BRS (9,52 mm) y (7,09 mm) en comparación con MSVG cuyos promedios fueron más bajos, es decir que el uso completo de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría mejorar el desarrollo vegetativo.

4.3.2. Número de brotes por explante

Para el número de brotes por explante, los resultados para los ensayos con BAP determinaron que la interacción entre dosis de BAP*medios de cultivo fue altamente significativa (0,0000), estableciendo que la cantidad de brotes por explante difiere por la interacción entre dosis de BAP y medios de cultivo.

A continuación, la prueba SNK al 5% identificó dos grupos estadísticamente diferentes para las dosis de BAP, donde se observó que la dosis D3 (3,37 mg/L) presentó el mayor número de brotes por explante (1,76), a diferencia de los tratamientos con la dosis más baja D1 (1,12 mg/L) cuyo promedio fue el más bajo (1,14). En este caso, altas concentraciones de BAP podrían mejorar el número de brotes por explantes.

Con respecto a los medios de cultivo, MSVG presentó el mejor promedio para esta variable (5,16 mm) en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue 4,80 mm, es decir que el uso completo de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría favorecer la formación de brotes por explante en la etapa de multiplicación *in vitro*.

Referente a las dosis de KIN y BRS, el análisis estadístico para los ensayos determinó que la interacción entre dosis*medios de cultivo fue altamente significativa (0,000) y (0,002) respectivamente, estableciendo que la interacción entre dosis de biorreguladores y medios de cultivo influye en el número de brotes por explante.

A continuación, la prueba SNK al 5% identificó dos grupos estadísticamente diferentes para las dosis de KIN y BRS, donde se observó que las dosis D1 (1,12 mg/L) y (0,4 ppm) presentaron el menor promedio para longitud de brotes (2,31) y (2,01) respectivamente, a diferencia de los tratamientos con la dosis más alta D3 (3,37 mg/L) y (1,2 ppm) cuyos promedios fueron los más bajos. Este tipo de respuesta había sido reportada en variedades ornamentales donde las dosis más bajas de KIN presentaron mayor cantidad de brotes (Espinosa *et al*, 2003)

Con respecto a los medios de cultivo, MSVG/2 presentó el mejor promedio para número de brotes con KIN y BRS (2,34) y (2,01) en comparación con MSVG cuyos promedios fueron más bajos, es decir que el uso completo de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría mejorar la formación de brotes. De acuerdo a esta variable, el mejor tratamiento fue T1 (1,12 mg/L KIN en MSVG/2) el cual presentó la mayor cantidad de brotes.

4.3.3. Índice de contaminación

De acuerdo con el índice de contaminación, los resultados para los ensayos con BAP determinaron que la interacción entre dosis de BAP*medios de cultivo fue altamente significativa (0,003), estableciendo que la cantidad de brotes por explante difiere por la interacción entre dosis de BAP y medios de cultivo.

A continuación, la prueba SNK al 5% identificó dos grupos estadísticamente diferentes para las dosis de BAP, donde se observó que la dosis D1 (1,12 mg/L) presentó el menor porcentaje de contaminación (2,48%), a diferencia de los tratamientos con la dosis más baja D3 (3,37 mg/L) cuyo promedio fue el más alto (4,10%). En este caso, bajas concentraciones de BAP podrían disminuir el índice de contaminación.

Con respecto a los medios de cultivo, MSVG presentó el mejor promedio para esta variable (4,83%) en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue más alto (5,19%), es decir que el uso completo de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría disminuir el porcentaje de contaminación en la etapa de multiplicación *in vitro*.

De acuerdo con las dosis de KIN y BRS, el análisis estadístico para los ensayos determinó que la interacción entre dosis*medios de cultivo fue altamente significativa (0,010) y (0,0021) respectivamente, estableciendo que la interacción entre dosis de biorreguladores y medios de cultivo influye en el índice de contaminación.

A continuación, la prueba SNK al 5% identificó dos grupos estadísticamente diferentes para las dosis de KIN y BRS, donde se observó que las dosis D1 (1,12 mg/L) presentaron el menor promedio para índice de contaminación (5,39%) y (3,95%) a diferencia de los tratamientos con la dosis más alta D3 (3,37 mg/L) cuyos promedios (6,43%,) y (4,76%) fueron los más altos respectivamente.

Con respecto a los medios de cultivo, MSVG/2 presentó el mejor promedio para longitud de brotes con KIN y BRS (6,26%) y (4,71%) en comparación con MSVG cuyos promedios fueron más altos, es decir que el uso completo de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría disminuir el porcentaje de contaminación. De acuerdo a esta variable, el mejor tratamiento fue T1 (1,12 mg/L BAP en MSVG/2) el cual presentó menor índice de contaminación.

4.3.4. Índice de brotación

De acuerdo con el índice de brotación, los resultados para los ensayos con BAP determinaron que la interacción entre dosis de BAP*medios de cultivo fue altamente significativa (0,0000), estableciendo que la cantidad de brotes por explante difiere por la interacción entre dosis de BAP y medios de cultivo.

A continuación, la prueba SNK al 5% identificó dos grupos estadísticamente diferentes para las dosis de BAP, donde se observó que la dosis D3 (3,37 mg/L) presentó el mayor índice de brotación (3,00%), a diferencia la dosis más baja D1 (1,12 mg/L) cuyo promedio fue el más bajo (2,27%). En este caso, altas concentraciones de BAP podrían aumentar el número de nudos, y por ende, el índice de brotación.

Con respecto a los medios de cultivo, MSVG presentó el mejor promedio para esta variable (2,66%) en comparación con MSVG/2 cuyo promedio fue 2,52%, es decir que el uso completo de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría favorecer el desarrollo de nudos y la distancia entre ellos.

Referente a las dosis de KIN y BRS, el análisis estadístico para los ensayos determinó que la interacción entre dosis*medios de cultivo fue altamente significativa (0,0021) y (0,007) respectivamente, estableciendo que la interacción entre dosis de biorreguladores y medios de cultivo influye en el número de brotes por explante.

A continuación, la prueba SNK al 5% identificó dos grupos estadísticamente diferentes para las dosis de KIN y BRS, donde se observó que la dosis D1 (1,12 mg/L) y (0,4 ppm) presentaron el mayor índice de brotación (3,72%) y (4,08%) a diferencia de los tratamientos con la dosis más alta D3 (3,37 mg/L) y (1,2 ppm) cuyos promedios fueron los más bajos.

Con respecto a los medios de cultivo, MSVG/2 presentó el mejor promedio para índice de brotación con KIN y BRS (3,84%) y (3,79%) en comparación con MSVG cuyos promedios fueron más bajos, es decir que el uso completo de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría mejorar la formación de brotes. De acuerdo a esta variable, el mejor tratamiento fue T1 (1,12 mg/L BRS en MSVG/2) el cual presentó el mayor índice de brotación.

CAPITULO 5: CONCLUSIONES.

- Se determinó que el tratamiento 4 (2% cloro y 15 minutos) presentó el mayor índice de supervivencia en el medio MSVG y MSVG/2 durante la fase de desinfección. Sin embargo, existió contaminación fúngica y bacteriana debido a que el material vegetal provino directamente de plantas madres de vivero.
- Los porcentajes de contaminación fúngica (10–26,7%) fueron más altos en comparación con aquellos registrados en contaminación bacteriana (3,3– 6,7%) para MSVG y MSVG/2. La utilización de cloro, tween 20 y alcohol en cada uno de los tratamientos disminuyó significativamente los porcentajes de contaminación.
- Se encontró que en la fase de establecimiento *in vitro* para MSVG y MSVG/2, el tratamiento que contenía 0 mg/L BAP fue el más efectivo para la variable longitud de brote, ya que los valores de las medias (13,36 mm y 13,15 mm) en los tratamientos 1 y 5 respectivamente, fueron más altas en comparación con los ensayos que contenía mayores concentraciones de este biorregulador.
- El índice de brotación y número de yemas basales por brote en la fase de establecimiento *in vitro* presentaron mejores resultados con el tratamiento 1 (0 mg/L BAP) en MSVG y el tratamiento 5 (0 mg/L BAP) para MSVG/2. Esto corrobora la efectividad global de los tratamientos evaluados para ambas variables.
- En los ensayos de multiplicación *in vitro*, el medio MSVG presentó mejores resultados en los tratamientos con altas concentraciones de BAP (3,37 mg/L) y bajas concentraciones de KIN (1,12 mg/L) y BRS (0,4 ppm). De acuerdo con la longitud de brote y número de brotes por explante, 1,12 mg/L KIN presentó las medias más altas con relación a otros biorreguladores.

- La variable índice de brotación presentó mejores resultados con una dosis de 0,4 ppm de BRS (3,79%) en comparación con 3,37 mg/L de BAP (3,0 %) y 1,12 mg/L de KIN (3,72%).
- Los ensayos con KIN presentaron las medias más altas en relación a longitud de brotes (10,05 mm) y número de brotes por explantes (2,46) en comparación con BAP (6,33 mm y 1,80) BRS (8,25 mm y 2,18) cuyos valores presentaron medias más bajas para ambas variables.
- A pesar de que BRS es un biorregulador en concentración más baja que KIN y BAP presenta resultados altamente efectivos *in vitro* para las variables evaluadas. La concentración más baja (0,4 ppm) presentó medias más altas con relación las concentraciones más altas (0,8 y 1,2 ppm) determinando su potencial en el crecimiento vegetativo durante la etapa de multiplicación.

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES.

- Mantener las plantas madre en invernaderos protegidas de agentes contaminantes (bacterias, hongos, insectos, etc) puede reducir el tiempo de exposición y concentración de productos tensoactivos utilizados en la fase de desinfección.
- Se recomienda mantener todas las condiciones de asepsia durante la siembra de explantes en la cámara de flujo laminar para evitar fuentes de contaminación externa que alteren los resultados de la investigación
- En necesario una evaluación constante durante los primeros 15 días después de la siembra ya que en estos días se observa el mayor porcentaje de contaminación y descarte.
- Es aconsejable trabajar con dosis pequeñas de biorreguladores (0-1 mg/L BAP) ya que éstas garantizan mayor elongación celular e índice de brotación en yemas axilares de Quishuar durante de fase de establecimiento *in vitro*.
- Es importante realizar estudios similares de investigación que permitan desarrollar técnicas de micropropagación *in vitro* en especies forestales nativas que garanticen la recuperación de suelos degradados y la conservación de hábitats naturales los cuales se encuentran comprometidos debido al avance de la frontera agrícola, creciente urbanización y desarrollo industrial.
- Las técnicas de micropropagación *in vitro* contribuyen a la preservación de información genética que puede ser útil al momento de mejorar especies nativas para fines de reforestación masiva en cortos períodos de tiempo.
- La utilización de biorreguladores en la fase de multiplicación *in vitro* mejora notablemente el desarrollo vegetativo de los explantes. Sin embargo, el biorregulador

brassinolida con bajas concentraciones presentó buenos resultados *in vitro* en relación con BAP y KIN.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Arica, D. (2003). Beneficios del sistema agroforestal de la comunidad campesina de Antacusi, Huancayo, Perú. *Revisión mensual* 6, 2-6.
2. Applied Research Systems, (2003). After the Green Revolution: Sustainable and pequitable agriculture development. Futures. *Agrotechnology Journal*. Vol.5, 8-10.
3. Bagót, P. (2005). Proyecto de manejo sostenible de las microcuencas Chonta, Cascasen y Malcas - II etapa. Cajamarca – Perú”. Revista técnica U. de Lima No 37,1-12.
4. Brandbyge, J. (2004). Reforestación de los Andes ecuatorianos con especies nativas. Proyecto con Intercooperation suiza. No.2. pp.15-19.
5. Cárcamo, M. (2004). Establecimiento de protocolos para regeneración var. Lambert *in vitro* de cerezo dulce (*prunus avium*). (Tesis de la Universidad Católica de Temuco, 2004) Disertación internacional –Chile, 17.
6. Carreras, T. (2008). Geografía Forestal de América Latina. Segunda edición. Vol. III. México. pp. 45-47.
7. Castillo, R., & Davies, A. (1999). Introducción completa a la fisiología vegetal. Cuarta edición. Greenwood.
8. Castillo, J. (2004). “Hormonas vegetales”. En: *Aldea Global del Instituto Salk. California*. Vol. 1. pp.4-12.
9. Centeno, C. (2007). “Manejo de cuencas altoandinas y páramos”. Vol. I. pp. 5-15. Lima – Perú.

10. Costales, D. (2005). Guía para el establecimiento de plantaciones forestales en la zona andina. Proyecto FAO/Holanda. No.1,1-2.
11. D'Ercole., & Metzger P., (2004). Vulnerabilidad del Distrito Metropolitano de Quito. Colección Quito Metropolitano, MDMQ-IRD, 496
12. Daquinta, K. (2008). Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.F). Revista Forestal Centroamericana. Comunicación Técnica, 25-29.
13. De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA.
14. Devlin, R. (1976). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Tercera edición. pp. 57-60
15. Esquivel, F. & Escalant C. (1994). Plant cell culture. A practical approach. Oxford University Press.
16. FONAG. (2008). Recuperación de la cubierta vegetal, compromiso de la FONAG. Journal of USAID Vol.2, 5-7.
17. García, A. (2005). Metodología para la Evaluación de Sistemas de Manejo incorporando Indicadores de Sustentabilidad. Revista CEPAL, Valparaíso-Chile, 15-16.
18. Gentry, F., & Henderson, R. (2001). Agroecología; bases científicas de la agricultura alternativa. Journal of USAID. Vol.5, 12.
19. INEFAN (2000). Problemática de la deforestación en Ecuador. Historia, causas y consecuencias. Revista Agromar. No. 59, 672 – 678.

20. INIAP (1998). "Introducción *in vitro* de Quishuar y determinación de un medio de cultivo óptimo para la propagación de esta especie". *Revista No 17*, 56.
21. Kellison, M. (2008). "Application of tissue culture in clonal forestry programme". En: *Abstracts of Internacional Tree Biotechnology Meeting*. No.3
22. López, H. (2008). Agroecología; bases científicas de la agricultura alternativa Interamericana. Vol.5. pp.36-38.
23. Luteyn, J. (1999). A checklist of a plan diversity, geographical distribution and botanical literature. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. Vol. 84.
24. Majada, R. (2005). "Rescate y vigorización de la agricultura campesina" *Revista Forestal Centroamericana*. No. 4, 7-12.
25. Monteuis 2004, Bon y Monteuis 2006, Monteuis. 2008. "Teak propagation by *in vitro* culture". En: *Bois et Forets des Tropiques*. 226. (2):1-11.
26. Muñoz, D. Procedimientos principales en cultivo *in vitro*. Segunda edición. Vol. III. Pp. 49.
27. Navarro, W & Perea, M. (1996). Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. EUNA. Editorial Universidad Nacional de Costa Rica, 15-17.
28. Neill, D. (1999). Vegetación del Ecuador. Catalogue of Vascular plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden. No 75.
29. Núñez, M. & Mazorra, L. (2001) Los brasinoesteroides y la respuesta de las plantas al estrés. Cultivos Tropicales. Universidad de Ciego de Ávila. Vol. VII, 2-4.

30. Olmos, S. & Luciani, G. (2005). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Revista Biotecnología y Mejoramiento Vegetal No. 7. Argentina.
31. Pérez, M. & Martínez, F. (1994). Cultivo de tejidos vegetales aplicado a la producción agrícola. Revista Iberoamericana. Vol. I, 49.
32. Salisbury, A & Ross, D. (1994). Perspectivas de cultivo *in vitro* en células y tejido vegetal. Vol. VI. pp. 3.
33. Reyes, H. & Hewstone, N. (1994). Cultura de tejidos en la agricultura. Revista Tierra Adentro No. 24, 30-33.
34. Roca, A. & Mroginsky, C. (2003). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT- Colombia. pp. 45-47.
35. Ruíz, F. (2006). Atlas de América. Tomo IV. Pp.152-154.
36. Smith, R. (2000). Plant tissue culture: techniques and experiments. Second edition. Academic Press.
37. Suarez, D. (2008). Formación de un corredor de hábitat de un Bosque Montano Alto em um mosaico de páramo en el norte de Ecuador. Revista Ecología Aplicada. No. 2,9 -15.
38. Terry, E., Núñez, M., Pino, M., Medina, N. (2001). Efectividad de la combinación biofertilizantes – análogo de brasinoesteroides en la nutrición del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Revista Agricultura Técnica. Vol. 30.
39. Ugarte, I. (2003). Manual de agricultura ecológica, CULTIVANDO. No 30. pp. 381 – 386.

40. Uribe, C. (2004). Micropropagación y desarrollo vegetal. Introducción e ideas generales. Vol. 1. pp.33-34.
41. Vidal, G. (2008). Desafíos ambientales en nuestros tiempos. Revista Avances y perspectivas. Vol. 20. pp. 5-6.
42. Zevallos, O. (2005). Ocupación de laderas. Incremento del riesgo por degradación ambiental urbana en Quito- Ecuador. Capítulo 9. pp. 1-7.

ANEXOS

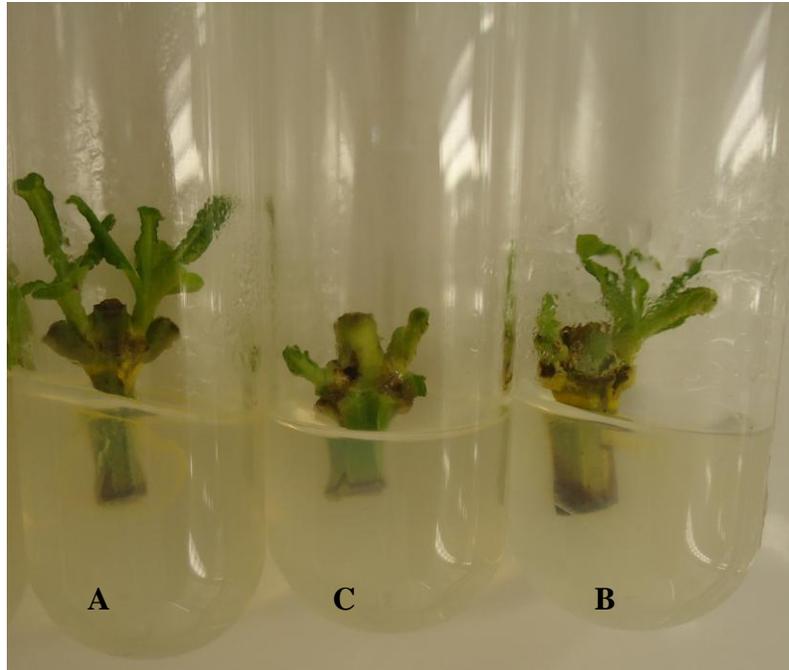
Anexo A. Composición de los medios de cultivo MSVG y MSVG/2.

Elementos	Componentes	MSVG (mg/L)	MSVG/2 (mg/L)
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	1650	825
	CaCl ₂ .2H ₂ O	332,2	166,1
	MgSO ₄	180,7	90,35
	KNO ₃	1900	950
	KH ₂ PO ₄	170	85
Micronutrientes	H ₃ BO ₃	6,2	3,1
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0125
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0125
	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	8,45
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,125
	KI	0,83	0,415
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	4,3
Vitaminas	Mio-inositol	100	50
	Ácido nicotínico	1	0,5
	Piridoxina-HCl	1	0,5
	Tiamina	10	5
Hierro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	13,9
	Na ₂ EDTA	37,26	18,63
Carbohidratos	Sacarosa	30000 ⁶	30000
Agente gelificante	Agar	6000 ⁷	6000

⁶ Dosis utilizada en protocolos del Laboratorio de Micropropagación de la EPMMOP

⁷ Dosis utilizada en protocolos del Laboratorio de Micropropagación de la EPMMOP

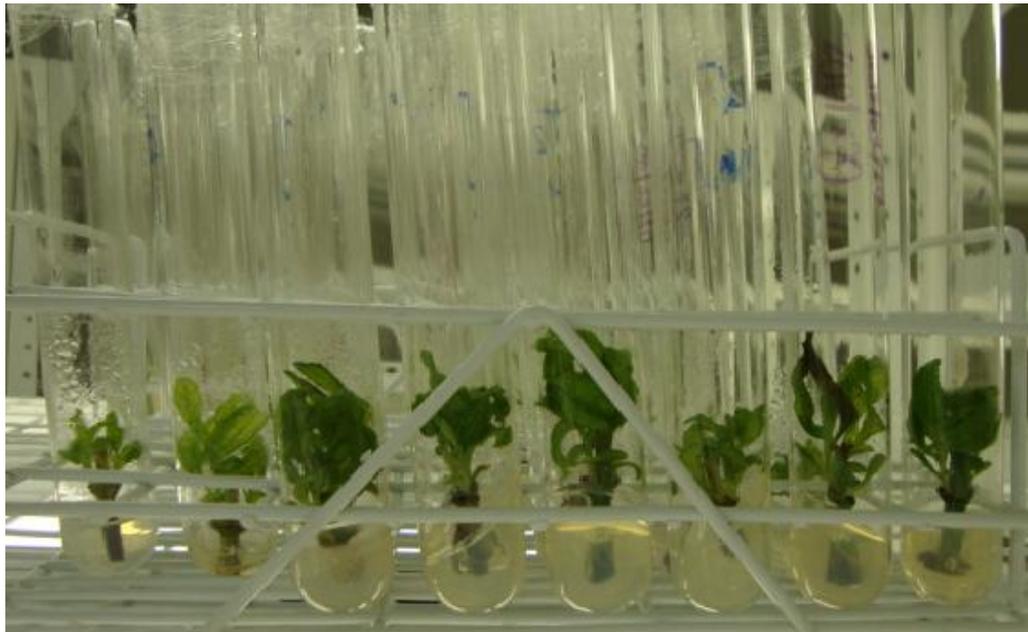
Anexo B. Explantes de Quishuar establecidos *in vitro* luego de 7 días A) en medio MSVG B) medio MSVG con 0,56 mg/L BAP y C) medio MSVG con 1,12 mg/L BAP.



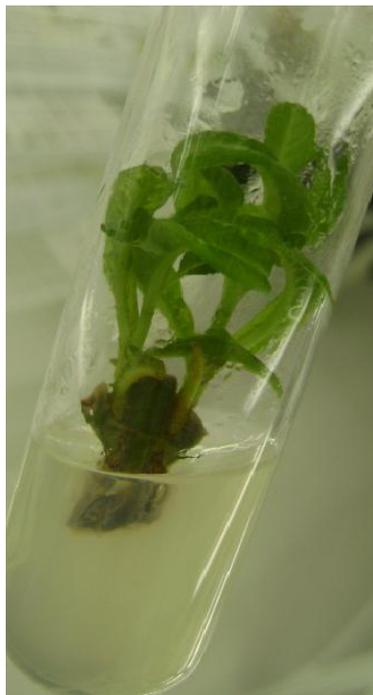
Anexo C. Yema axilar de Quishuar establecida *in vitro* luego de 21 días en medio MSVG.



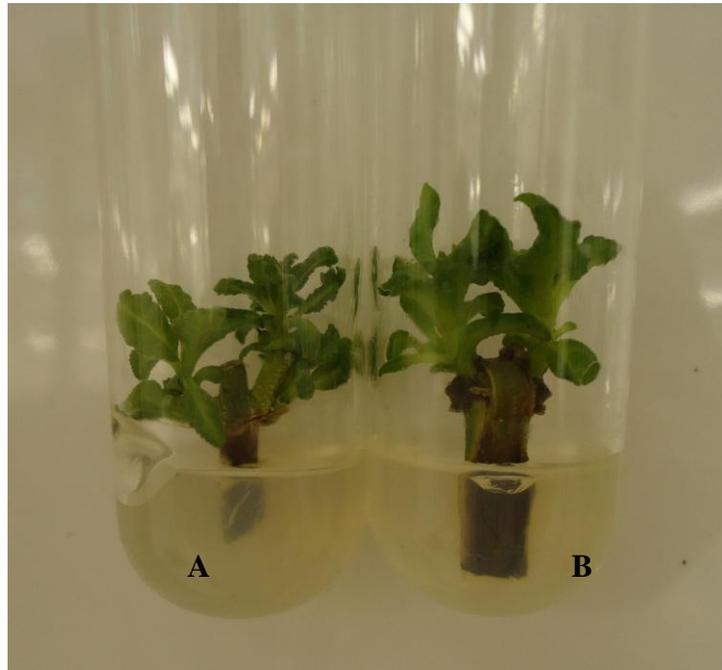
Anexo D. Explantes establecidos *in vitro* luego de 14 días en medio MSVG/2.



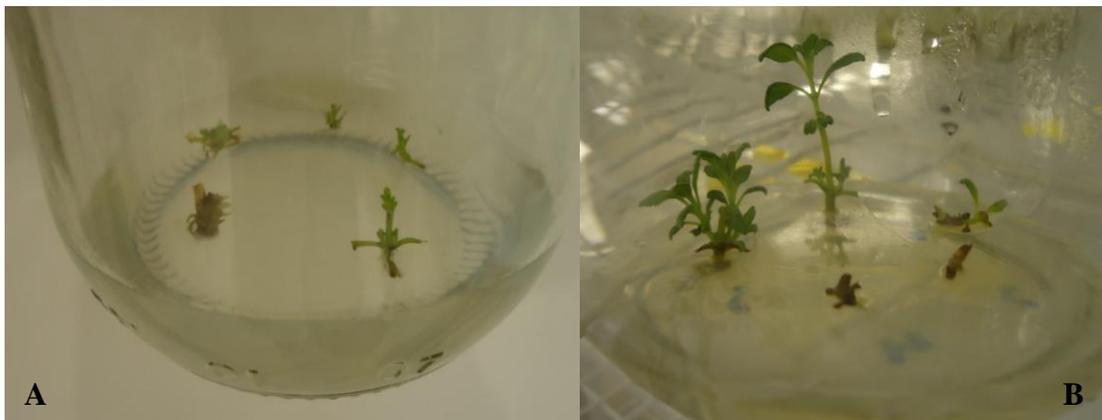
Anexo E. Yema axilar de Quishuar establecida *in vitro* luego de 14 días en medio MSVG/2 suplementada con 0,56 mg/L BAP.



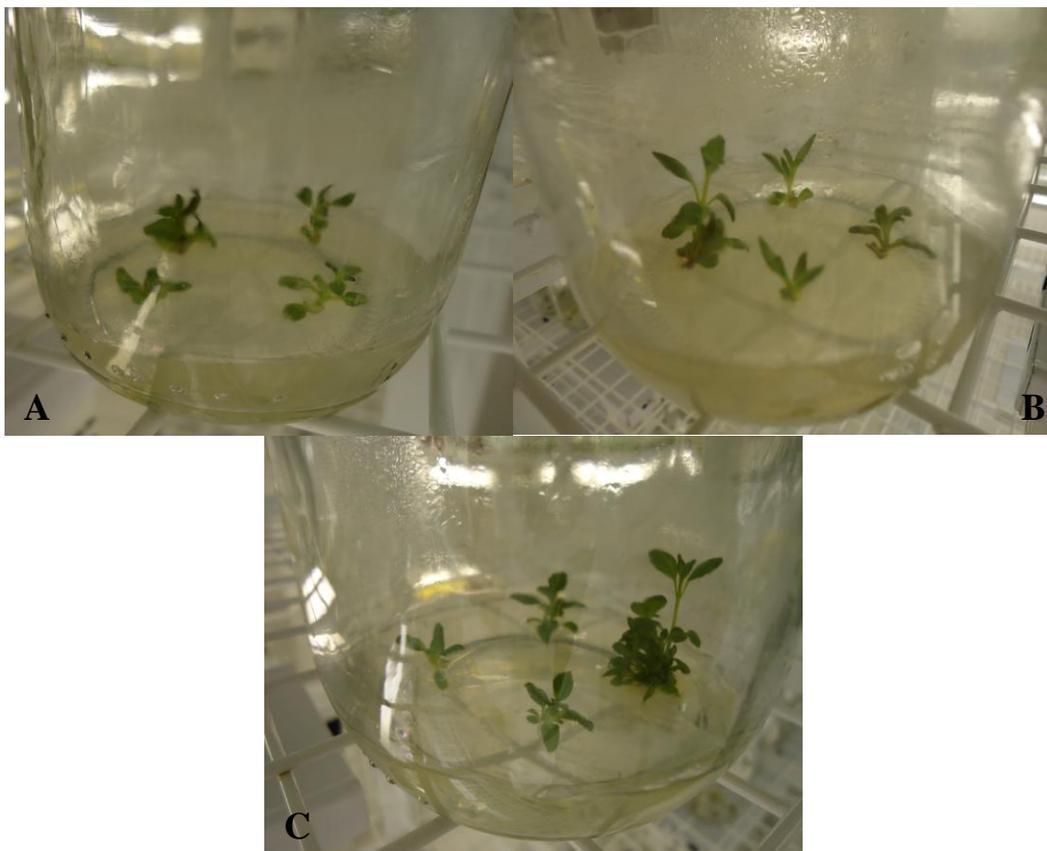
Anexo F. Explantes de Quishuar establecidos *in vitro* luego de 21 días A) en medio MSVG/2 suplementado con 1,12 mg/L BAP y B) medio MSVG/2 con 1,68 mg/L BAP.



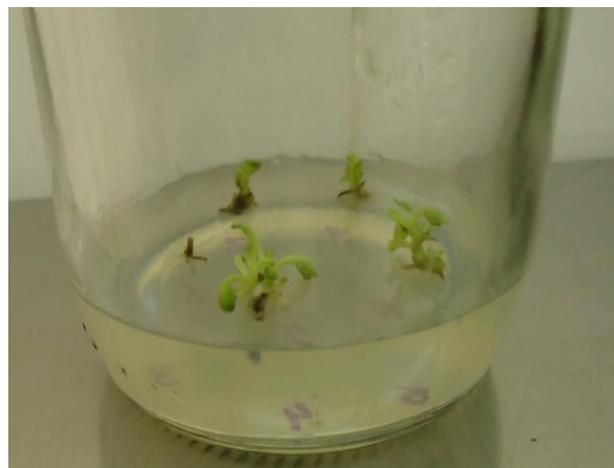
Anexo H. Multiplicación *in vitro* de brotes de Quishuar luego de A) 7 días y B) 21 días en medio MSVG suplementado con 1,12 mg/L KIN.



Anexo I. Brotes multiplicados *in vitro* luego de A) 7 días B) 14 días y C) 21 días en medio MSVG suplementado con 0,4 ppm BRS.



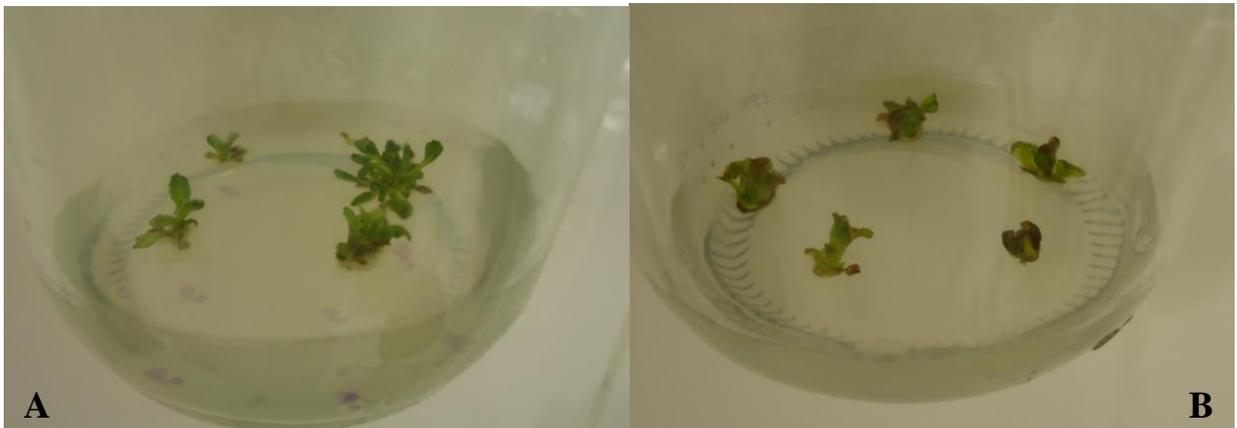
Anexo J. Brotes multiplicados *in vitro* luego de 7 días en medio MSVG suplementado con 3,37 mg/L BAP



Anexo K. Brotes multiplicados *in vitro* luego de 7 días en medio MSVG/2 suplementado con 3,37 mg/L BAP



Anexo L. Brotes multiplicados *in vitro* luego de 7 días en medio MSVG/2 A) suplementado con 1,12 mg/L KIN y B) con 0,4 ppm de BRS.



DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

María José Cárdenas Espinosa

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “Determinación del protocolo de establecimiento y multiplicación *in vitro* de Quishuar (*Buddleja incana*), a partir de yemas axilares de plantas madre, como una herramienta para la preservación de esta especie dentro del Distrito Metropolitano de Quito”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

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

Quito, 19 de Abril del 2011

María José Cárdenas Espinosa

AUTORIZACIÓN

Yo, María José Cárdenas Espinosa

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Determinación del protocolo de establecimiento y multiplicación *in vitro* de Quishuar (*Buddleja incana*), a partir de yemas axilares de plantas madre, como una herramienta para la preservación de esta especie dentro del Distrito Metropolitano de Quito”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Quito, 19 de Abril del 2011

María José Cárdenas Espinosa