



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: ANÁLISIS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS EN LA
ESPECIE *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. DE EXPLANTES
IN VIVO E IN VITRO.**

AUTOR: PUEBLA SÁNCHEZ, DENISSE CAROLINA

**DIRECTOR: M.Sc. JADÁN GUERRERO, MÓNICA BEATRIZ
Ph.D. (c)**

SANGOLQUÍ

2017



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

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**ANÁLISIS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS EN LA ESPECIE *Hydrangea macrophylla* DE EXPLANTES *IN VIVO* E *IN VITRO*.**" realizado por **DENISSE CAROLINA PUEBLA SÁNCHEZ**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **DENISSE CAROLINA PUEBLA SÁNCHEZ** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de Marzo 2017

M.Sc. Mónica Jadán, Ph.D. (c)

DOCENTE



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **DENISSE CAROLINA PUEBLA SÁNCHEZ**, con cédula de identidad N° 171678458-0, declaro que este trabajo de titulación “**ANÁLISIS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS EN LA ESPECIE *Hydrangea macrophylla* DE EXPLANTES *IN VIVO* E *IN VITRO*.”, ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existente, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográfica.**

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 10 de Marzo 2017

Denisse Carolina Puebla Sánchez

CC 1716784580



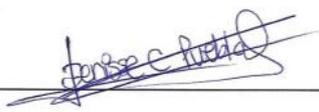
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **DENISSE CAROLINA PUEBLA SÁNCHEZ**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación, "**ANÁLISIS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS EN LA ESPECIE *Hydrangea macrophylla* DE EXPLANTES *IN VIVO* E *IN VITRO*.**" cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 10 de Marzo 2017



Denisse Carolina Puebla Sánchez

CC 1716784580

DEDICATORIA

Todo el tiempo, esfuerzo, perseverancia y trabajo puestos en toda mi carrera, van dedicados a mi familia, este logro va por ustedes.

Denisse Carolina Puebla Sánchez

AGRADECIMIENTO

A Dios por siempre estar de mi mano, por ser la luz de mis días, por alentarme a seguir adelante.

A mis padres, Edwin y Fanny por enseñarme a luchar cada día por cumplir mis objetivos y por creer en mí siempre. Gracias por ser mis guías, por forjar mi personalidad y sobre todo mi espíritu. Mamita gracias por motivarme y enseñarme que lo que empieza se termina; ¡Lo logramos bonita! Papi, gracias por ser un ejemplo de constancia y dedicación.

A Dayanara y Franklin por ser como mis padres, por acompañarme en mis locuras y ser un ejemplo de lucha para mí.

A Johanna y Marjorie, por ser más que mis hermanas, mis mejores amigas, infinitas gracias por cada cosa que han hecho por mí.

Kimmy, Brady, Gabriell y Nathaniel por ser mi razón de ser, mi motivación diaria y mis ganas de seguir adelante. Les amo con mi vida entera.

A Shirley por ser esa persona que me ha levantado incansables veces, por sacar lo mejor de mí, por secar mis lágrimas y provocar infinitas sonrisas, por ser la mejor amiga del mundo, por ser mi hermana, mi compañera de locuras, por conocerme tanto y por jamás dejarme rendir.

A mi directora de tesis, Máster Mónica Jadán por confiar en mí, por ser como una madre para mí, gracias por compartir sus conocimientos en el área académica y sobre todo en la parte humana.

A la Dra. Blanquita Naranjo, por creer en mí desde el primer momento que me conoció, por su guía y gran ayuda en el desarrollo de mi tesis, gracias por compartir cada conocimiento conmigo. Infinitas gracias por sus sabios consejos y por alentarme cada día alcanzar mis sueños.

El camino para llegar a la meta fue duro. ¡Cuántos desvelos! Pero también ha sido un camino satisfactorio de su mano, gracias: Ing. Ana Briceño, Ing. Lucía Jiménez, Ing. Sivananda Delgado, Dra. Karina Proaño, Dra. Claudia Segovia, Dra. Patricia Moreira, Ing. Rafael Vargas, Dr. Rodrigo Ávalos, Dr. Marcelo Grijalva, Dr. Luis Cumbal y Dr. Freddy Proaño porque el toque de profesores como ustedes transforma vidas, y esas vidas transforman naciones.

A mis amigos: Valery, Jare, Josué, Janina, Emilia, Freddy, Daniel, David. B, Rafael, Roque, Alexis, Christopher, David. J y Andrés por cada locura compartida, por brindarme su amistad; infinitas gracias por todos los momentos que pasamos juntos.

A mis amigos de la infancia: Stefany, Andrea, Diego, Pablo, Pedro y Fausto gracias por demostrarme su apoyo incondicional pues a pesar de que el tiempo pasó y la distancia nos separó, la amistad se mantuvo intacta.

A mis amigas tesisistas, por apoyarme y alentarme siempre, por ser mis amigas, mis ocurridas, mis confidentes: Jenn, Jenny, Daniela, Jessica y Kary gracias por hacer mis días más alegres.

A mis compañeros del laboratorio: Pablo, Luisa, Vale, Andrés, Andrea, Sebastián, María José y Joss.

Agradezco a cada ser que ha estado conmigo en mi trayectoria universitaria.

“Sé firme en tus actitudes, perseverante en tu ideal. Pero sé paciente, no pretendiendo que todo te llegue de inmediato. Haz tiempo para todo, y todo lo que es tuyo, vendrá a tus manos en el momento oportuno” M. Gandhi

Gracias

Denisse Puebla

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÒN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÒN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
LISTADO DE TABLAS	xii
LISTADO DE CUADROS	xiv
LISTADO DE FIGURAS	xvi
LISTADO DE ABREVIATURAS	xix
RESUMEN.....	xx
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema.....	1
1.2. Justificación del problema.....	2
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo General.....	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Marco teórico	3
1.4.1. Hortensia (<i>Hydrangea macrophylla</i> (Thunb.) Ser.).....	3
1.4.1.1. Generalidades	3
1.4.1.2. Clasificación taxonómica	5
1.4.1.3. Descripción botánica.....	6
1.4.1.4. Plagas y enfermedades	7
1.4.2. Cultivo <i>in vitro</i>	8
1.4.2.1. Generalidades	8
1.4.2.2. Etapas de la micropropagación vegetal <i>in vitro</i>	9
1.4.2.2.1. Fase de preparación.....	9
1.4.2.2.2. Fase de desinfección	10
1.4.2.2.3. Fase de establecimiento.....	10
1.4.2.2.4. Fase de multiplicación.....	11

1.4.2.3.	Organogénesis	11
1.4.2.4.	Principios activos	11
1.4.2.4.1.	Generalidades	11
1.4.2.4.2.	Compuestos fenólicos	12
1.4.2.4.3.	Actividad antioxidante	12
1.4.2.4.4.	Azúcares reductores	13
1.4.2.4.5.	Marcha fitoquímica	13
1.4.2.4.6.	Principios activos en <i>Hydrangea macrophylla</i>	14
1.5.	Hipótesis	15
CAPÍTULO 2		15
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1.	Participantes	15
2.2.	Zona de estudio	15
2.3.	Fase de campo	16
2.3.1.	Fase preliminar	16
2.4.	Fase de laboratorio	16
2.4.1.	Material vegetal	17
2.4.2.	Instrumental	17
2.4.3.	FASE I: Desinfección de las muestras vegetales.....	18
2.4.3.1.	Medio de cultivo	18
2.4.3.2.	Desinfección del material vegetal	19
2.4.3.3.	Condiciones físicas del cultivo.....	20
2.4.3.4.	Evaluación.....	20
2.4.4.	FASE II: Introducción y multiplicación de brotes a partir de yemas	22
2.4.5.	Fase III: Inducción de callos a partir de secciones de hoja.....	23
2.4.6.	Fase IV: Análisis fitoquímico	25
2.4.6.1.	Pruebas cualitativas	26
2.4.6.2.	Pruebas cuantitativas	26
2.4.6.2.1.	Determinación de contenido de Fenoles	27
2.4.6.2.2.	Determinación de contenido de carácter antioxidante	28
2.4.6.2.3.	Determinación de azúcares reductores	28
CAPÍTULO 3		30
3.	RESULTADOS	30
3.1.	FASE I: Desinfección de las muestras vegetales	30

3.1.1.	Contaminación	30
3.1.1.1.	Muestras vegetales de hoja.....	30
3.1.1.1.1.	Análisis exploratorio de datos.....	30
3.1.1.1.2.	Análisis Inferencial	32
3.1.1.2.	Muestras vegetales de yemas	34
3.1.1.2.1.	Análisis exploratorio de datos.....	34
3.1.1.2.2.	Análisis Inferencial	36
3.1.2.	Oxidación.....	37
3.1.2.1.	Muestras vegetales de hoja.....	38
3.1.2.1.1.	Análisis exploratorio de datos.....	38
3.1.2.1.2.	Análisis inferencial.....	39
3.1.2.2.	Muestras vegetales de yemas	41
3.1.2.2.1.	Análisis exploratorio de datos.....	41
3.1.2.2.2.	Análisis inferencial.....	42
3.2.	Fase II: Inducción y Multiplicación de brotes a partir de yemas	44
3.2.1.	Presencia o ausencia de brotes:.....	44
3.2.1.1.	Análisis exploratorio de los datos	44
3.2.1.2.	Análisis inferencial.....	45
3.2.2.	Número de brotes.....	47
3.2.2.1.	Análisis exploratorio de los datos	47
3.2.2.2.	Análisis inferencial.....	48
3.3.	Fase III: Inducción de callos a partir de secciones de hoja	52
3.3.1.	Presencia o ausencia de callo:.....	52
3.3.1.1.	Análisis exploratorio de los datos	52
3.3.1.2.	Análisis inferencial.....	53
3.3.2.	Oxidación.....	55
3.3.2.1.	Análisis exploratorio de datos.....	56
3.3.2.2.	Análisis inferencial.....	57
3.4.	Fase IV: Análisis fitoquímico.....	58
3.4.1.	Pruebas cualitativas.....	59
3.4.2.	Pruebas cuantitativas.....	60
3.4.2.1.	Determinación de contenido de Fenoles	60
3.4.2.2.	Determinación de contenido de carácter antioxidante	62
3.4.2.3.	Determinación de azúcares reductores.....	64

CAPÍTULO 4	67
4. DISCUSIÓN	67
4.1. FASE I: Desinfección de las muestras vegetales	68
4.2. FASE II: Introducción y multiplicación de brotes a partir de yemas	71
4.3. Fase III: Inducción de callos a partir de secciones de hojas.....	72
4.4. Fase IV: Fitoquímica	73
CAPÍTULO 5	75
5. CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO 6	77
RECOMENDACIONES	77
CAPÍTULO 7	79
BIBLIOGRAFÍA	79

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la hortensia.	5
Tabla 2. Componentes del Medio Murashige & Skoog (MS) 1962, utilizado para la etapa de desinfección.	18
Tabla 3. Tratamientos de desinfección entre la variable concentración de hipoclorito de sodio versus tiempo de inmersión de los explantes de hoja.	19
Tabla 4. Tratamientos de desinfección entre la variable concentración de hipoclorito de sodio versus tiempo de inmersión de los explantes de yemas.	20
Tabla 5. Tratamientos con respecto a la variable 6-BAP para los explantes de yemas para la fase de introducción a partir de yemas de hortensia (<i>Hydrangea macrophylla</i>).	22
Tabla 6. Tratamientos de medios de cultivo con combinaciones de 6-BAP y 2,4-D, para la fase de inducción de callos de hortensia (<i>Hydrangea macrophylla</i>).	24
Tabla 7. Datos para realizar la curva de calibración para determinar el contenido de fenoles.	27
Tabla 8. Datos para realizar la determinación del contenido de carácter oxidante.	28
Tabla 9. Preparación de la curva de calibración en la determinación del contenido de azúcares reductores.	29
Tabla 10. Tabla de contingencia para contaminación respecto a los tratamientos de desinfección de hojas.	31
Tabla 11. Tabla de contingencia para contaminación respecto a los tratamientos de desinfección de yemas.	35
Tabla 12. Tabla de contingencia para oxidación respecto a los tratamientos de desinfección.	38

Tabla 13. Tabla de contingencia para oxidación respecto a los tratamientos de desinfección.	41
Tabla 14. Presencia o Ausencia de brotes en cada una de las repeticiones según el tratamiento utilizado.....	44
Tabla 15. Número de brotes de hortensia (<i>Hydrangea macrophylla</i>) por tratamiento, a los 15, 30 y 45 días de cultivo.	47
Tabla 16. Tabla de contingencia para presencia o ausencia de tejido callogénico en los explantes de hoja.	53
Tabla 17. Tabla de contingencia para oxidación de los explantes de hoja.....	56
Tabla 18. Los resultados del análisis fitoquímico se reportan: (-) negativo (+) poco, (++) regular, (+++) abundante de las tres muestras (hoja ex vitro, hoja in vitro y callo de hoja).	59
Tabla 19. Datos del análisis de la cuantificación de los fenoles presentes en las diferentes muestras de hortensia.	60
Tabla 20. Datos del análisis de la cuantificación de fenoles presentes en las muestras de hortensia.	62
Tabla 21. Datos del análisis de la cuantificación de los azúcares reductores presentes en las diferentes muestras de hortensia.....	65

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Prueba de Shapiro -Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos obtenidos de contaminación.	33
Cuadro 2. Prueba No paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable contaminación.	34
Cuadro 3. Prueba de Shapiro-Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de contaminación.....	36
Cuadro 4. Prueba No paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable contaminación en yemas.	37
Cuadro 5. Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de contaminación de hojas.	39
Cuadro 6. Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable oxidación de hojas.....	40
Cuadro 7. Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de contaminación.....	42
Cuadro 8. Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable contaminación.	43
Cuadro 9. Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de Inducción y Multiplicación de Brotes.	46
Cuadro 10. Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable presencia o ausencia de brotes.	46
Cuadro 11. Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de Inducción y Multiplicación de Brotes.	49
Cuadro 12. Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable presencia o ausencia de brotes a los 30 días.	50

Cuadro 13. Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de Inducción y Multiplicación de Brotes.....	51
Cuadro 14. Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable presencia o ausencia de brotes a los 45 días.	51
Cuadro 15. Prueba de Shapiro-Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos obtenidos de contaminación.	54
Cuadro 16. Prueba No paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable callogénesis.	55
Cuadro 17. Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de contaminación.....	57
Cuadro 18. Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable oxidación.	58

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Hortensia (<i>Hydrangea macrophylla</i>).	4
Figura 2. Estructura de la hortensia.....	7
Figura 3. Estructura química de la filodulcina	14
Figura 4. Explantes de hortensia (a) hoja, (b) yemas.	17
Figura 5. Cámara de flujo laminar esterilizada con los materiales para siembra de explantes.	18
Figura 6. Contaminación de explantes: (a) por bacteria, (b) por hongo.....	21
Figura 7. Oxidación de explantes: (a) explantes sin oxidación, (b) explantes oxidados.....	22
Figura 8. Explantes con (a) Presencia de brotes y (b) número de brotes (4).....	23
Figura 9. (a) Presencia de callo, (b) ausencia de callo.	25
Figura 10. Extractos de: (a) hoja in vitro (b) hoja ex vitro, (c) callo de hoja de 6 meses, (d) callo de hoja de 14 meses.....	26
Figura 11. Número de explantes contaminados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleado en los tratamientos de desinfección (N=80, n=40)	32
Figura 12. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Contaminación.....	33
Figura 13. Número de explantes contaminados respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio empleado en los tratamientos de desinfección (N=30, n=10).....	35
Figura 14. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Contaminación.....	36
Figura 15. Número de explantes oxidados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleados en los tratamientos de desinfección.....	38
Figura 16. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Oxidación.....	39

Figura 17. Número de explantes oxidados respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio empleados en los tratamientos de desinfección.....	42
Figura 18. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Oxidación.....	42
Figura 19. Presencia de brotes respecto a los tratamientos utilizados.....	45
Figura 20. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Presencia o Ausencia de Brotes en explantes de yemas.....	46
Figura 21. Número de brotes de Hortensia (<i>Hydrangea macrophylla</i>) en cada tratamiento a los 15, 30 y 45 días de cultivo.....	48
Figura 22. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Número de Brotes a los 60 días de cultivo.....	49
Figura 23. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Número de Brotes a los 60 días de cultivo.....	50
Figura 24. Formación del callo en el explante de hoja a los 30 días de siembra en el tratamiento 2 (0,5 mg/L 6-BAP y 1 mg/L 2,4-D).....	52
Figura 25. Número de hojas que presentaron tejido calloso en la Hortensia (<i>Hydrangea macrophylla</i>).....	53
Figura 26. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Presencia o Ausencia de callo.....	54
Figura 27. Número de explantes oxidados y no oxidados en los medios de cultivo evaluados para la inducción de callo.....	56
Figura 28. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Oxidación.....	57
Figura 29. Curva de calibración para la determinación de fenoles. Eje de las x (concentración), eje y (Absorbancias).....	60
Figura 30. Cuantificación de los fenoles presentes en las diferentes muestras de hortensia.....	61
Figura 31. Curva de calibración para la determinación de carácter antioxidante. Eje de las x (concentración), eje y (Absorbancias).	62
Figura 32. Reducción de la concentración de radical DPPH.....	63

Figura 33. Porcentaje de reducción de la concentración de radical DPPH.	64
Figura 34. Curva de calibración de la determinación de azúcares reductores. Eje de las x (concentración), eje y (Absorbancias).	65
Figura 35. Concentración de los azúcares reductores en las diferentes muestras.	66

LISTADO DE ABREVIATURAS

min: minutos

MS: Formulación Murashige y Skoog

ANA: ácido naftalen acético

6-BAP: 6-bencilaminopurina

2,4-D: Ácido 2,4 diclorofenoxiacético

HCl: ácido clorhídrico

nm: nanómetros

mL: mililitros

L: litro

mg: miligramo

mM: concentración expresada en milimolar

DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo.

DCA: Diseño completamente al azar

RESUMEN

Las plantas alelopáticas son consideradas como un “fenómeno de diagnóstico” debido a que conducen al descubrimiento de nuevas moléculas con actividades biológicas importantes y son capaces de curar ciertas enfermedades. La Hortensia (*Hydrangea macrophylla*) (Thunb.) Ser. en su mayoría es utilizada para la decoración de interiores y exteriores, ésta es una planta nativa de los bosques húmedos japoneses que posee propiedades fitoquímicas. El objetivo del presente estudio fue analizar los principios activos en la especie *Hydrangea macrophylla* de explantes *in vivo* y aplicando técnicas de cultivo *in vitro* se obtuvo callo y plántulas para el aislamiento, caracterización y comparación de los principios activos de diferentes muestras (callo de hoja, hoja *ex vitro* y hoja *in vitro*). El proyecto cuenta con cuatro etapas (desinfección de hojas y yemas, introducción y multiplicación de explantes de yemas, inducción a callo de muestras de hoja y análisis fitoquímico), en donde se evalúan diferentes concentraciones de cloruro de sodio variando los tiempos de inmersión, concentraciones de reguladores de crecimiento y finalmente en el análisis fitoquímico se realizó el screening de cuatro muestras: hoja *in vitro*, hoja *ex vitro*, callo de hoja de 6 meses y callo de hoja de 14 meses donde se comparó la concentración de fenoles, actividad antioxidante y azúcares reductores. Los resultados indican que las yemas y hojas de hortensia sometidos a un tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio a una concentración 3,5% y 1,5% respectivamente durante 5 minutos sobreviven en un 87,5%. En la etapa de propagación el mayor número de brotes se obtuvo con la adición de 4 mg/L de 6-BAP. En cuanto a la inducción de callo, una concentración de 0,5 mg/L 6-BAP combinado con 1 mg/L 2,4-D forma un 75% de callo. El análisis fitoquímico reveló que la hoja *in vitro* tiene una alta concentración de fenoles (388 mg/L) y azúcares reductores (0,70 mmol/L) mientras que el extracto de callo de hoja de 6 meses redujo la concentración de radical DPPH en 39,99%.

Palabras claves:

- *Hydrangea macrophylla*
- ANÁLISIS FITOQUÍMICO
- HOJA *IN VITRO*
- HOJA *EX VITRO*
- CALLO DE HOJA

ABSTRACT

Allelopathic plants are considered as a "diagnostic phenomenon" because they lead the discovery of new molecules with important biological activities and they are able to cure certain diseases. The hydrangea (*Hydrangea macrophylla*) is used as indoor and outdoor ornament, this plant is native from the Japanese rain forests and it has phytochemical properties. The aim of this study was to analyze the active ingredients of *Hydrangea macrophylla* of explants *in vivo* and by applying culture *in vitro* techniques we obtained plants and callus for the isolation, characterization and comparison of the active ingredients of different samples (callus leaf, *ex vitro* leaf and *in vitro* leaf). The investigation has four stages (disinfection of leaves and buds, introduction and multiplication of bud explants, induction of callus from leaf samples and phytochemical analysis) in which the effectiveness of different concentrations of sodium chloride were evaluated varying immersion times, concentrations of growth regulators and finally in the phytochemical analysis, the screening of four samples was performed: *in vitro* leaf, *ex vitro* leaf, 6 months and 14 months callus leaf where phenol concentration, antioxidant activity and reducing sugars were compared. The results indicated that the buds and leaves of hydrangea, when subjected to disinfection through 3.5% and 1.5% respectively with sodium hypochlorite for 5 minutes, 87.5% survived the process. In the propagation phase the highest number of buds was obtained with the addition of 4mg/L 6-BAP. In the process of callus induction, 0,5mg/L concentration of BAP combined with 1mg/L 2,4-D formed 75% of callus. Phytochemical analysis revealed that *in vitro* leaf has the higher concentration of phenols (388 mg / L) and reducing sugars (0.70 mmol / L) while the 6 months leaf callus extract reduced the concentration of DPPH radical in 39,99%.

Key words:

- *Hydrangea macrophylla*
- *IN VITRO LEAF*
- *EX VITRO LEAF*
- **CALLUS LEAF**
- **PHYTOCHEMICAL ANALYSIS**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

En los últimos 50 años, se han incrementado los estudios sobre metabolitos secundarios de origen vegetal. Las plantas producen gran cantidad de metabolitos secundarios, sustancias que se encuentran en diferentes partes de las plantas; básicamente tienen funciones específicas como: atrayentes o repelentes de animales, intervienen en las funciones de adaptación y sirven de defensa contra diferentes patógenos (Lock, 1994). Además, pueden llegar a ser muy útiles para el ser humano al usarlos como: medicinas, plaguicidas, colorantes, fragancias, edulcorantes, etc. (Bourgaud *et al.*, 2001). La mayoría de los principios activos de plantas están comprendidos dentro de los llamados productos naturales o metabolitos secundarios.

Actualmente, estos y otros productos naturales se producen únicamente a partir de cantidades masivas de partes de plantas o plantas enteras. A menudo, las plantas de origen se cultivan en áreas tropicales y subtropicales, geográficamente remotas, que están sujetas a inestabilidad, sequía, enfermedades y cambios en los patrones de uso de la tierra y otros factores ambientales. Además, los largos periodos de cultivo entre la siembra y la cosecha dificultan la selección de hileras de alto rendimiento, resultando en fármacos costosos. Los períodos de cultivo pueden variar desde varios meses hasta décadas. A pesar de estas dificultades y costos, la extracción de medicinas de plantas o plantas cultivadas en la naturaleza continúa por la falta de mejores alternativas (Dicosmo *et al.*, 1995).

Existen estudios que demuestran que las hojas y brotes de hortensia (*Hydrangea macrophylla*) presentan propiedades fitoquímicas como: antimalárico (Ishih *et al.*, 2003), antialérgico (Mastuda *et al.*, 2002), antifúngico (Yang *et al.*, 2002), antidiabético (Zhang *et al.*, 2009), anticoccidial, antihipercolesterolémico y actividades antioxidantes (Kim *et al.*, 2009).

En el 2012, Orozco estandarizó un protocolo para la propagación *in vitro* de *Hydrangea macrophylla* con el fin de multiplicar a gran escala para uso ornamental en los espacios públicos del Distrito Metropolitano de Quito. Se ha descrito que las

especies de hortensia taxonómicamente; sin embargo, no existe ningún conocimiento científico sobre sus metabolitos secundarios en *in vitro*. Adicionalmente la presencia de metabolitos secundarios especialmente su cantidad puede ser influenciada por el ambiente en el que se desarrollan y al trabajar *in vitro* se controlan todas las variables para constatar.

En la presente investigación se analizaron los principios activos de la hortensia (*Hydrangea macrophylla*) mediante el uso del cultivo *in vitro* y se comparó con las plantas cultivadas en condiciones *ex vitro*; se evaluó la caracterización fitoquímica, y se comparó las concentraciones fenólicas, antioxidantes y azúcares reductores.

1.2. Justificación del problema

El conocimiento de las propiedades curativas de las plantas ha sido desde la antigüedad transmitido por generaciones sin haber tenido una investigación previa que justifique y explique científicamente como estas plantas son capaces de funcionar ante tratamientos preventivos y curativos.

Actualmente, la farmacología mediante el análisis de los efectos terapéuticos de las plantas tiene el objetivo de comparar, clasificar y mejorar las diversas propiedades que posee la flora mediante procedimientos analíticos como: separación y cuantificación de los compuestos químicos complejos. El avance de la ciencia y la tecnología ha permitido revelar los secretos que poseen las plantas que en la actualidad tienen amplia aplicación en la industria alimentaria, farmacológica y agropecuaria.

Se sabe que los metabolitos secundarios juegan un papel importante en la adaptación de las plantas a su medio ambiente, pero también representan una fuente importante de fármacos activos. Las tecnologías de cultivo de células vegetales se introdujeron a finales de los años sesenta como una posible herramienta para estudiar y producir metabolitos secundarios de plantas. Diferentes estrategias, utilizando sistemas *in vitro*, han sido ampliamente estudiadas con el objetivo de mejorar la producción de compuestos vegetales secundarios (Dicosmo *et al.*, 1995).

Debido a la falta de investigación de los metabolitos secundarios a nivel *in vitro*, es importante realizar un análisis fitoquímico comparativo de esta especie con la ayuda del cultivo de tejidos vegetales que hoy en día es una herramienta importante en la selección, cruzamiento, control de enfermedades y producción en masa de cultivos (Calva, 2005). Con este ensayo, se pretende comprobar la aplicabilidad de la técnica de cultivo *in vitro* para la cuantificación y producción de metabolitos secundarios de la hortensia.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Analizar los principios activos en la especie *Hydrangea macrophylla* de explantes *in vivo* e *in vitro*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Establecer un protocolo óptimo de desinfección de dos explantes (hojas y yemas) de *Hydrangea macrophylla*.
- Determinar los diferentes medios de establecimiento, y multiplicación de hortensia a partir de dos explantes con la concentración adecuada de auxinas y citoquininas.
- Realizar estudios fitoquímicos que implica el aislamiento, caracterización de los principios activos y comparación entre plantas *in vitro* e *in vivo* y callo de hoja de la especie *Hydrangea macrophylla*.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Hortensia (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.)

1.4.1.1. Generalidades

La hortensia (Figura 1) es una planta nativa de los bosques húmedos japoneses, fue designada así por la dama francesa Hortense Lepante en el siglo XVIII. Su nombre científico es *Hydrangea macrophylla*, que en griego significa “bebedora de agua”

(INFOJARDIN, 2015). Pertenecen a la familia Hydrangeaceae Dumort., que comprende 100 especies a nivel de Asia, América del Norte, Centro y Sur América, de los cuales 46 especies y 10 variedades se distribuyen alrededor de China, siendo la especie *Hydrangea macrophylla* la más conocida y cultivada en gran parte del mundo (Codarin *et al.*, 2006).



Figura 1. Hortensia (*Hydrangea macrophylla*).

La hortensia en su mayoría es utilizada para la decoración de interiores y exteriores. Las características atractivas de la hortensia son debido a la epigenética que estudia los procesos bioquímicos que regulan la actividad de los genes y que responden a la influencia del ambiente; en este caso a la acidez o basicidad del suelo, resultando inflorescencias de colores tales como: blanco, violeta, rosado, azul o rojo (Kesumawati *et al.*, 2006).

El control del pH, aluminio y fósforo en el suelo permite conseguir varias coloraciones en las inflorescencias de la hortensia. El cambio de color de rojo a azul en sus sépalos es atribuido a altas concentraciones de Aluminio. Los cultivos que poseen un pH del suelo entre 5,8 a 6,2 (ácido), altos niveles de fósforo y bajas concentraciones de potasio y molibdeno se manifiesta inflorescencias de color rosado, para obtener flores de color azul el pH debe ser mas ácido entre 5 a 5,5, bajos niveles

de fósforo y altas cantidades de potasio y molibdeno. Se puede usar fertilizantes que tengan fósforo o aluminio para ayudar al cambio de color en los sépalos de la hortensia (Orozco, 2012).

En este contexto, la hortensia para climas mediterráneo y continental no deben estar expuestas directamente al sol; sus hojas por su tamaño, grande, tienden a deshidratarse. Por esto es esencial mantener las plantas en las condiciones de sombra por la tarde (Smith *et al.*, 2010), además la cantidad y calidad de luz y temperatura ambiente tienen gran importancia en el florecimiento (Nordlia *et al.*, 2011).

Medicinalmente se han utilizado las raíces secas para tratar enfermedades gastrointestinales, así como para el tratamiento de la disforia (Ding *et al.*, 1997). Estudios farmacológicos muestran que tiene propiedad antimalárica (Ishih *et al.*, 2003), antialérgico (Mastuda *et al.*, 2002), antifúngico (Yang *et al.*, 2002), antidiabético (Zhang *et al.*, 2009), anticoccidial, antihipercolesterolémico y actividades antioxidantes (Kim *et al.*, 2009). Además, las hojas sumergidas en agua caliente ayudan a madurar tumores y tratar el dolor (Orozco, 2012).

1.4.1.2. Clasificación taxonómica

En la tabla 1. Se puede ver la taxonomía de la hortensia *Hydrangea macrophylla* (Pérez, 2016). (Anexo D).

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de la hortensia.

TAXONOMÍA DE LA HORTENSIA	
SUPERREINO	EUKARYOTA
REINO	PLANTAE
DIVISIÓN	MAGNIOLOPHYTA
CLASE	Equisetopsida C. Agardh
SUBCLASE	Magnoliidae Novák ex Takht.
SUPERORDEN	Asteranae Takht.
ORDEN	Cornales Link

FAMILIA	Hydrangeaceae Dumort.
GÉNERO	<i>Hydrangea L.</i>
ESPECIE	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Thunb.) Ser.
NOMBRE COMÚN	Hortensia

1.4.1.3. Descripción botánica

Hydrangeaceae Dumort. es una familia de varios géneros donde se puede encontrar arbustos perennes, viñas o hierbas de rizomas leñosos. Sus hojas son perennes o caducas, con el margen entero o dentado; posee pecíolos prominentes a poco visibles. Las inflorescencias cimosas, a veces se encuentran en corimbos o panículas, escasamente pubescente (Hufford, 2001).

Presenta flores comúnmente hermafroditas con cálices dilatados, que son atractivas; la cantidad de sépalos varía entre 4-5, que están libres o unidos basalmente. Sin embargo, en la figura 2 se puede observar; los pétalos (4-12) son basalmente fusionados o completamente unidos con estambres filamentosos lineares o planos con bifurcaciones distales presentes o ausentes (Hufford, 2001). El ovario puede ser ínfero o semiínfero ovado, los carpelos de 2 a 5. Los óvulos pueden ser pocos o numerosos, anátropos. Además, los estambres se encuentran intercalados con los pétalos en un número de 8; las anteras redondeadas; los estilos son de 2 a 3, subulados y con estigmas truncados (Durán, 1999).



Figura 2. Estructura de la hortensia

Fuente: (Hufford, 2001).

En el Ecuador se encuentra distribuida en Pichincha, Azuay, Tungurahua, Imbabura con un tipo de vegetación muy diversa. Su floración puede ser de marzo a noviembre o durante todo el año, esto va a depender de la especie y del clima en que se esté desarrollando (Orozco, 2012).

1.4.1.4. Plagas y enfermedades

El género *Hydrangea L.* tiene registrado más de 500 variedades de cultivos, los mismos que son el resultado de la investigación genética en Japón. A pesar de ser abundantemente manipulada, esta planta se ve afectada por una serie de plagas como: pulgones, ácaros, hormigas, negrilla y enfermedades que pueden ser de tipo fúngico como: clorosis, oídio o alternariosis.

Otras plagas que afectan a la hortensia son la araña roja y la cochinilla algodonosa. Entre las enfermedades causadas por hongos destacan:

- *Botrytis cinerea*, con pudrición de hojas y brotes. Se debe aplicar productos a base de captan, tiram, zineb, etc. (InfoAgro, 2016).
- *Ascochyta hychengeae* (Arn.) causan manchas regulares, de color verde grisáceo o pardo sobre las hojas. Realizar tratamientos a base de zineb o captan (InfoAgro, 2016)
- *Oidium hortensiae* (Joerst). En el envés de la hoja se forman manchas color gris blanquecino y el haz se vuelve color verde oscuro. Son eficaces los tratamientos con benomilo, quinometionato y azufre (InfoAgro, 2016)
- El nemátodo *Ditylenchus dipsaci* (Filip) ocasiona el ensanche de los tallos, que se encogen o arquean. Las hojas se quedan pequeñas y retorcidas. Los tratamientos con agentes químicos no dan buenos resultados, así que se debe hacer un tratamiento preventivo (Hufford, 2001).

1.4.2. Cultivo *in vitro*

1.4.2.1. Generalidades

El cultivo de tejido vegetal es un grupo de técnicas que se realiza sobre un medio nutritivo que consiste en tomar o aislar una parte de la planta llamada explante y proporcionarle las condiciones óptimas de temperatura, luz, nutrientes, pH, entre otros, con la finalidad de establecer protocolos óptimos de micropropagación de especies vegetales a gran escala libres de agentes patógenos (Pierik, 1990).

En la actualidad, el cultivo *in vitro* se lo puede utilizar para diferentes propósitos como estudios a nivel fisiológico, genético y bioquímico y posee una variedad de aplicaciones entre las cuales tenemos: (Martínez, 2006).

- Propagación masiva de plantas libres de contaminación y enfermedades
- Clonación de individuos con mejores características agrarias.
- Producción de metabolitos secundarios.
- Mejoramiento genético.
- Germinación de semillas.
- Conservación e intercambio de germoplasma.

Es importante considerar que para establecer un protocolo de micropropagación se necesita de un medio de cultivo que tenga los requerimientos de una futura planta o tejido formado. El medio de cultivo está constituido esencialmente por: nutrimentos minerales, vitaminas, fuentes de carbono, fitoreguladores, aminoácidos y materiales inertes, estos son los elementos necesarios para el mantenimiento y manipulación de plantas *in vitro* (Sandoval *et al.*, 1991).

1.4.2.2. Etapas de la micropropagación vegetal *in vitro*.

Las técnicas de cultivo *in vitro* constan de varias fases y cada una tiene requerimientos específicos en cuanto a composición del medio nutritivo y ambiente. La etapa preparativa o cero, que incluye la selección del material vegetal donador de explantes y su cultivo con el fin de obtener plantas sanas, una etapa inicial, uno o de establecimiento que requiere la selección y desinfección del explante. Otra etapa es la dos o de multiplicación, que es de suma importancia para el cultivo *in vitro*; ya que tiene el objetivo de obtener la mayor cantidad de plántulas (Simón, 2006). La etapa tres o de enraizamiento donde se busca devolver a la planta su capacidad de función autótrofa. Finalmente, la etapa cuatro o de aclimatación, que consiste en la transferencia de la planta de la fase de laboratorio al campo (Roca & Mroginski, 1993).

1.4.2.2.1. Fase de preparación

Anteriormente se consideraba que no era una etapa importante pero debido a que existía contaminación al momento de la introducción se estableció como una fase fundamental para el desarrollo de un sistema de micropropagación eficiente, además tiene una alta influencia en la calidad de las plantas finalmente obtenidas (Perez *et al.*, 2000).

En esta etapa se seleccionan las plantas que tengan las mejores características y se preparan las plantas madres que van hacer utilizadas en el proceso de cultivo *in vitro*; por tanto, es recomendable mantener a las plantas en condiciones controladas de luz, temperatura, pH, humedad y riego durante un periodo de tiempo (Roca & Mroginski, 1993), en condiciones sanitarias óptimas con los requerimientos nutricionales (Daorden, 2007).

Las características fenotípicas es otro elemento importante al momento de seleccionar los explantes; se recomienda usar muestras con una edad fisiológica similar (Pierik, 1990). Además, en esta etapa se puede utilizar fungicidas, bactericidas; ya sea sistémicos y de contacto para evitar una futura contaminación (Pérez , 1998).

1.4.2.2.2. Fase de desinfección

El propósito de esta etapa es obtener plantas viables para la multiplicación *in vitro*, para esto se selecciona el tipo de explante con el que se va a trabajar pueden ser: yemas, trozos de hojas, porciones de raíces o semillas, etc. La contaminación es uno de los principales problemas y existen dos posibles fuentes; contaminación exógena, los que se encuentran en la superficie o contaminación endógena, la que se encuentra en el interior de los tejidos (Valentin, 2005).

Para la contaminación exógena se hará una desinfección para eliminar los contaminantes externos (hongos, bacterias), este proceso puede incluir lavados con tensoactivos, utilización de bactericidas y fungicidas ya sea sistémicos o de contacto, hipoclorito de sodio o calcio a diferentes concentraciones, seguidos por enjuagues con agua estéril o agua destilada (Pérez J. , 1998).

En el caso de la contaminación endógena se puede utilizar antibióticos en el medio de cultivo o hacer lavados con los mismos por tiempos más prolongados, primero es importante determinar el patógeno que posee el explante para utilizar el antibiótico adecuado (Esquivel *et al.*, 1994).

1.4.2.2.3. Fase de establecimiento

Después de la desinfección y en condiciones de asepsia (cámaras de flujo), se cultiva el tejido en el medio de cultivo escogido. El tamaño del explante es importante, mientras más grande sea más fácil se contaminará; por el contrario, si el tamaño disminuye, las probabilidades de propagación se reducen al igual que la contaminación del explante (Pérez, 1998).

La función primordial en esta etapa es establecer el explante en el medio de cultivo e inducir al desarrollo de brotes múltiples para su posterior multiplicación, lo

que podría involucrar: estimulación en la formación de brotes axilares, iniciación en brotes adventicios (hojas, brotes, escamas de bulbos o material similar) y formación de callo (Hartmann, 1995).

1.4.2.2.4. Fase de multiplicación

El objetivo principal en esta etapa es obtener la mayor cantidad de plantas a partir de cada explante que previamente se estableció. Este proceso se realiza con ayuda de ciertos fitoreguladores como: citoquininas, auxinas, brasinolidas, etileno y ácido abscísico. Cada una de las estructuras se divide y se transplanta en un medio nuevo y fresco, cumpliendo con los requerimientos exactos que la planta necesita (Pérez, 1998).

1.4.2.3. Organogénesis

En la propagación *in vitro* es importante el desarrollo de la organogénesis para la producción de tejidos u órganos nuevos, este requiere que las células sean adecuadas y receptivas a procesos de desdiferenciación y diferenciación celular (Smith, 2012).

Existen dos tipos de organogénesis: la organogénesis directa e indirecta. La primera se da, sin la ocurrencia de un proceso extenso de desdiferenciación y se observa la formación de masas celulares indiferenciadas conocidas como callo; mientras que en la segunda existe la formación del callo, previo a formar brotes (Acosta, 2012).

1.4.2.4. Principios activos

1.4.2.4.1. Generalidades

Los principios activos son sustancias que se encuentran en diferentes partes de las plantas; básicamente tienen funciones específicas como: atrayentes o repelentes de animales y sirven de defensa contra diferentes patógenos (Lock, 1994). Además, pueden llegar a ser muy útiles para el ser humano al usarlos como: medicinas, plaguicidas, colorantes, fragancias, edulcorantes, etc. (Bourgaud *et al.*, 2001). La mayoría de los principios activos de plantas están comprendidos dentro de los llamados productos naturales o metabolitos secundarios.

Existen dos tipos de sustancias activas en la planta, la primera que proviene del metabolismo primario (Compuestos del Bioquímico), que se los obtiene a partir de la fotosíntesis como: glúcidos, lípidos, derivados de aminoácidos. La segunda (Compuestos del Químico) que proviene del metabolismo secundario, derivados principalmente de la asimilación del nitrógeno (Lerchundi, 2006), estos son compuestos químicos de estructura compleja con distribución restringida, considerados no indispensables en las plantas pero necesarios para la supervivencia de las plantas en el medio ambiente (Lock de Ugaz, 1998).

Podemos encontrar una amplia gama de metabolitos secundarios, estos se clasifican en varios grupos de acuerdo con sus rutas biosintéticas y características estructurales de los cuales los más estudiados desde el punto de vista de la salud son: compuestos fenólicos, terpenos, glicósidos, alcaloides etc. (Lattanzio, 2013).

1.4.2.4.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios de mayor difusión. Se estima que alrededor del 2% de todo el carbono producido en la fotosíntesis se convierte en flavonoides o compuestos estrechamente relacionados. Además, se ha demostrado que las hojas de las plantas vasculares contienen ésteres, amidas y glucósidos de ácido hidroxicinámico; flavonoides, especialmente los flavonoles y proantocianidinas (Lattanzio, 2013).

Los compuestos fenólicos exhiben una amplia gama de propiedades fisiológicas, tales como anti-alergénico, anti-inflamatorio, anti-microbiano, antioxidante, anti-trombótica, efectos cardioprotectores y vasodilatadores (Parr, 2000). Estos elementos son parte esencial de la dieta humana, y son de considerable interés debido a sus propiedades antioxidantes (Nagendran, 2006).

1.4.2.4.3. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se relaciona con compuestos capaces de preservar un sistema biológico del efecto perjudicial de procesos que causan excesiva oxidación

(Álvarez, 2010). Esta actividad relacionada con compuestos fenólicos depende de la estructura química, en particular del número y las posiciones de los grupos hidroxilo y la naturaleza de sustituciones en los anillos aromáticos (Nagendran, 2006). Estudios epidemiológicos, demuestran que una dieta bien balanceada que contenga gran cantidad de antioxidantes, reduce la incidencia de cáncer de la próstata, de mama, renal, y de otros tipos (Lunawati, 2012).

1.4.2.4.4. Azúcares reductores

Los glúcidos tienen diversas funciones en los organismos como fuente de energía o formador del material estructural de las membranas, entre otras, por lo que se consideran moléculas versátiles. Según su estructura estos compuestos se pueden clasificar en:

- Monosacáridos simples y compuestos.
- Oligosacáridos
- Polisacáridos simples y compuestos

Los monosacáridos o azúcares reductores están constituidos por una función cetónica o aldehídica, estos tienen importancia clínica; ya que son capaces de detectar deficiencia de enzimas (Granda, 2014).

1.4.2.4.5. Marcha fitoquímica

La marcha fitoquímica es un proceso que consiste en la obtención del extracto etanólico de una planta mediante una partición líquido-líquido con solventes. En esta fase, la bioactividad trata de descifrar las propiedades útiles de la planta en estudio mediante el fraccionamiento o separación de distintos compuestos según la regla de afinidad. El fundamento del screening fitoquímico es aislar y purificar compuestos presentes en la muestra vegetal y a su vez que las moléculas que estén presentes en la planta den reacciones con diferentes reactivos, afirmando o negando su presencia (Albornoz, 1980).

1.4.2.4.6. Principios activos en *Hydrangea macrophylla*

Se ha reportado que las plantas pertenecientes al género *Hydrangea* poseen: fenoles, taninos, glicósidos, alcaloides, terpenos y esteroides (Wang, 2013). Los resultados de diferentes investigaciones científicas han revelado las ventajas de la hortensia, donde se expone su utilidad; así como la efectividad de sus principios activos, lo cual se evidencia en el estudio publicado por (Kiseko, 2000), en el que describe la inhibición del crecimiento de *Plasmodium falciparum* con el uso de extractos de la hoja, la misma que contiene sustancias antimaláricas que pueden ser administradas vía oral.

Existen investigaciones que muestran que los usos de un extracto acuoso de las partes aéreas de la planta tienen un significativo efecto hipoglucémico, como se señala en su artículo: Bioactive Constituents from *Hydrangea seemannii* and identification in the fingerprint of the infusion development by UPLC-PDA (Pérez A. , 2013).

Según Ujihara (1995) el componente que se encuentra en cantidad significativa en las hojas de la planta, es una isocumarina, filodulcina (figura 3), que es 200-400 veces más dulce que la sacarosa en la lengua humana. Estudios realizados en la filodulcina concluyen que esta puede ser útil para mejorar la intolerancia a la glucosa en la sangre y anomalías de condiciones diabéticas (Eunju, 2016).

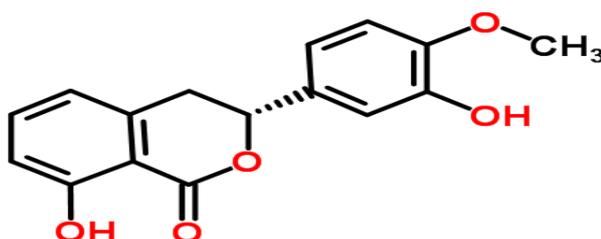


Figura 3. Estructura química de la filodulcina.

Fuente: (ChemSpider, 2016).

Además, trabajos como: Chemical Constituents from the *Hydrangea chinensis* detallan los compuestos fenólicos que posee la hortensia y las diversas

funciones biológicas que indican la posibilidad de tener actividades farmacológicas (Taha, 2003).

1.5. Hipótesis

Existe variación entre los componentes bioquímicos de plantas *in vivo* e *in vitro* de *Hydrangea macrophylla*.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

El proyecto de tesis fue desarrollado por Denisse Carolina Puebla Sánchez, con la colaboración de MSC. Mónica Jadán, Directora del proyecto y Dra. Blanca Naranjo como asesora científica

2.2. Zona de estudio

La investigación inició con una revisión bibliográfica de los estudios relacionados con el cultivo *in vitro* de hortensia. Posteriormente se inició a las fases de campo y laboratorio.

2.3. Fase de campo

Localización geográfica del invernadero

Se utilizó plantas de hortensia (*H. macrophylla*), las cuales fueron proporcionadas por la empresa Germoplanta Cia Ltda, ubicada en la calle Almendros 3B y Viñedos Cantón Rumiñahui en la provincia de Pichincha.

2.3.1. Fase preliminar

Esta fase se realizó con el fin de eliminar la mayor cantidad de patógenos, se efectuaron desinfecciones con fungicidas y bactericidas sistémicos cada dos semanas, donde se usó:

Phyton: bactericida/fungicida sistémico cuyo ingrediente activo es el sulfato de cobre pentahidratado. La dosis de 2 mL/L

Dorbaq 208: bactericida/fungicida cuyo ingrediente activo es el Nitrógeno. La dosis de 2,5 mL/L

La aplicación de cada uno de los fungicidas y bactericidas se realizó en horarios de 7:00 am y 5:00 pm, donde la temperatura ambiental fue baja. A esta hora la planta se encuentra en estado de intercambio foliar activo; es decir, es un instante óptimo para lograr una buena absorción de la sustancia química.

Las plantas expuestas al control fitosanitario fueron utilizadas para el establecimiento *in vitro*, donde se tomó yemas apicales, laterales y hojas para su introducción.

2.4. Fase de laboratorio

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente al Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicado en Sangolquí, con dirección: Av. General Rumiñahui, de la provincia de Pichincha, Ecuador, y cuyas coordenadas

son: Latitud 0°18'53, 891'' (Sur), Longitud 78°26'46,562 (Oeste), Altura elipsoidal 2 518,640 m.

2.4.1. Material vegetal

Se utilizaron dos tipos de explantes en este estudio (Figura 4). Las hojas jóvenes y las yemas laterales y apicales que no presentaban daños ni manchas; además se tomó en cuenta que la hoja posea peciolo para su posterior propagación, se cortó a la hoja tomando parte de la nervadura principal con un tamaño aproximado de 1 cm por cada explante y las yemas seleccionadas fueron de 3-5 cm de longitud.



**Figura 4. Explantes de hortensia
(a) hoja, (b) yemas.**

2.4.2. Instrumental

Previa a la introducción de los explantes, se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol al 70% v/v y se la esterilizó con luz ultravioleta (UV) por 40 minutos antes y después de introducir todos los materiales necesarios para realizar la siembra como se indica en la figura 5. Las operaciones de inoculación, transferencia y manipulación del material vegetal fueron realizadas en una cabina de flujo laminar horizontal.



Figura 5. Cámara de flujo laminar esterilizada con los materiales para siembra de explantes.

2.4.3. FASE I: Desinfección de las muestras vegetales

Después del tratamiento preliminar de las plantas madre y la respectiva selección y corte de los explantes para su uso, se inició el proceso de desinfección para eliminar todos los patógenos presentes tanto endógena como exógenamente.

2.4.3.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo para la introducción del material vegetal fue un Murashige & Skoog (MS) 1962, cuyos componentes se detallan en la tabla 2. La concentración de agar fue de 7 g/L y 30 g/L de sacarosa ajustado a un pH de 5.8, se utilizó frascos de vidrio con 25 mL de medio de cultivo, el mismo que fue esterilizado en una autoclave horizontal por 20 min a 121°C y 15 PSI.

Tabla 2.

Componentes del Medio Murashige & Skoog (MS) 1962, utilizado para la etapa de desinfección.

Micro Elementos	mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	36.7
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.25

ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Macro Elementos	mg/L
CaCl ₂	332,02
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
MgSO ₄	180,54
NH ₄ NO ₃	1650
Vitaminas	mg/L
glicina	2
mio-Inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
HCl piridoxina	0.5
Tiamina HCl	0.1

2.4.3.2. Desinfección del material vegetal

El protocolo de desinfección para los dos tipos de explantes consistió en un lavado previo para remover cualquier impureza o tejido viejo con agua corriente por 30 minutos, enseguida se sumergió con DORBAQ al 5% p/v durante 30 minutos. Luego, se realizó un lavado en una solución de detergente a una concentración de 1% p/v durante 15 minutos en agitación. Se hizo un lavado con alcohol al 7% p/v por 10 segundos, después se introdujeron los explantes en cloruro de mercurio al 1% p/v por un minuto, cumplido el tiempo de cada etapa en la desinfección se ejecutaron tres lavados con agua estéril, inmediatamente se utilizó antibiótico (cefatoxima) por 30 minutos. Por último, se aplicaron los tratamientos a evaluar en esta fase (Tabla 3), donde se tomó en cuenta dos variables: la concentración de la solución de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión de los explantes en dicha solución.

Tabla 3.

Tratamientos de desinfección entre la variable concentración de hipoclorito de sodio versus tiempo de inmersión de los explantes de hoja.

Tratamiento	Concentración hipoclorito de sodio (%V/V)	Tiempo inmersión (min)
1	1	5

2	1	10
3	1,5	5
4	1,5	10

Consecutivamente se procedió a realizar tres lavados con agua destilada estéril dentro de cámara, de esta manera se retiró el exceso de hipoclorito de sodio de los explantes.

Para los explantes de yemas laterales y apicales, se realizó el mismo procedimiento de desinfección que el de hojas, donde se tomó en cuenta una variable: tiempo de inmersión de los explantes en dicha solución, la misma que se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4.
Tratamientos de desinfección entre la variable concentración de hipoclorito de sodio versus tiempo de inmersión de los explantes de yemas.

Tratamiento	Concentración hipoclorito de sodio (%V/V)	Tiempo inmersión (min)
1	3,5	3
2	3,5	5
3	3,5	8

2.4.3.3. Condiciones físicas del cultivo

Los explantes usados para organogénesis directa fueron incubados en una sala cuya temperatura se mantuvo a 25°C, humedad (60%) con un fotoperiodo (12 horas), en cambio los explantes para callogénesis fueron incubados en total oscuridad.

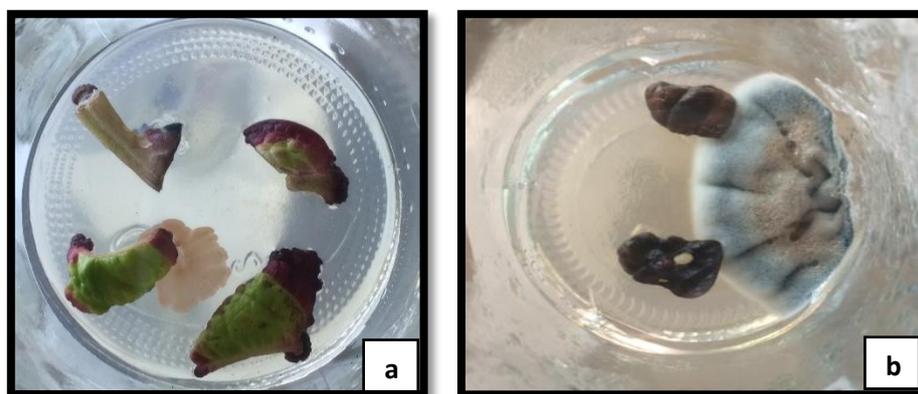
2.4.3.4. Evaluación

Durante esta etapa se evaluaron los parámetros de contaminación y oxidación de los explantes. Se evaluó a los 30 días de cultivo en donde se observó: porcentaje (%) de explantes contaminados ya sea bacteria u hongo y porcentaje (%) de oxidación.

Las variables a ser evaluadas se detallan a continuación:

Contaminación

Visualmente se determinó si los dos tipos de explantes mostraban o no contaminación sea hongo o bacteria y se valorizó cada explante: con “0” a los explantes contaminados y “1” a los no contaminados (figura 6).



**Figura 6. Contaminación de explantes:
(a) por bacteria, (b) por hongo.**

Oxidación

Mediante observación se determinó si un explante presentaba o no daño en el tejido basado en su color, los explantes oxidados se les dio el valor de “0” (color café, amarillo, blanco) y aquellos que no presentaron oxidación el valor de “1” (color verde) (Figura 7).

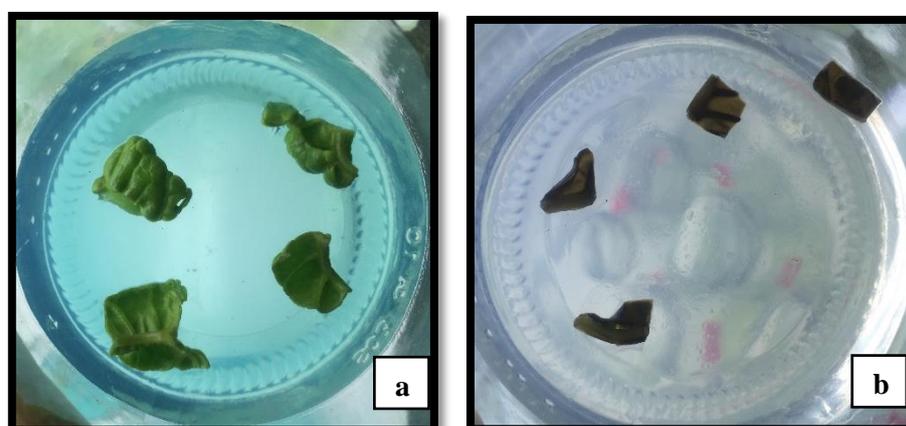


Figura 7. Oxidación de explantes: (a) explantes sin oxidación, (b) explantes oxidados.

Finalmente, para el análisis estadístico se realizaron veinte repeticiones por cada tratamiento de desinfección de hojas y diez para la desinfección de yemas, según lo indicado en la tabla 3 y 4, teniendo como unidad experimental un explante por frasco con medio de cultivo. Para la evaluación estadística de los tratamientos de hoja se estableció un diseño completamente al azar (DCA) de 2x2 y para yemas de 1x3.

2.4.4. FASE II: Introducción y multiplicación de brotes a partir de yemas

Después de la etapa de desinfección, se inició el proceso de introducción para establecer el medio adecuado en que se va a desarrollar la planta *in vitro*. En esta fase de la investigación se tuvo por objetivo encontrar las mejores concentraciones de fitoreguladores para la proliferación de la planta.

Una vez que los explantes no presentaron contaminación, se cambió a un medio semisólido de Murashige & Skoog (1962) modificado (únicamente sales macro y micro) suplementado con Vitaminas Gamborg (1966); con 30 g/L de sacarosa como fuente de carbono y 7 g/L de agar, ajustado a un pH de 5.8. Los explantes sembrados se incubaron a 25°C con un fotoperiodo (12 horas).

En el medio de proliferación se utilizó distintas concentraciones de 6-BAP (6-bencilaminopurina). Se realizaron 15 repeticiones por cada uno de los tratamientos descritos en la tabla 5.

Tabla 5.
Tratamientos con respecto a la variable 6-BAP para los explantes de yemas para la fase de introducción a partir de yemas de hortensia (*Hydrangea macrophylla*).

Tratamiento	Concentración de 6-BAP (mg/L)
0	0
1	3
2	3,5

3	4
---	---

Se evaluó las siguientes variables:

Presencia o ausencia de brotes: se visualizó el apareamiento de brotes en el explante, dado valores de “0” a explantes que presentaban brotes y “1” a los que no presentaban brotes (Figura 8a).

Número de brotes: se observó la cantidad de brotes que presentaban los explantes a los 15, 30 y 45 días (Figura 8b).

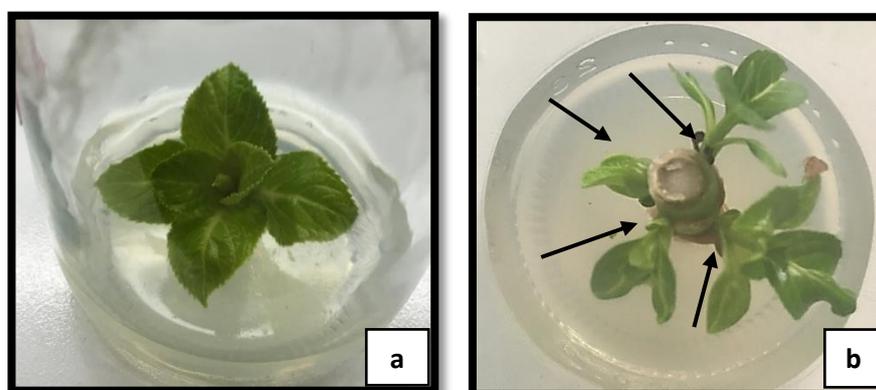


Figura 8. Explantes con (a) Presencia de brotes y (b) número de brotes (4).

2.4.5. Fase III: Inducción de callos a partir de secciones de hoja

Después de establecer el mejor tratamiento de desinfección, se sembró los explantes en un medio de cultivo suplementado con fitohormonas, con la finalidad de inducir la formación de callo en los explantes de hoja. El material vegetal fue sembrado en un medio semisólido de Murashige & Skoog (1962) con vitaminas; con 30 g/L de sacarosa como fuente de carbono y 7 g/L de agar, ajustado a un pH de 5,8. Los explantes sembrados se incubaron a 25 °C en oscuridad.

Este medio fue suplementado con dos distintas concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-bencilaminopurina (6-BAP), obteniendo como resultado cuatro tratamientos distintos para la inducción de callo, los mismos que se especifican en la tabla 6.

Tabla 6.
Tratamientos de medios de cultivo con combinaciones de 6-BAP y 2,4-D, para la fase de inducción de callos de hortensia (*Hydrangea macrophylla*).

Tratamiento	Concentración de 6-BAP (mg/L)	Concentración de 2,4-D (mg/L)
0	0	0
1	0,5	0,5
2	0,5	1
3	1	0,5
4	1	1

A los 30 días de cultivo, se evaluó:

Presencia o ausencia de callo: se visualizó la formación de tejido calloso en el explante, dando valores de “0” a explantes que presentaban callo y “1” a los que no presentaban.

Oxidación: mediante observación se determinó si un explante presentaba o no daño en el tejido basado en su color, los explantes oxidados se les dio el valor de “0” (color café, amarillo, blanco) y aquellos que no presentaron oxidación el valor de “1” (color verde).

Se realizaron 20 repeticiones por cada uno de los tratamientos descritos en la tabla 6 y se tomó en cuenta como unidad experimental, un frasco. Visualmente se evaluó la variable desdiferenciación celular o inducción de callo. Se asignó el valor de “0” a los explantes con presencia de callo (Figura 9a). En cambio, a las muestras vegetales que no presentaron desdiferenciación celular se les asignó el valor de “1” (Figura 9b).

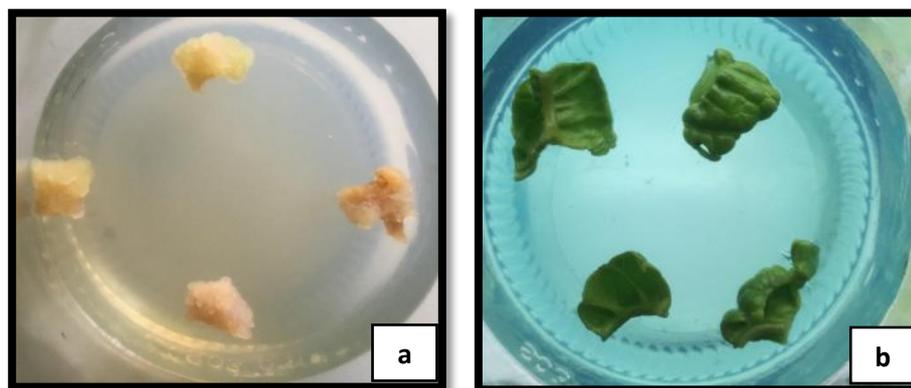


Figura 9. (a) Presencia de callo, (b) ausencia de callo.

Análisis estadístico

La evaluación se realizó al cumplir los 15 y 30 días del cultivo de yemas y hojas respectivamente, obteniéndose un análisis estadístico exploratorio de datos mediante construcción de gráficas y se empleó un análisis inferencial realizando análisis de varianza (ANOVA) con sus supuestos: gráfica Q-Q plot y la prueba de Shapiro-Wilks modificado; si los datos no cumplen una distribución paramétrica se realizará la prueba de Kruskal-Wallis. Se utilizó InfoStat y Excel para realizar las pruebas estadísticas.

2.4.6. Fase IV: Análisis fitoquímico

Para la identificación de los principios activos se procedió a secar las hojas *in vitro* y *ex vitro* en un ambiente cerrado hasta que haya perdido toda el agua, luego se trituraron con ayuda de un mortero hasta obtener un polvo fino. Para la extracción se añadió metanol puro en una proporción de 1:3 (1 material vegetal y 3 de metanol como solvente orgánico) a cada una de las muestras, se filtró y finalmente se las dejó en reposo por 24 horas en oscuridad y a temperatura ambiente (Figura 10).

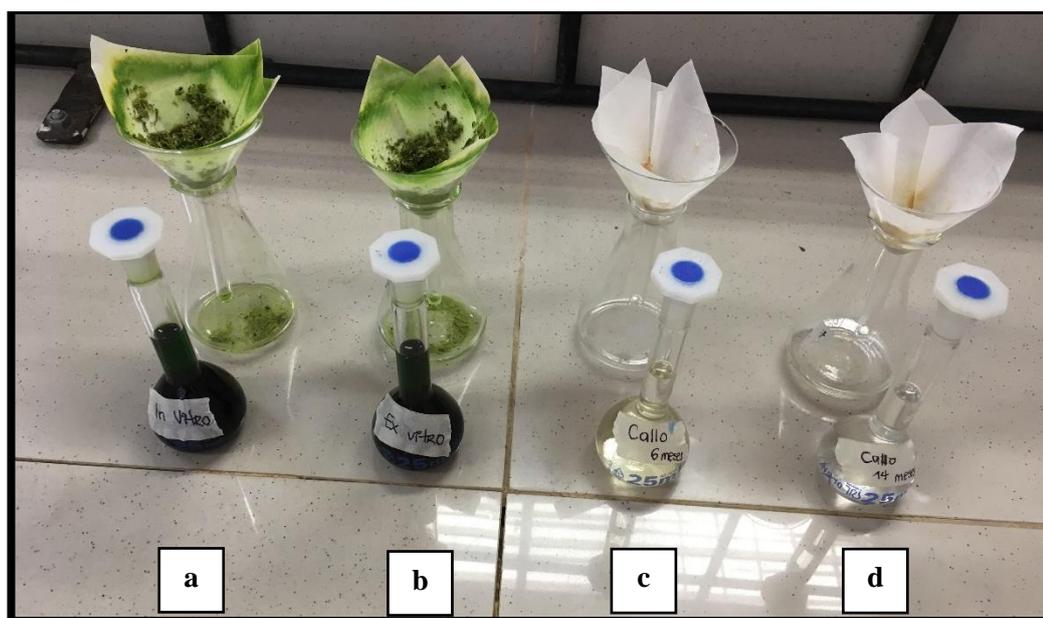


Figura 10. Extractos de: (a) hoja *in vitro* (b) hoja *ex vitro*, (c) callo de hoja de 6 meses, (d) callo de hoja de 14 meses.

2.4.6.1. Pruebas cualitativas

Para las pruebas cualitativas se determinó el contenido de metabolitos secundarios que contiene la hortensia. Para la detección de fenoles con cloruro férrico, flavonoides con cloruro de aluminio y Shinoda, carbohidratos con Molisch y Fehling, taninos con acetato de plomo y gelatina, alcaloides con Draheendorf, Mayer y ácido pícrico, terpenoides con la prueba de Salkowski y finalmente detección de esteroides de tres muestras diferentes: callo de hoja *in vitro*, hoja *in vitro* y hoja *ex vitro*.

La valoración se designó según la concentración del principio activo mediante colorimetría regido por la FDA, siendo (-) negativo, (+) poco, (++) regular, (+++) abundante de las tres muestras: hoja *ex vitro*, hoja *in vitro* y callo de hoja (Anexo B).

2.4.6.2. Pruebas cuantitativas

Después de realizar la marcha fitoquímica se midió la cantidad de fenoles, carácter antioxidante y azúcares reductores de los cuatro extractos: (a) hoja *in vitro* (b) hoja *ex vitro*, (c) callo de hoja de 6 meses, (d) callo de hoja de 14 meses (Anexo B)

2.4.6.2.1. Determinación de contenido de Fenoles

Para la determinación del contenido de fenoles se utilizó la técnica de óxido-reducción de Folin-Ciocalteu (SIGMA, 2015), basada en una reacción colorimétrica detectada espectrofotométricamente. Para la preparación de la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de ácido gálico a diferentes diluciones en agua destilada generando diferentes concentraciones de fenoles como se detalla en la tabla 7 (Ainsworth *et al.*, 2007).

Tabla 7.
Datos para realizar la curva de calibración para determinar el contenido de fenoles.

# Muestra	Ácido gálico (mL)	Concentraciones de fenoles (mg/L)
1	0	0
2	1	50
3	2	100
4	3	200
5	5	300
6	10	500

La preparación del blanco para el experimento consistió en agregar 0.1 mL de metanol con 1.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu, se agitó y se colocó 1.4 mL de Bicarbonato de Sodio (7.5%).

Para el ensayo se adicionó: 0.1 mL del extracto de cada muestra (preparado por maceración de 1 g de cada muestra y 25 mL de metanol durante 24 horas de oscuridad), 1.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 1.4 mL de Bicarbonato de Sodio (7.5%) y se dejó reposar durante 30 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo se agitaron las muestras y se colocó 1 mL de cada ensayo en la celda del espectrofotómetro para medir la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm. La concentración de fenoles de la muestra se interpoló a partir de la curva de calibración realizada (Ainsworth *et al.*, 2007).

2.4.6.2.2. Determinación de contenido de carácter antioxidante

Para el ensayo de determinación de la capacidad o carácter antioxidante de los extractos de las cuatro muestras (callo de hoja *in vitro* a los 6 y 14 meses, hoja *in vitro*, y hoja *ex vitro*), se utilizó la técnica de captación de radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Para la preparación de la curva de calibración DPPH.

En el ensayo se agregó la muestra preparado por maceración de 1 g de cada muestra y 25 mL de metanol durante 24 horas en oscuridad, Metanol y DPPH (0.5 mM) como se detalla en la Tabla 8, posteriormente se mantuvo durante 30 minutos en oscuridad, se colocó 1 mL en una celda del espectrofotómetro y se midió la absorbancia a 517 nm.

Tabla 8.
Datos para realizar la determinación del contenido de carácter oxidante.

	Metanol (mL)	Muestra (mL)	DPPH (mL)
Blanco hoja	2,9	0,1	=
Control hoja	1	=	2
Blanco callo	2	1	=
Control callo	2,5	=	0,5
Hoja <i>in vitro</i>	0,1	0,9	2
Hoja <i>ex vitro</i>	0,1	0,9	2
Callo 6 meses	0,5	2	0,5
Callo 14 meses	0,5	2	0,5

El porcentaje de radicales libres DPPH eliminados fue calculado de la siguiente manera:

$$\%DPPH = \frac{|Absorbancia\ del\ control - Absorbancia\ de\ la\ muestra|}{|Absorbancia\ del\ control|} \times 100$$

2.4.6.2.3. Determinación de azúcares reductores

Para la determinación del contenido de azúcares reductores de los extractos de callo de *in vitro* de 6 y 14 meses, hoja *in vitro*, y hoja *ex vitro* se utilizó el método

ácido dinitrosalisílico (DNS), basada en una reacción colorimétrica que se mide por medio de espectrofotometría. Para la preparación de la curva de calibración, se utilizó una solución de glucosa en agua y DNS descrito en la tabla 9.

Tabla 9.

Preparación de la curva de calibración en la determinación del contenido de azúcares reductores.

Muestra	Glucosa (mL)	Agua destilada (mL)	DNS 1% (mL)
Blanco		1,2	0,3
1	0,2	1	0,3
2	0,3	0,9	0,3
3	0,4	0,8	0,3
4	0,5	0,7	0,3
5	0,6	0,6	0,3
6	0,7	0,5	0,3
7	0,8	0,4	0,3
8	0,9	0,3	0,3
9	1	0,2	0,3

En el ensayo se agregó 0,5 mL de cada muestra, 0,7 mL agua y 0,3 mL de DNS (1%), después se colocó 1 mL en una celda del espectrofotómetro y se midió la absorbancia a 540 nm. La concentración de azúcares reductores de la muestra se interpoló a partir de la curva de calibración realizada.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

El estudio investigativo para el “**Análisis de los principios activos en la especie *Hydrangea Macrophylla* de explantes *in vivo* e *in vitro***” se realizó en cuatro etapas sucesivas. Primero, la estandarización del protocolo de desinfección de dos tipos de explantes (hojas y yemas). En la segunda etapa, se determinó la concentración de fitohormonas apropiadas para la inducción de organogénesis directa en yemas y callogénesis en hojas, la siguiente fase consistió en el análisis de los principios activos y finalmente se comparó las concentraciones de fenoles, carácter antioxidante y azúcares reductores en explantes *in vitro*, *ex vitro* y callo.

3.1. FASE I: Desinfección de las muestras vegetales

En esta fase se evaluaron las variables contaminación y oxidación. Para los explantes de hojas se probó cuatro tratamientos de desinfección que constaban de dos concentraciones de hipoclorito de sodio (1% y 1,5%) y dos tiempos de inmersión (5 y 10 minutos). Para las muestras vegetales de yemas se probó tres tratamientos, que consistían en una concentración de hipoclorito de sodio (3,5%) y tres tiempos de inmersión (3, 5 y 8 minutos). Los datos fueron evaluados a los 15 días de siembra.

3.1.1. Contaminación

Para la desinfección de yemas apicales, laterales y hojas de Hortensia (*Hydrangea macrophylla*) los tratamientos empleados fueron detallados en la tabla 3 y 4 del capítulo anterior respectivamente.

3.1.1.1. Muestras vegetales de hoja

3.1.1.1.1. Análisis exploratorio de datos

En el análisis exploratorio se pudo observar que el mejor tratamiento para conseguir la desinfección del material vegetal, fue el tratamiento 3 donde se empleó un tiempo de 5 minutos y a una concentración 1,5 % de hipoclorito de sodio. Al

disminuir la concentración de hipoclorito de sodio (1%) se observó que la presencia de contaminantes fue mayor, por otro lado, al aumentar el tiempo de exposición aumenta el índice de necrosamiento del explante.

La tabla 10 muestra el análisis de contingencia de los diferentes tratamientos que fueron utilizados en la desinfección de hojas. Se puede observar que el tratamiento 3 presenta la tasa de contaminación más baja lo que sugiere que este tratamiento es apto para la desinfección de hoja de hortensia. En cambio, el tratamiento 1 presenta la tasa de contaminación más alta lo que indica que este tratamiento es el menos apto para la desinfección de explantes de hoja.

Tabla 10.
Tabla de contingencia para contaminación respecto a los tratamientos de desinfección de hojas.

Tiempo de inmersión (min)	Concentración de Hipoclorito de Sodio	
	1 % v/v	1,5 % v/v
5	17	4
10	16	3

En la figura 11 se puede observar que el menor número de explantes contaminados es el tratamiento que posee un tiempo de inmersión de 10 minutos y una concentración de hipoclorito de sodio de 1,5%.

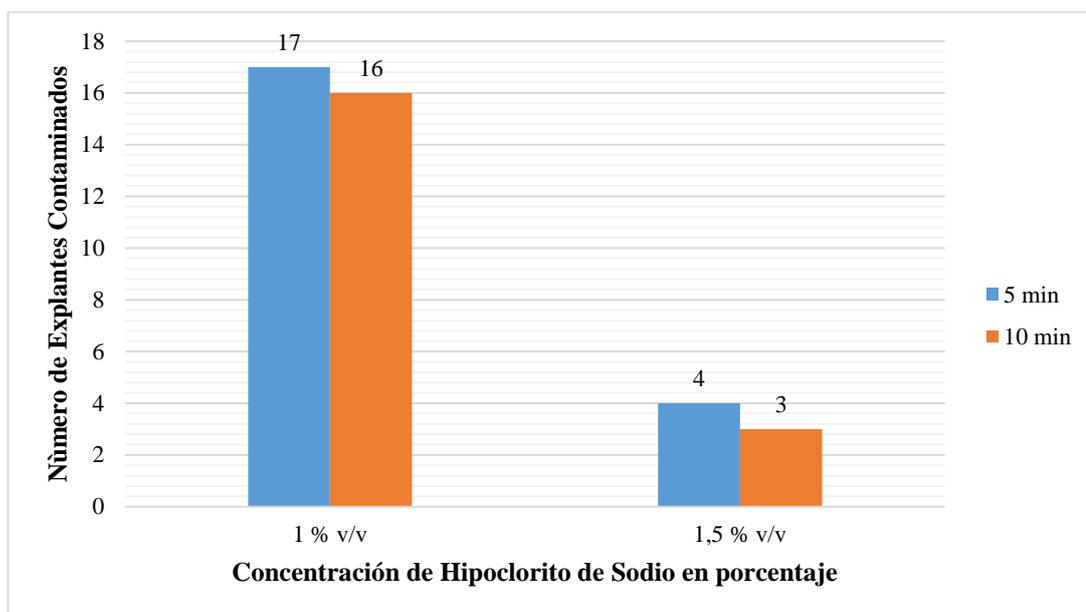


Figura 11. Número de explantes contaminados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleado en los tratamientos de desinfección (N=80, n=40)

3.1.1.1.2. Análisis Inferencial

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) se determinó si los datos son paramétricos o no paramétricos (Anexo A.1.1). Realizado el ANOVA, se obtuvo los residuos de dicho análisis para proceder a realizar la gráfica de distribución (Figura 12) y así determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos de desinfección de hojas de hortensia.

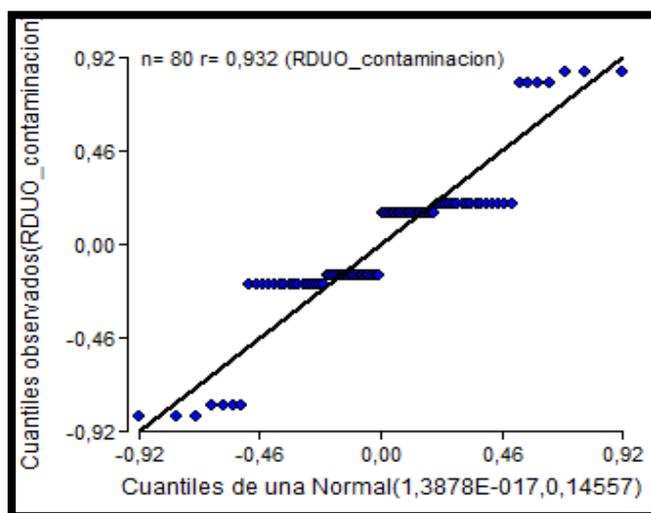


Figura 12. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Contaminación.

La figura 12 muestra que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto los datos analizados son no paramétricos y se comprobó realizando una prueba de normalidad Shapiro -Wilks modificado (Cuadro 1) donde se puede observar que el p es menor que 0,05 rechazando que los datos son paramétricos.

Cuadro 1.

Prueba de Shapiro -Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos obtenidos de contaminación.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
RDUO contaminación	80	0,00	0,38	0,86	<0,0001

Debido a que los datos son no paramétricos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, que presentó un valor de $p < 0,0001$; lo que indica que efectivamente existen diferencias significativas entre los tratamiento (Cuadro 2).

Cuadro 2.

Prueba No paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable contaminación.

Variable	Tratamiento	Conc Cl	Tiempo	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	gl	C	H	p
Contaminados (%) T1		1,00	5,00	20	0,80	0,41	1,00	52,50	3	0,75	21,63	<0,0001
Contaminados (%) T2		1,00	10,00	20	0,80	0,41	1,00	52,50				
Contaminados (%) T3		1,50	5,00	20	0,25	0,44	0,00	30,50				
Contaminados (%) T4		1,50	10,00	20	0,15	0,37	0,00	26,50				

Trat.	Ranks
T4:1,50:10,00	26,50 A
T3:1,50:5,00	30,50 A
T2:1,00:10,00	52,50 B
T1:1,00:5,00	52,50 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

En el cuadro 2 se observa que el tratamiento T4 (1,5 % v/v de hipoclorito de sodio y 10 minutos de tiempo de inmersión) posee una media de 0,15 en porcentaje de explantes contaminados y una desviación estándar de 0,37, por lo que el tratamiento 4 es el mejor para el proceso de desinfección de los explantes de hoja con respecto a los otros 3 tratamientos.

También se puede evidenciar que el tratamiento 4 es óptimo mediante el análisis de rangos, formándose dos subconjuntos (A). Adicionalmente se puede ver la presencia de dos grupos (B) con el valor de 52,50 que son los subconjuntos que poseen el mayor rango, los mismos que representan los resultados de los tratamientos de menor eficiencia para el proceso de desinfección.

3.1.1.2. Muestras vegetales de yemas

3.1.1.2.1. Análisis exploratorio de datos

En el caso de las muestras vegetales de yemas se observó que el mejor tratamiento para conseguir la desinfección del material vegetal fue en un tiempo de 5 minutos y a una concentración 3,5 % de hipoclorito de sodio (Tratamiento 2), al disminuir el tiempo de inmersión la presencia de contaminantes fue mayor; por otro lado, al aumentar el tiempo de exposición al hipoclorito de sodio aumentó el índice de necrosamiento del explante.

La tabla 11 muestra el análisis de contingencia de los tres tratamientos que fueron utilizados en la desinfección de yemas. El tratamiento 3 presenta la tasa de contaminación más baja lo que sugiere que este tratamiento es apto para la desinfección de yemas de hortensia. En cambio, el tratamiento 1 presenta la tasa de contaminación más alta lo que indica que este tratamiento es el menos apto para la desinfección de explantes de yemas de hortensia.

Tabla 11.
Tabla de contingencia para contaminación respecto a los tratamientos de desinfección de yemas.

Tiempo de inmersión (min)	Concentración de Hipoclorito de Sodio 3,5 % v/v
3	10
5	1
8	0

La figura 13 indica que el menor número de explantes contaminados es el tratamiento que posee un tiempo de inmersión de 8 minutos y una concentración de hipoclorito de sodio de 3,5%.

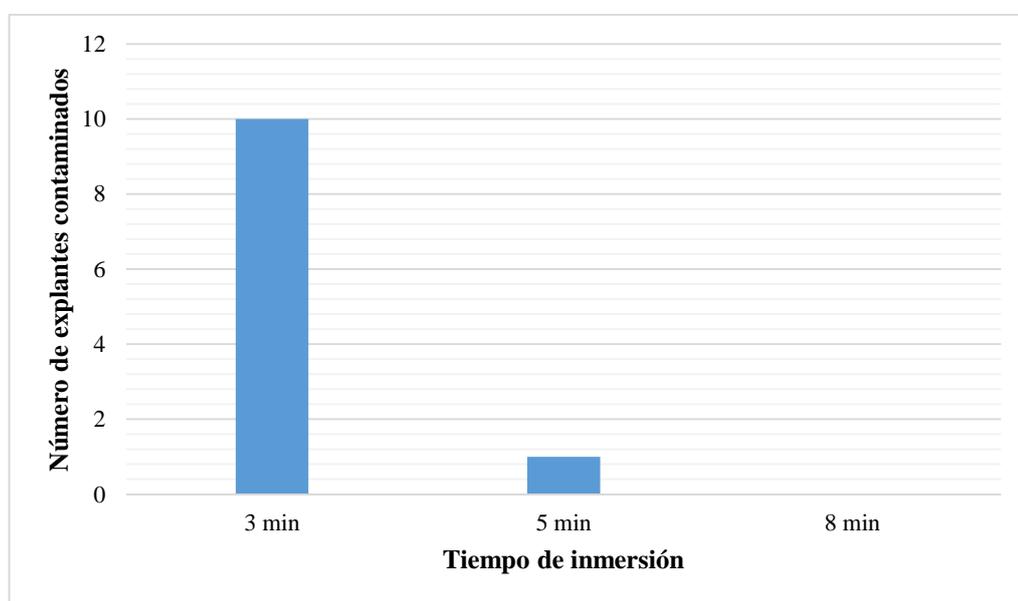


Figura 13. Número de explantes contaminados respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio empleado en los tratamientos de desinfección (N=30, n=10).

3.1.1.2.2. Análisis Inferencial

Inicialmente se realizó un análisis estadístico para determinar si los datos son paramétricos o no paramétricos mediante una prueba de ANOVA (Anexo A.1.2).

Realizado el análisis de varianza, se obtuvo los residuos de dicho análisis, para realizar la gráfica de distribución (Figura 14).

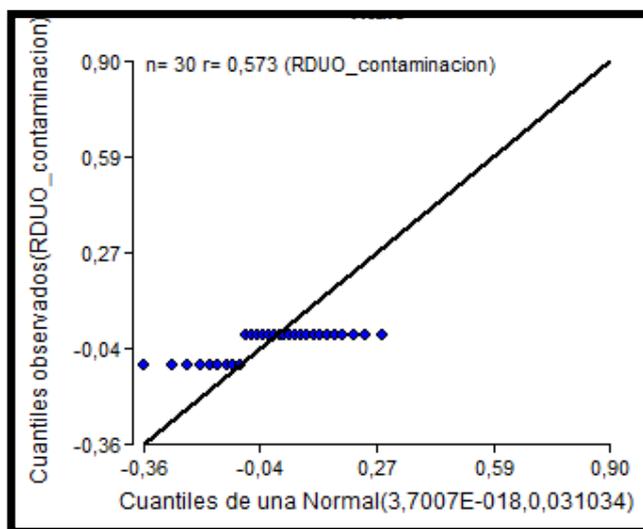


Figura 14. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Contaminación.

La figura 14 muestra que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto estos son no paramétricos y se comprobó realizando una prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (Cuadro 3) donde p es menor a 0,05 rechazando que los datos son paramétricos.

Cuadro 3.

Prueba de Shapiro-Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de contaminación.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO contaminación	30	0,00	0,18	0,40	<0,0001

Debido a que los datos son no paramétricos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, la cual presentó un valor de $p < 0,0001$; lo que indica que efectivamente existen diferencias significativas entre los tratamiento (Cuadro 4).

Cuadro 4.
Prueba No paramétrica de Kruskal Wallis,
realizada con los datos de la variable contaminación en yemas.

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
contaminacion	T1	10	1,00	0,00	1,00	17,61	<0,0001
contaminacion	T2	10	0,10	0,32	0,00		
contaminacion	T3	10	0,00	0,00	0,00		

Trat.	Ranks
T3	10,00 A
T2	11,50 A
T1	25,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

En el cuadro 4 indica que el tratamiento T3 (3,5 % v/v de hipoclorito de sodio y 10 minutos de tiempo de inmersión) posee una media de 0 en porcentaje de explantes contaminados y una desviación estándar de 0, por lo cual el tratamiento 3 es el mejor para el proceso de desinfección de los explantes de hoja con respecto a los otros 2 tratamientos.

También se evidenció que el tratamiento 2 y 3 es óptimo mediante el análisis de rangos, donde existen dos subconjuntos (A). Adicionalmente se puede ver la presencia de un solo grupo (B) con el valor de 25 que representa los resultados de los tratamientos de menor eficiencia para el proceso de desinfección.

3.1.2. Oxidación

Los explantes de Hortensia (*Hydrangea macrophylla*) sometidas a hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y tiempos de inmersión provocan oxidación en el explante, por lo que transcurrida las cuatro semanas de siembra, es primordial determinar el mejor tratamiento; los procedimientos empleados corresponden a los descritos en las tablas 3 y 4 del capítulo anterior.

3.1.2.1. Muestras vegetales de hoja

3.1.2.1.1. Análisis exploratorio de datos

Al realizar el análisis exploratorio se evidenció que para las dos concentraciones de hipoclorito de sodio y los dos tiempos de inmersión, los explantes presentaron oxidación en el tratamiento 4. En la tabla 12 se observan los explantes que presentaron oxidación, obtenidos mediante un análisis de contingencia.

Tabla 12.

Tabla de contingencia para oxidación respecto a los tratamientos de desinfección.

Tiempo de inmersión (min)	Concentración de Hipoclorito de Sodio	
	1 % v/v	1,5 % v/v
5	0	0
10	0	7

Como indica la Figura 15 a mayor tiempo de inmersión y concentración de hipoclorito de sodio, la tasa de oxidación de los explantes aumenta, mientras que al disminuir la concentración de hipoclorito de sodio disminuye, pero a su vez aumenta la contaminación del explante.

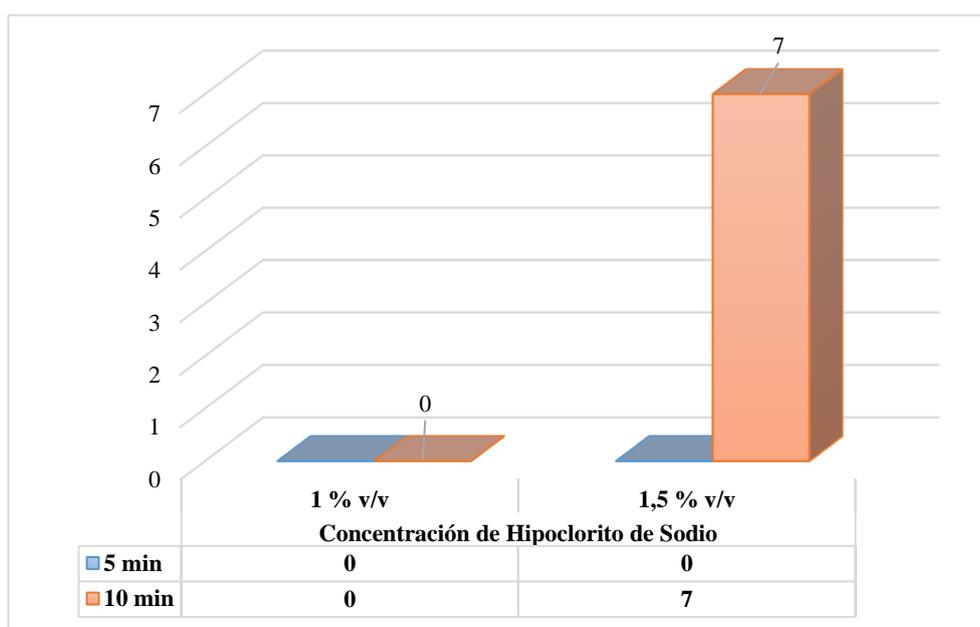


Figura 15. Número de explantes oxidados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio empleados en los tratamientos de desinfección.

3.1.2.1.2. Análisis inferencial

Se realizó un análisis estadístico para determinar si los datos son paramétricos o no paramétricos mediante una prueba de ANOVA (Anexo A.1.3). Realizado el análisis de varianza, se obtuvo los residuos de dicho análisis, para realizar la gráfica de distribución (Figura 16).

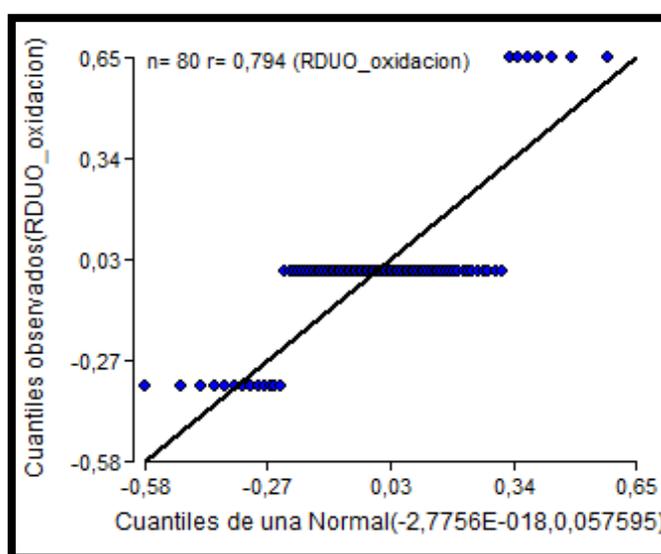


Figura 16. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Oxidación.

La figura 16 indica que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto, los datos analizados son no paramétricos y se comprobó realizando una prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (Cuadro 5) donde se confirmó que el valor de p es menor que 0,05 rechazando que los datos son paramétricos.

Cuadro 5.

Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de contaminación de hojas.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO oxidacion	80	0,00	0,24	0,63	<0,0001

Debido a que los datos son no paramétricos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, la cual presentó un valor de $p < 0,0001$; lo que indica que efectivamente existen diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 6).

Cuadro 6.
Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis,
realizada con los datos de la variable oxidación de hojas.

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
oxidacion T1		20	0,00	0,00	0,00	5,44	<0,0001
oxidacion T2		20	0,00	0,00	0,00		
oxidacion T3		20	0,00	0,00	0,00		
oxidacion T4		20	0,35	0,49	0,00		

Trat.	Ranks
T3	37,00 A
T2	37,00 A
T1	37,00 A
T4	51,00 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

El cuadro 6 indica que el tratamiento T1, T2 y T3 poseen una media de 0,00 en porcentaje de explantes oxidados y una desviación estándar de 0,00; por lo que el tratamiento T4 al tener mayor tiempo de inmersión y concentración de hipoclorito de sodio la tasa de oxidación de los explantes aumentó. También se puede evidenciar que el tratamiento 1, 2 y 3 es óptimo mediante el análisis de rangos, en el cual solo existen subconjuntos (A).

Con este análisis se puede concluir que los mejores tratamientos de desinfección de explantes fueron aquellos a los que se les sometió a una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % v/v con 5 y 10 minutos de inmersión. No obstante, los explantes expuestos a un tiempo menor de inmersión presentaron bajo índice de oxidación fenólica, siendo 5 minutos la mejor opción de tiempo para el tratamiento de desinfección

3.1.2.2. Muestras vegetales de yemas

3.1.2.2.1. Análisis exploratorio de datos

Al realizar el análisis exploratorio se confirmó que para los dos tiempos de inmersión, los explantes presentaron oxidación en el tratamiento 3. En la tabla 13, se observan los explantes que presentaron oxidación obtenidos mediante un análisis de contingencia.

Tabla 13.
Tabla de contingencia para oxidación respecto a los tratamientos de desinfección.

Tiempo de inmersión (min)	Concentración de Hipoclorito de Sodio 3,5 % v/v
3	0
5	0
8	5

La Figura 17 indica que a mayor tiempo de inmersión, la tasa de oxidación de los explantes aumenta, mientras que al disminuir el tiempo de inmersión aumenta la contaminación del explante.

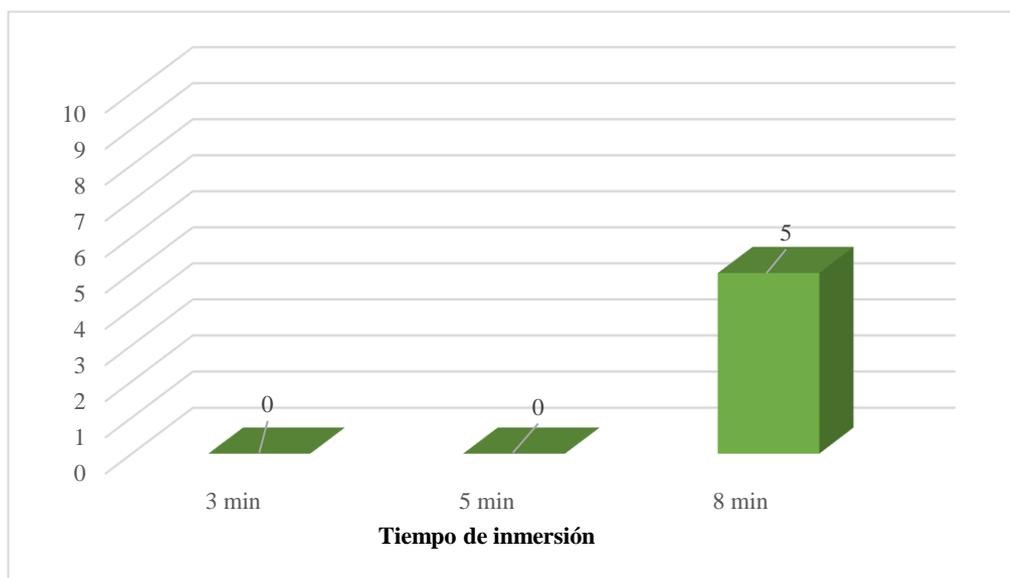


Figura 17. Número de explantes oxidados respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio empleados en los tratamientos de desinfección.

3.1.2.2.2. Análisis inferencial

Se realizó un análisis estadístico para determinar si los datos son paramétricos o no paramétricos mediante una prueba de ANOVA (Anexo A.1.4). La figura 18, muestra que los datos no siguen una distribución normal, por lo que se les considera no paramétricos y se confirma realizando una prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (Cuadro 7) donde se observó que el valor de p es menor que 0,05 rechazando que los datos son paramétricos.

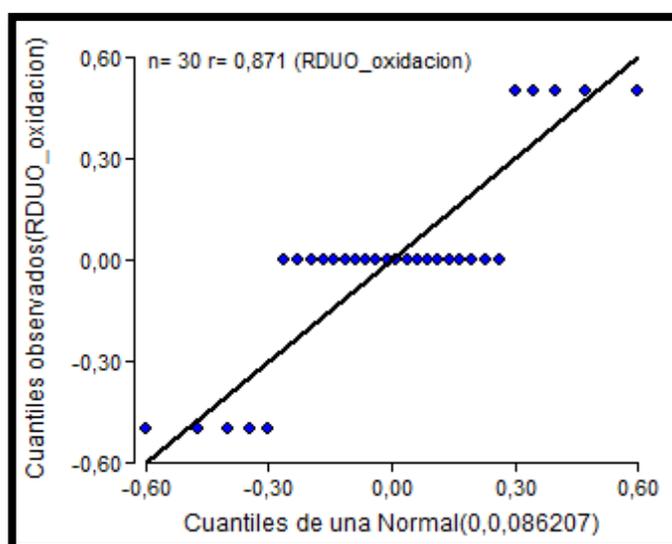


Figura 18. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Oxidación.

Cuadro 7.

Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de contaminación.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
RDUO oxidacion	30	0,00	0,29	0,74	<0,0001

Debido a que los datos son no paramétricos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, que presentó un valor de $p = 0,003$; indicando que efectivamente existen diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 8).

Cuadro 8.
Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable contaminación.

Variable	tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
oxidacion T1		10	0,00	0,00	0,00	4,84	0,0030
oxidacion T2		10	0,00	0,00	0,00		
oxidacion T3		10	0,50	0,53	0,50		

Trat.	Ranks
T2	13,00 A
T1	13,00 A
T3	20,50 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

El cuadro 8 indica que el tratamiento T1 y T2 poseen una media de 0,00 en porcentaje de explantes oxidados y una desviación estándar de 0,00; por lo que el tratamiento T3 al tener mayor tiempo de inmersión y concentración de hipoclorito de sodio la tasa de oxidación de los explantes aumentó. También se puede evidenciar que solo existen subconjuntos (A). El tratamiento 1 y 2 presentan el menor valor (13), siendo estos óptimos mediante el análisis de rangos.

Con este análisis se concluye que el mejor tratamiento de desinfección de explantes corresponde cuando se le sometió a una solución de hipoclorito de sodio al 3,5% v/v con 5 minutos de inmersión. No obstante, los explantes expuestos a un tiempo menor de inmersión presentaron bajo índice de oxidación fenólica, siendo 5 minutos el mejor tiempo para la desinfección.

3.2. Fase II: Inducción y Multiplicación de brotes a partir de yemas

En esta fase se estableció un medio para la inducción y multiplicación a partir de los explantes de yemas sembrados, se utilizaron varios tratamientos variando la concentración de fitohormonas en un medio MS.

Los datos de presencia o ausencia de brotes se los evaluó a los 30 días, mientras que los datos del número de brotes se los evaluó a los 15, 30 y 45 días una vez determinado el protocolo de desinfección en la fase anterior. Se utilizaron 3 tratamientos, utilizando diferentes concentraciones y reguladores de crecimiento.

3.2.1. Presencia o ausencia de brotes:

Los tratamientos empleados (medio de cultivo) para dicha variable corresponde a lo detallado en la tabla 5 del capítulo anterior. Mediante observación se determinó la presencia o ausencia de brotes en cada uno de los medios de cultivo con las diferentes concentraciones de fitohormonas.

3.2.1.1. Análisis exploratorio de los datos

Al realizar el análisis exploratorio se observó que el uso 6-Bencilamonipurina (6-BAP) a una concentración de 4 mg/L (Tratamiento 3) en el medio MS, permitió la obtención de una mayor presencia de brotes en los explantes de hortensia sembrados (Tabla 14). En los otros tratamientos utilizados (Tratamientos 1 y 2) existió la presencia de brotes en menor cantidad que el tratamiento 3 transcurrido el tiempo de evaluación.

Tabla 14.
Presencia o Ausencia de brotes en cada una de las repeticiones según el tratamiento utilizado.

Tratamiento	Presencia o Ausencia
T1	3
T2	5
T3	9

La figura 19 indica que existe la presencia de brotes en todos los explantes, sin embargo la mayor abundancia de brotes (9) se obtuvo en el tratamiento 3.

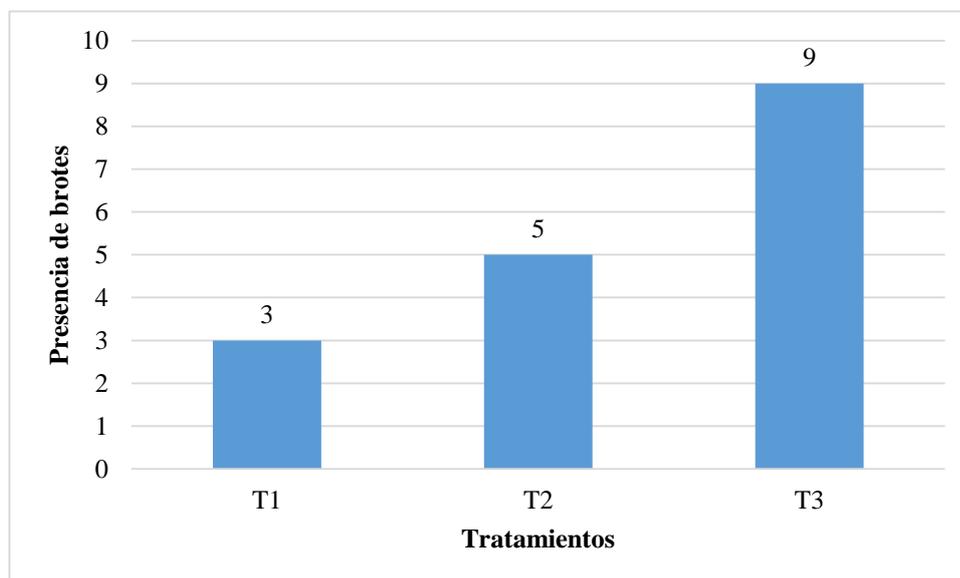


Figura 19. Presencia de brotes respecto a los tratamientos utilizados.

3.2.1.2. Análisis inferencial

Una vez concluido el análisis exploratorio se realiza un análisis inferencial para determinar si los datos son paramétricos o no paramétricos mediante una prueba de ANOVA (Anexo A.2.1). Después de la obtención de los análisis de varianza ANOVA, se obtuvo los residuos de dicho análisis, para realizar la gráfica de distribución (Figura 20).

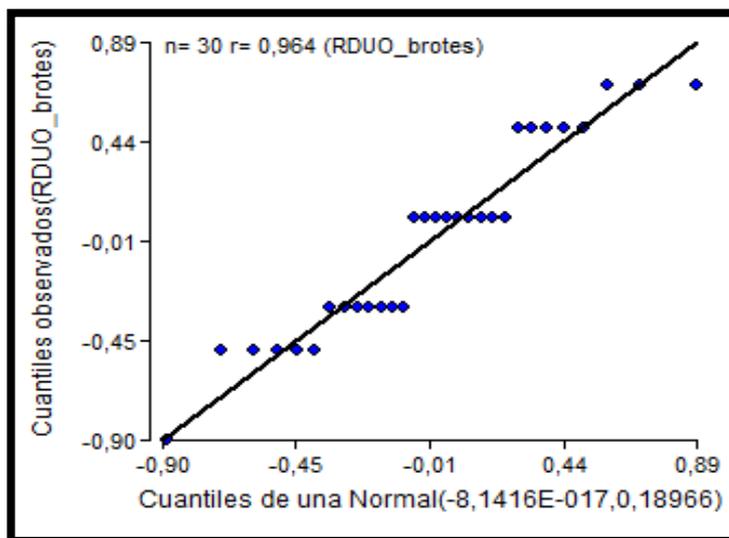


Figura 20. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Presencia o Ausencia de Brotes en explantes de yemas.

Como se aprecia en la figura 20 los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto se establece que estos no son paramétricos y se comprueba realizando una prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (Cuadro 9), donde se observa que el valor de p es menor que 0,05 rechazando que los datos son paramétricos.

Cuadro 9.

Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de Inducción y Multiplicación de Brotes.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO brotes	30	0,00	0,44	0,90	0,0210

Una vez establecido que los datos son no paramétricos se los evalúa con la prueba estadística de Kruskal Wallis (Cuadro 10).

Cuadro 10.

Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable presencia o ausencia de brotes.

Variable	Trtamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Brotes	T1	10	0,30	0,48	0,00	5,42	0,0254
Brotes	T2	10	0,50	0,53	0,50		
Brotes	T3	10	0,90	0,32	1,00		

Trat.	Ranks
T1	11,50 A
T2	14,50 A B
T3	20,50 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

El cuadro 10 muestra que el tratamiento T3 (6-BAP 4mg/L) posee una media de 0,90 en porcentaje de presencia y ausencia de brotes y una desviación estándar de 0,32; por lo cual, el tratamiento T3 es el mejor tratamiento para inducción de brotes con respecto a los otros dos tratamientos.

También se puede evidenciar que el tratamiento 3 es óptimo mediante el análisis de rangos (Cuadro 10), en la que existe subconjunto (B) y permite demostrar que el mejor tratamiento es el 3 con un valor de rango de 20,50. Adicionalmente se observa la presencia de un grupo (A) y otro subconjunto (AB) indicando que no existe una diferencia significativa entre estos dos tratamientos y que son los menos aptos para la inducción de brotes.

3.2.2. Número de brotes

En esta fase se evaluó la cantidad de brotes que se obtuvo por cada uno de los tratamientos que se probaron en esta fase, estos métodos variaron con la presencia de diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP).

3.2.2.1. Análisis exploratorio de los datos

En este análisis se observó que el tratamiento T3 (4mg/L de BAP) fue el tratamiento con la mayor cantidad de brotes una vez concluido los 45 días de análisis (Tabla 15).

Tabla 15.
Número de brotes de hortensia (*Hydrangea macrophylla*) por tratamiento, a los 15, 30 y 45 días de cultivo.

Tratamiento	Brotes a los 15 días	Brotes a los 30 días	Brotes a los 45 días
-------------	----------------------	----------------------	----------------------

T1	0	4	7
T2	0	5	8
T3	0	10	15

La figura 21, muestra que el número de brotes aumenta a medida que transcurre el tiempo. Se evidencia que a los 15 días no existió presencia de brotes y durante los primeros 30 días de cultivo todos los tratamientos presentaron brotes pero a partir de los 45 días aumentó considerablemente el número de brotes (15) en el tratamiento 3.

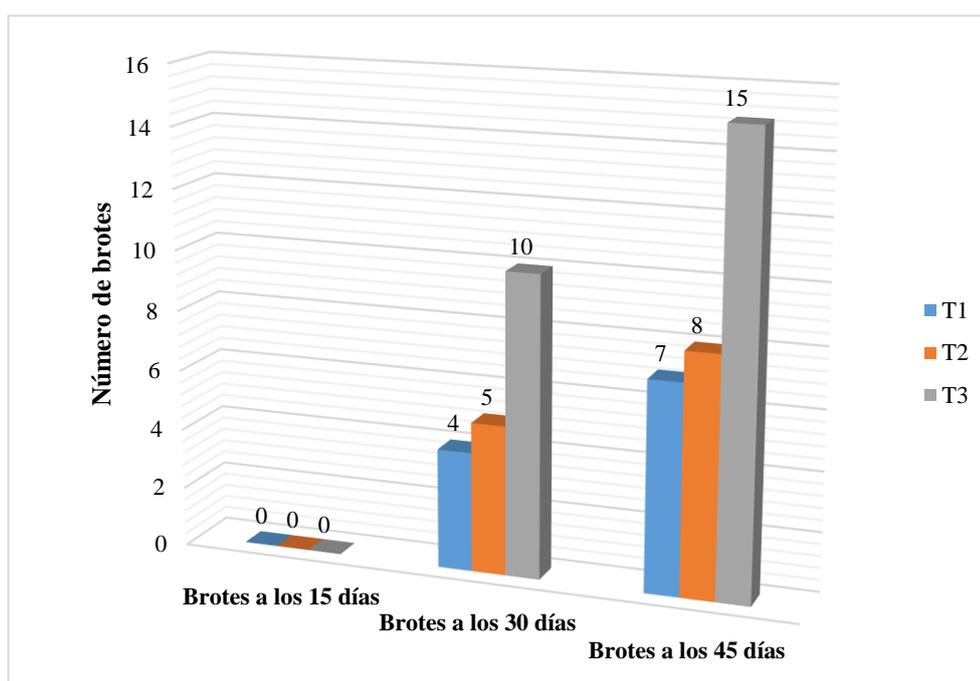


Figura 21. Número de brotes de Hortensia (*Hydrangea macrophylla*) en cada tratamiento a los 15, 30 y 45 días de cultivo.

3.2.2.2. Análisis inferencial

El análisis inferencial determinó si los datos poseen una tendencia paramétrica o no paramétrica realizando una prueba de ANOVA (Anexo A.2.2), se obtuvo los residuos de dicho análisis para cada variable (15, 30, 45 días de cultivo). En el caso de los 15 días de cultivo no se realiza ningún tipo de análisis; ya que los resultados obtenidos fueron nulos. A los 30 días de cultivo se realizó el análisis de varianza y se obtuvo la gráfica de Q-Q plot (Figura 22)

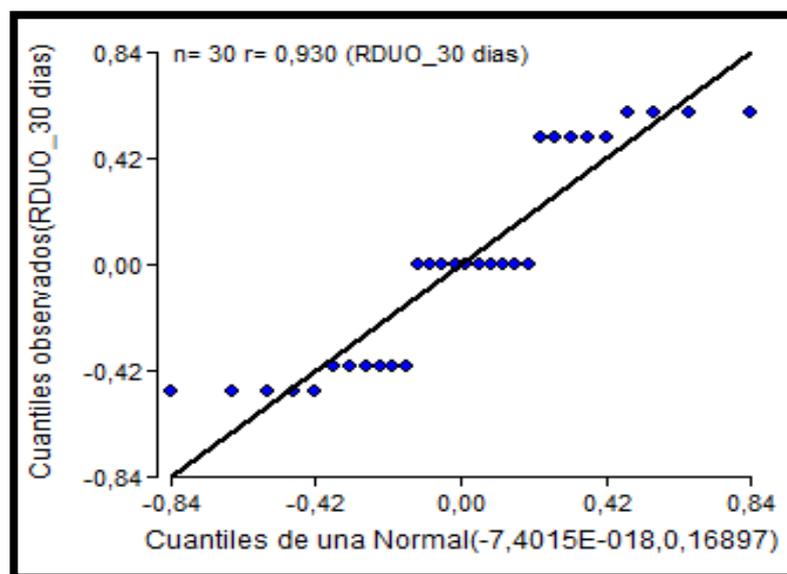


Figura 22. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Número de Brotes a los 60 días de cultivo.

La figura 22, indica que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto se establece que estos no son paramétricos y se comprueba realizando una prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (Cuadro 11), donde se observa que el valor de p es menor que 0,05 rechazando que los datos son paramétricos.

**Cuadro 11.
Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de Inducción y Multiplicación de Brotes.**

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO 30 dias	30	0,00	0,41	0,80	<0,0001

Establecido que los datos son no paramétricos se los evalúa con la prueba estadística de Krustal Wallis. El cuadro 12, indica que el tratamiento T3 (6-BAP 4mg/L) posee una media de 1 en porcentaje de número de brotes y una desviación estándar de 0; por lo que el tratamiento T3 es el mejor tratamiento para inducción de brotes con respecto a los otros dos tratamientos.

Cuadro 12.

Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable presencia o ausencia de brotes a los 30 días.

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
30 días	T1	10	0,40	0,52	0,00	6,00	0,0135
30 días	T2	10	0,50	0,53	0,50		
30 días	T3	10	1,00	0,00	1,00		

Trat.	Ranks	
T1	12,00	A
T2	13,50	A B
T3	21,00	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

También se evidencia que el tratamiento 3 es óptimo mediante el análisis de rangos (Cuadro 12), donde existe un subconjunto (B) y permite demostrar que el mejor tratamiento es el 3 con un valor de rango de 21. Adicionalmente se puede ver la presencia de un grupo (A) y otro subconjunto (AB) indicando que no existe una diferencia significativa entre estos dos tratamientos y que son los menos aptos para la inducción de brotes.

Para la variable de los 45 días de cultivo de igual forma se realizó el análisis de varianza. Una vez realizado el análisis de varianza para los 30 días de cultivo, se obtuvo la gráfica de Q-Q plot (Figura 23).

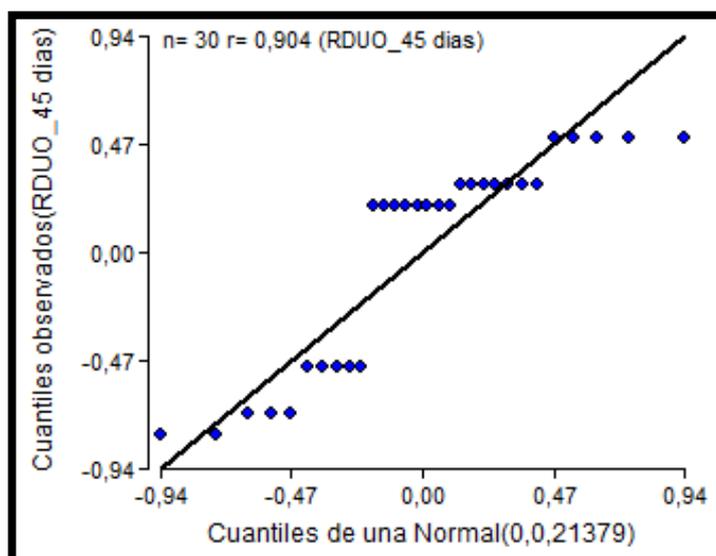


Figura 23. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Número de Brotes a los 60 días de cultivo.

La figura 23, se ve que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto se establece que estos no son paramétricos y se comprobó realizando una prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (Cuadro 13), donde se observó que el valor de p es menor que 0,05 rechazando que los datos son paramétricos.

Cuadro 13.
Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos
obtenidos del análisis de varianza a partir de los
datos de Inducción y Multiplicación de Brotes.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO 45 días	30	0,00	0,46	0,77	<0,0001

Una vez establecido que los datos son no paramétricos se los evalúa con la prueba estadística de Krustal Wallis (Cuadro 14).

Cuadro 14.
Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con
los datos de la variable presencia o ausencia de brotes a
los 45 días.

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
45 días	T1	10	0,70	0,48	1,00	7,66	0,0040
45 días	T2	10	0,80	0,42	1,00		
45 días	T3	10	1,50	0,53	1,50		

Trat.	Ranks
T1	11,75 A
T2	13,00 A
T3	21,75 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

En el cuadro 14, podemos apreciar que el tratamiento T3 (BAP 4mg/L) posee una media de 1,5 en porcentaje de número de brotes y una desviación estándar de 0,53; por lo que el tratamiento T3 es el mejor tratamiento para inducción de brotes con respecto a los otros dos tratamientos.

También se confirma que el tratamiento 3 es óptimo mediante el análisis de rangos (Cuadro 14), donde existe un subconjunto (B), que demuestra que el mejor tratamiento es el 3 con un valor de rango de 21,75. Adicionalmente se puede ver la presencia de dos subconjuntos (A) que indican que no existe una diferencia

significativa entre estos dos tratamientos y que son los menos aptos para la inducción de brotes.

3.3. Fase III: Inducción de callos a partir de secciones de hoja

Durante la fase de inducción a callo de explantes de hoja de hortensia, se evaluó la presencia o ausencia de callo y oxidación de los explantes introducidos. Estos fueron sembrados en medio MS suplementado con 6-BAP (0,5 mg/L y 1 mg/L) con dos concentraciones de 2,4-D (0,5 mg/L y 1 mg/L).

3.3.1. Presencia o ausencia de callo:

Los cambios morfológicos se registraron en los primeros 15 días en explantes de hoja con mayor concentración de 2,4-D y a los 30 días de siembra se observó la formación de callo (Figura 24).



Figura 24. Formación del callo en el explante de hoja a los 30 días de siembra en el tratamiento 2 (0,5 mg/L 6-BAP y 1 mg/L 2,4-D).

3.3.1.1. Análisis exploratorio de los datos

Al cabo de cuatro semanas después de la introducción, se observó el encorvamiento y la presencia de exudado en los explantes de hoja. En este análisis se

observó que el tratamiento T2 (0,5 mg/L de 6-BAP y 1 mg/L 2,4-D) desarrolló tejido callogénico una vez concluido los 30 días de análisis (Tabla 16).

Tabla 16.

Tabla de contingencia para presencia o ausencia de tejido callogénico en los explantes de hoja.

Tratamiento	Presencia de callo
T1	3
T2	19
T3	11
T4	13

En la figura 25, se evidencia que existe formación de tejidos calloso cuando existe una concentración de 1 mg/L de 2,4-D y 0,5 mg/L de 6-BAP (Tratamiento 2); es decir cuando la concentración de auxina es mayor se observa callo en cada uno de los explantes.

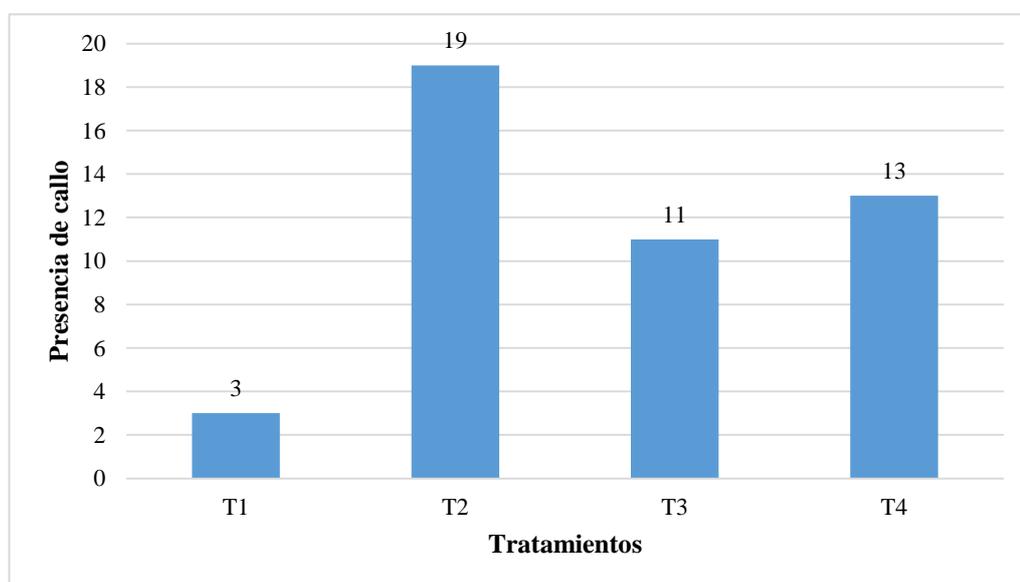


Figura 25. Número de hojas que presentaron tejido calloso en la Hortensia (*Hydrangea macrophylla*).

3.3.1.2. Análisis inferencial

Para determinar si existe una relación estadística significativa de las hojas que presentaron tejido calloso se realizó el análisis inferencial para determinar si los datos

poseen una tendencia paramétrica o no paramétrica realizando una prueba de ANOVA (Anexo A.3) con un nivel de significancia del 5%. Luego de realizar el análisis de varianza para los 30 días de cultivo, se obtuvo la gráfica de Q-Q plot. La figura 26 muestra que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto no son paramétricos y se comprobó realizando una prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (Cuadro 15) donde se observó que el valor de p es menor que 0,05 rechazando que los datos son paramétricos.

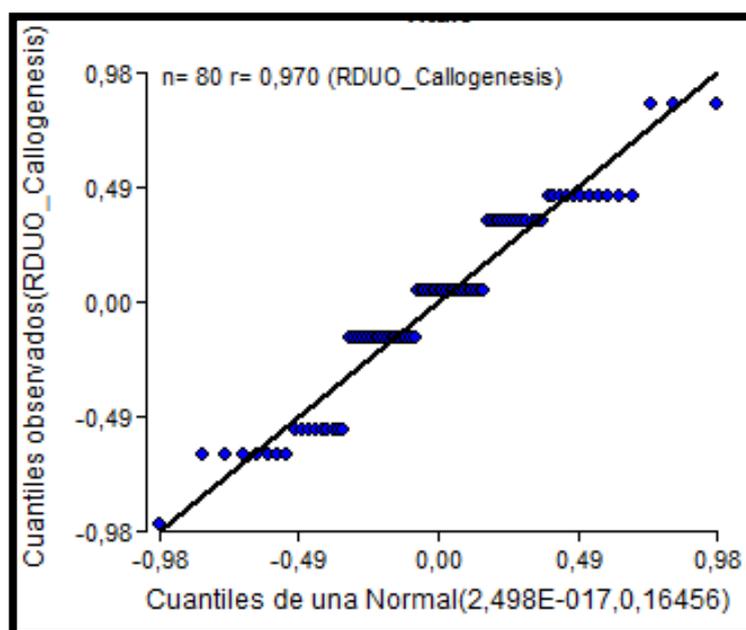


Figura 26. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Presencia o Ausencia de callo.

Cuadro 15.

Prueba de Shapiro-Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos obtenidos de contaminación.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Callogenesis	80	0,00	0,41	0,92	<0,0001

Debido a que los datos son no paramétricos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, la que presentó un valor de $p < 0,0001$; indicando que efectivamente existen diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 16).

Cuadro 16.
Prueba No paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable callogénesis.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Callogenesis	T1	20	0,15	0,37	0,00	19,41	<0,0001
Callogenesis	T2	20	0,95	0,22	1,00		
Callogenesis	T3	20	0,55	0,51	1,00		
Callogenesis	T4	20	0,65	0,49	1,00		

Trat.	Ranks	
T1	23,50	A
T3	39,50	B
T4	43,50	B C
T2	55,50	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

El cuadro 16, indica que el tratamiento T2 (1 mg/L de 2,4-D y 0,5 mg/L de 6-BAP) posee una media de 0,95 y una desviación estándar de 0,22, confirmando que el tratamiento 2 es el mejor para el proceso de inducción a callo de los explantes de hoja con respecto a los otros 3 tratamientos.

También se puede evidenciar mediante el análisis de rangos (Cuadro 16) que el tratamiento 2 con el valor de rango de 55,50 tiene una diferencia significativa entre los demás tratamientos y es el más apto para la inducción de callo en los explantes de hoja de hortensia.

3.3.2. Oxidación

Los explantes de hoja de Hortensia (*Hydrangea macrophylla*) introducidas a diferentes concentraciones de fitohormonas provocan oxidación en la muestra vegetal, por lo que transcurrida las cuatro semanas de siembra, es primordial determinar el mejor tratamiento; los procedimientos empleados corresponde a los descritos en la tabla 6 del capítulo anterior.

3.3.2.1. Análisis exploratorio de datos

Luego de cuatro semanas después de la introducción de hojas de hortensia, se observó la oxidación de los explantes. En este análisis se pudo observar que el tratamiento T2 y T3 presentaron menor cantidad de muestras vegetales oxidadas (Tabla 17).

Tabla 17.
Tabla de contingencia para oxidación de los explantes de hoja.

Tratamiento	# de explantes oxidados	# de explantes no oxidados
T1	4	16
T2	3	17
T3	3	17
T4	5	15

Se observó una mayor cantidad de explantes oxidados en el medio de cultivo que tenía una concentración de 1 mg/L 6-BAP (Tratamiento 4) mientras que los medios suplementados con 2,4-D presentaron la menor cantidad de explantes oxidados, como se muestra en la figura 27.

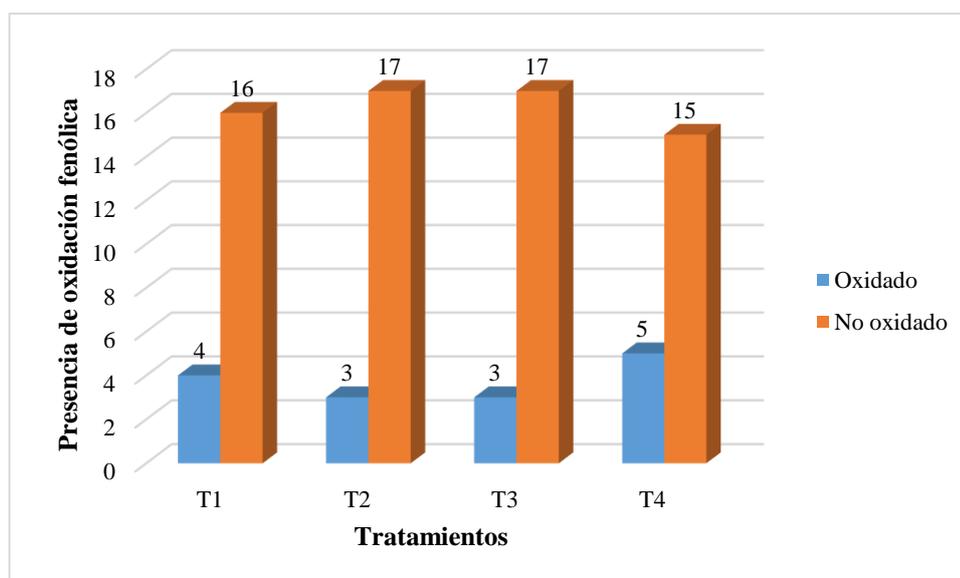


Figura 27. Número de explantes oxidados y no oxidados en los medios de cultivo evaluados para la inducción de callo.

3.3.2.2. Análisis inferencial

Se evaluó mediante una prueba de ANOVA (Anexo A.3) con un nivel de significancia del 5% y utilizando la tabla de contingencia 17, si existía relación entre la concentración de las fitohormonas y los explantes oxidados. Realizado el análisis de varianza, se obtuvo los residuos de dicho estudio, para realizar la gráfica de distribución (Figura 28).

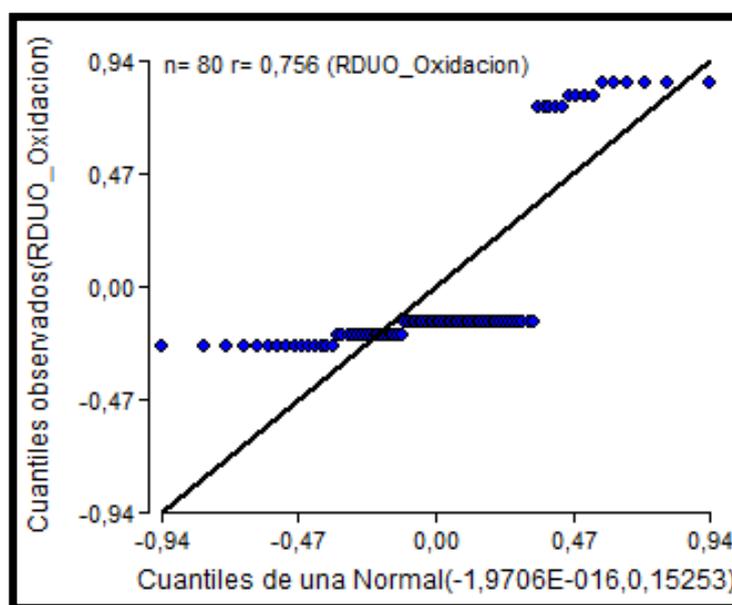


Figura 28. Gráfica de Q-Q plot de los residuos de la Variable Oxidación.

La figura 28, muestra que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto los datos analizados son no paramétricos, se comprobó realizando una prueba de normalidad Shapiro-Wilks modificado (Cuadro 17) donde se observa que el valor de p es menor que 0,05 rechazando que los datos son paramétricos.

Cuadro 17.

Prueba de Shapiro Wilks realizada a los residuos obtenidos del análisis de varianza a partir de los datos de contaminación.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Oxidacion	80	0,00	0,39	0,55	<0,0001

Debido a que los datos son no paramétricos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis que presentó un valor de $p = 0,8275$; lo que indica que efectivamente existen diferencias significativas entre los medios de cultivo evaluados con respecto a la variable de oxidación de explantes de hoja (Cuadro 18).

Cuadro 18.
Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis, realizada con los datos de la variable oxidación.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Oxidacion T1		20	0,20	0,41	0,00	0,41	0,8275
Oxidacion T2		20	0,15	0,37	0,00		
Oxidacion T3		20	0,15	0,37	0,00		
Oxidacion T4		20	0,25	0,44	0,00		

En el cuadro 18, se observa que el tratamiento T2 y T3 poseen una media de 0,15 en porcentaje de explantes oxidados y una desviación estándar de 0,37; por lo cual el tratamiento T4 al tener mayor concentración de 6-BAP, la tasa de oxidación de los explantes aumentó.

Al analizar los resultados obtenidos en la fase de formación de callo, el medio de cultivo con los resultados más óptimos fue el que estuvo suplementado con 0,5 mg/L de 6-BAP y 1 mg/L de 2,4-D, en el que se indujo la formación de callo en el 90% de los explantes introducidos. Referente a la oxidación, este medio también mostró buenos resultados, donde el 80% de los explantes introducidos no presentaron oxidación fenólica.

3.4. Fase IV: Análisis fitoquímico

Para la identificación de los principios activos se realizó pruebas cualitativas y cuantitativas que se describen a continuación:

3.4.1. Pruebas cualitativas

El análisis fitoquímico cualitativo mostró diferentes resultados dependiendo del reactivo utilizado. El ensayo se efectuó por triplicado para tener mayor confiabilidad en cuanto a la información del tipo de componentes que poseen las muestras vegetales de hortensia (*Hydrangea macrophylla*).

Para el extracto de hoja *ex vitro* e *in vitro* se evidenció la presencia de fenoles, carbohidratos, taninos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, terpenos y esteroides. En el caso de callo de hoja tiene una alta concentración de carbohidratos y taninos como se detalla en la Tabla 18.

Tabla 18.

Los resultados del análisis fitoquímico se reportan: (-) negativo (+) poco, (++) regular, (+++) abundante de las tres muestras (hoja *ex vitro*, hoja *in vitro* y callo de hoja).

Prueba	<i>Ex vitro</i>	Callo	<i>In vitro</i>
Control	-	-	-
Fenoles			
Cloruro férrico	+++	-	++
Flavonoides			
Cloruro de aluminio	+	-	++
Shinoda	++	-	+
Carbohidratos			
Molisch	+	+++	++
Fehling	+	+++	++
Taninos			
Acetato de plomo	++	+	+++
Gelatina	++	+	+++
Alcaloides			
Dragendorf	++	-	+
Mayer	++	-	+
Ácido pícrico	++	-	+
Terpenoides			
Salkowski	++	+	++
Esteroides			
Anhídrido acético	++	-	+++

3.4.2. Pruebas cuantitativas

En esta etapa se midió la cantidad de fenoles, carácter antioxidante y azúcares reductores de las diferentes muestras.

3.4.2.1. Determinación de contenido de Fenoles

El contenido de fenoles de cada muestra se cuantificó usando el reactivo de Folin-Ciocalteu, en este ensayo se determinó la concentración de fenoles presentes en cada una de las muestras. Primero se realizó la curva de calibración utilizando como solución estándar ácido gálico y se obtuvo la ecuación 1, esta sirve para determinar la concentración de fenoles totales a partir de regresión lineal de los datos a una absorbancia de 765 nm. La regresión lineal (Figura 29) tuvo $R^2 = 0,99903$

Ecuación 1. $y = -7,7115 * 10^{-08}x^2 + 1,345 * 10^{-03}x - -0,057$

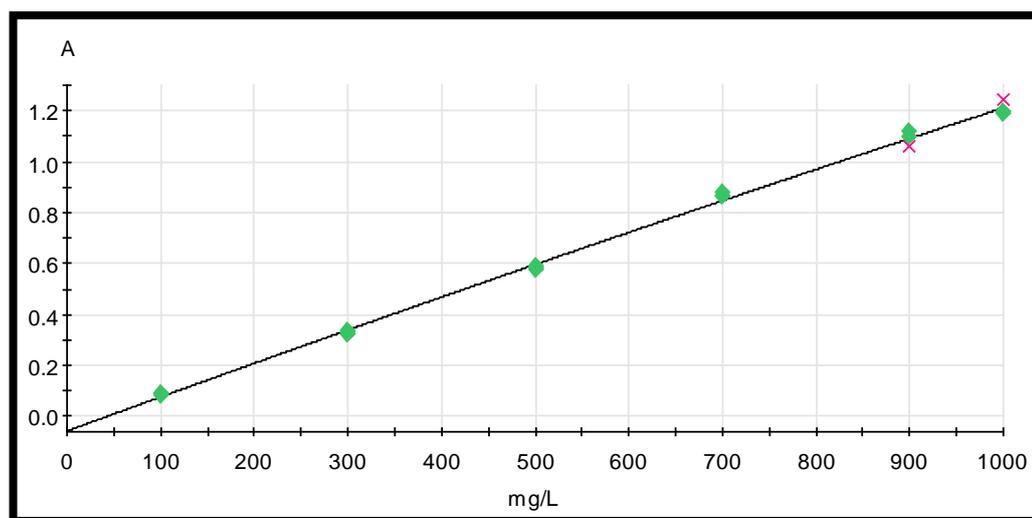


Figura 29. Curva de calibración para la determinación de fenoles. Eje de las x (concentración), eje y (Absorbancias).

Los valores de absorbancia de las muestras de hortensia y las concentraciones de fenoles totales obtenidas durante la cuantificación con el reactivo de Folin-Ciocalteu se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19.
Datos del análisis de la cuantificación de los fenoles presentes en las diferentes muestras de hortensia.

Muestra	Medición (Abs 765 nm)	Concentración hortensia (mg/L)	Promedio concentración (mg/L)	mg fenoles / g de muestra seca	Desviación estándar
Hoja <i>ex vitro</i>	0,401	347	364,333	9,11	22,679
	0,457	390			
	0,412	356			
Hoja <i>in vitro</i>	0,428	369	388,000	9,7	24,021
	0,488	415			
	0,442	380			
Callo 6 meses	0,008	48	49,333	1,23	2,309
	0,007	48			
	0,013	52			
Callo 14 meses	0,005	47	44,667	1,12	2,082
	0,001	43			
	0,002	44			

De acuerdo a los resultados en el análisis de fenoles (Figura 30), el extracto que presenta mayor concentración es el de hoja *in vitro* (9,7 mg fenoles/ g de muestra seca), seguido de la concentración del extracto de hoja *ex vitro* (9,11 mg fenoles/ g de muestra seca), del callo de hoja de 6 meses (1,23 mg fenoles/ g de muestra seca) y finalmente del callo de hoja de 14 meses (1,12 mg fenoles/ g de muestra seca).

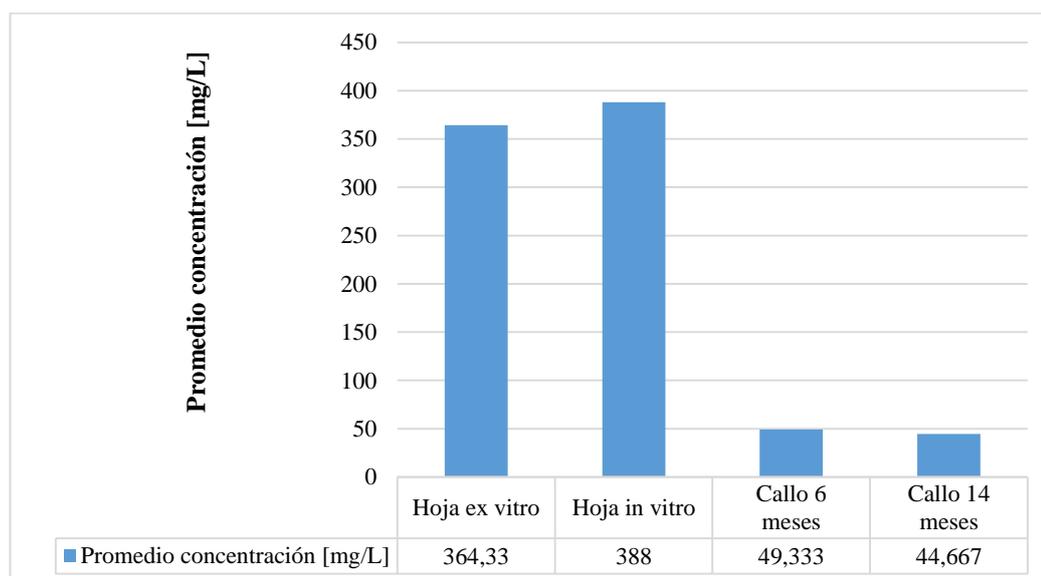


Figura 30. Cuantificación de los fenoles presentes en las diferentes muestras de hortensia.

3.4.2.2. Determinación de contenido de carácter antioxidante

El contenido de carácter antioxidante de cada muestra se cuantificó usando la reacción con el radical libre DPPH. Primero se realizó la curva de calibración (Figura 31) donde se obtuvo la ecuación 2 con un $R^2 = 0,99987$

$$\text{Ecuación 2. } y = 10,75903x - 0,057 * 10^{-02}$$

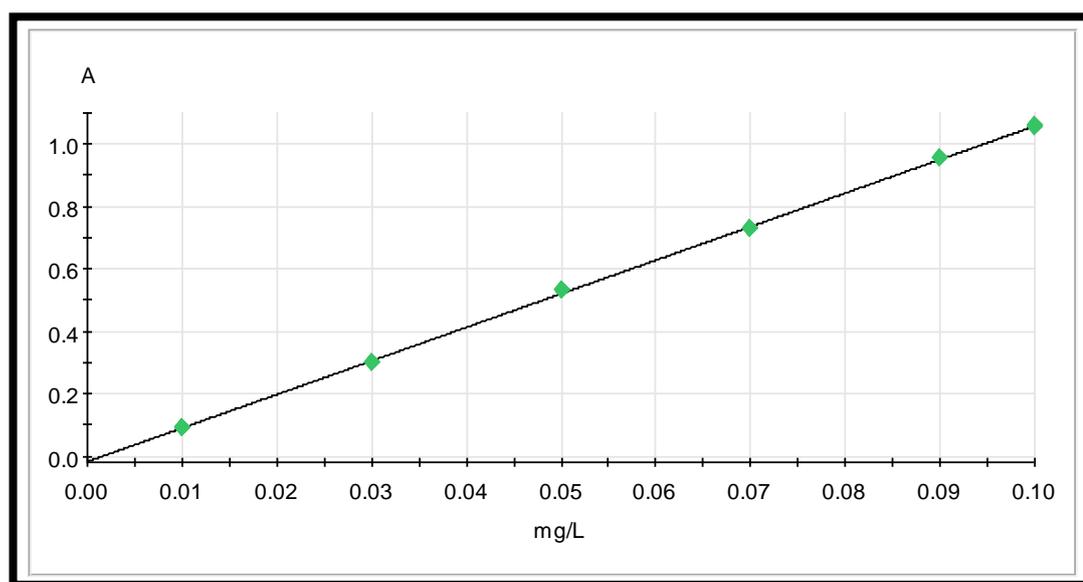


Figura 31. Curva de calibración para la determinación de carácter antioxidante. Eje de las x (concentración), eje y (Absorbancias).

Los valores de absorbancia de las muestras de hortensia y las concentraciones obtenidas durante la cuantificación de radicales libres con el reactivo de DPPH se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20. Datos del análisis de la cuantificación de fenoles presentes en las muestras de hortensia.

Muestra	Absorbancia [A]	Concentración (mg/L)	DPPH (%)	Promedio DPPH	Desviación estándar
Control hoja	2,925	0,273			
Hoja <i>in vitro</i>	2,48	0,232	15,21	15,83	1,92
	2,399	0,225	17,98		
	2,507	0,235	14,29		

Hoja ex vitro	2,387	0,223	18,39	18,56	0,69
	2,348	0,22	19,73		
	2,377	0,223	18,74		
Control callo	0,731	0,07	0,00		
Callo 6 meses	0,44	0,043	39,81	39,99	0,70
	0,433	0,042	40,77		
	0,443	0,043	39,40		
Callo 14 meses	0,863	0,082	18,06	15,96	2,84
	0,856	0,081	17,10		
	0,824	0,078	12,72		

La tabla de resultados, demuestra que el extracto de callo de 6 meses reduce una buena concentración del radical libre DPPH, mientras que el resto de extractos no disminuyen de la misma manera como se indica en la figura 32.

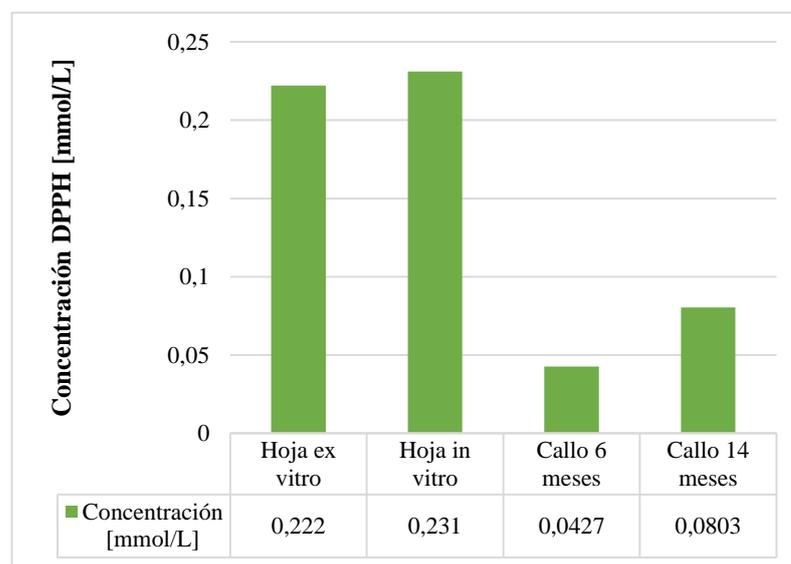


Figura 32. Reducción de la concentración de radical DPPH.

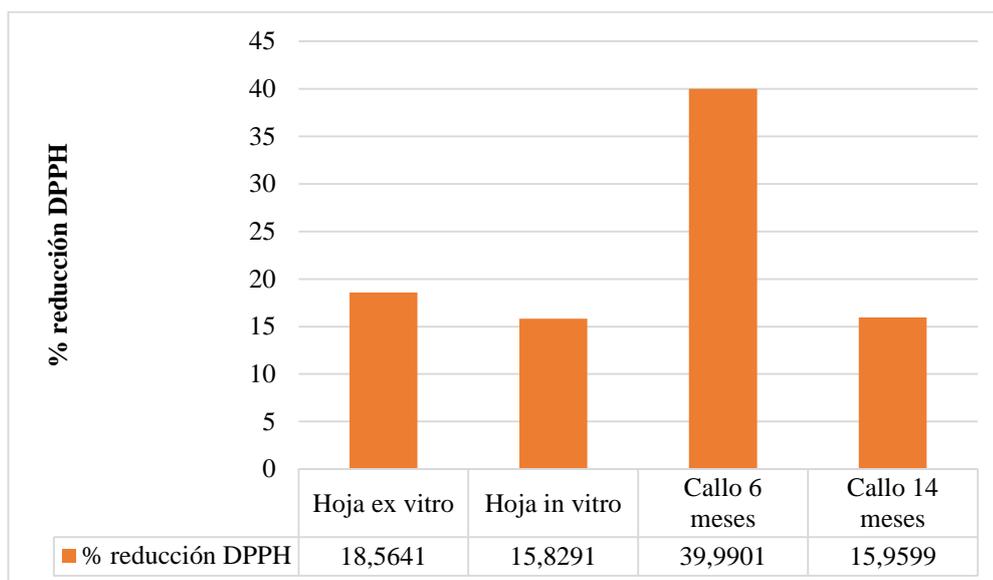


Figura 33. Porcentaje de reducción de la concentración de radical DPPH.

El extracto de callo de 6 meses redujo la concentración de radical DPPH en 39,99% (Figura 33), esto demuestra la alta capacidad de capturar radicales libres. Sin embargo, los hidrolizados de hoja *ex vitro* y hoja *in vitro* si bien presentan una alta cantidad de fenoles tienen la capacidad de capturar radicales libres en un menor porcentaje. Es decir que no existe una relación directa entre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante o la capacidad de captar radicales libres o a su vez pueden existir en los callos otros compuestos que no son fenoles pero que pueden contribuir con la capacidad antioxidante.

3.4.2.3. Determinación de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores de cada muestra se cuantificó usando el método DNS. Primero se realizó la curva de calibración donde se obtuvo la ecuación 3 con un $R^2 = 0,99508$ (Figura 34).

Ecuación 3. $y = 0,5279572x$

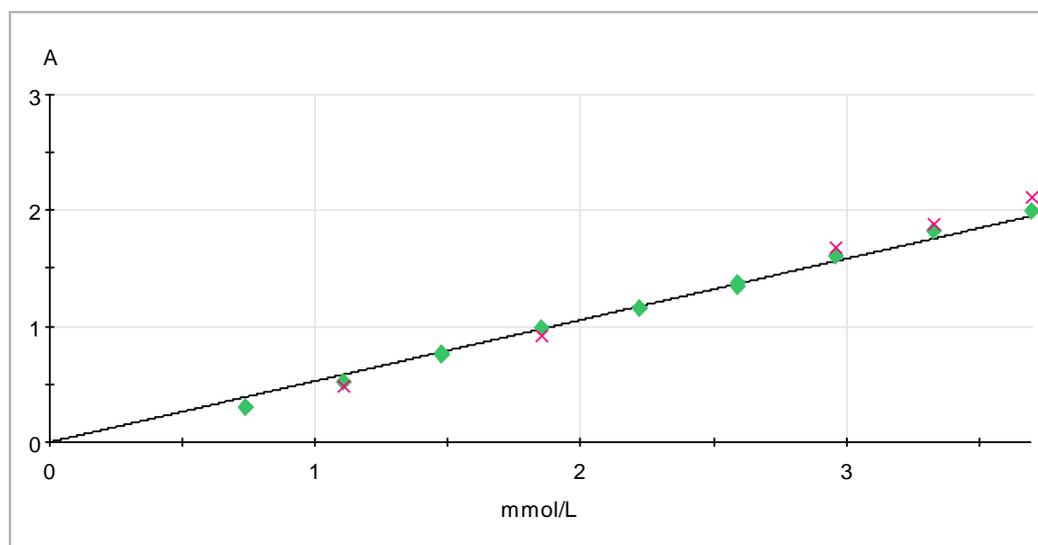


Figura 34. Curva de calibración de la determinación de azúcares reductores. Eje de las x (concentración), eje y (Absorbancias).

Los valores de absorbancia de las muestras de hortensia y las concentraciones obtenidas durante la cuantificación con el reactivo DNS se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21. Datos del análisis de la cuantificación de los azúcares reductores presentes en las diferentes muestras de hortensia.

Muestra	Absorbancia [A]	Concentración de azúcares reductores [mmol/L]	Promedio concentración azúcares reductores [mmol/L]	Desviación estándar
Hoja <i>ex vitro</i>	0,35	0,66	0,68	0,035
	0,349	0,66		
	0,38	0,72		
Hoja <i>in vitro</i>	0,348	0,66	0,70	0,066
	0,411	0,78		
	0,352	0,67		
Callo 6 meses	0,178	0,34	0,34	0,006
	0,184	0,35		
	0,182	0,34		

Callo 14 meses	0,029	0,06	0,08	0,026
	0,035	0,07		
	0,056	0,11		

De acuerdo a los resultados en el análisis de azúcares reductores (Figura 35), el extracto que presenta mayor concentración es el de hoja *in vitro* (0,70 mmol/L), seguido de la concentración del extracto de hoja *ex vitro* (0,68 mmol/L), del callo de hoja de 6 meses (0,34 mmol/L) y finalmente del callo de hoja de 14 meses (0,08 mmol/L).

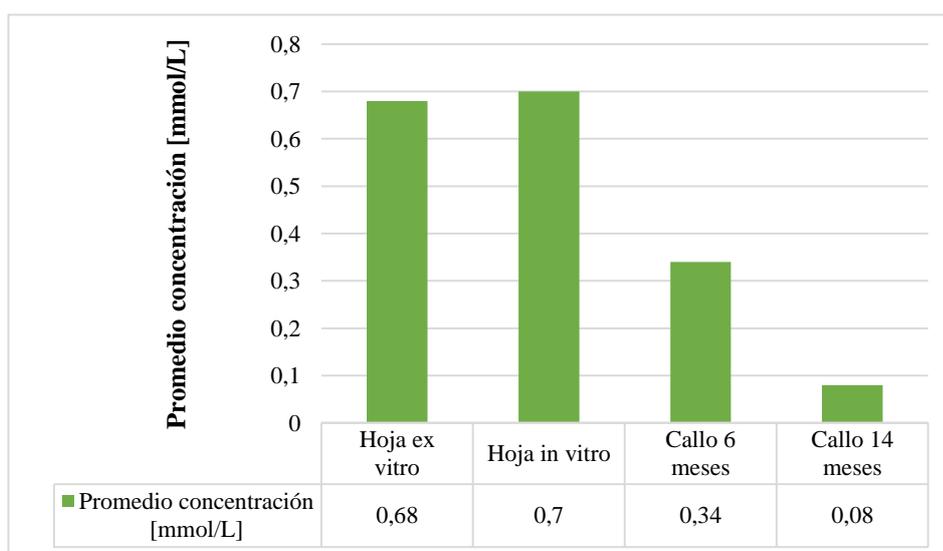


Figura 35. Concentración de los azúcares reductores en las diferentes muestras.

CAPÍTULO 4

4. DISCUSIÓN

Hydrangea macrophylla (Thunb.) Ser. comúnmente conocida como hortensia, es una especie vegetal distinguida por sus características atractivas; ya que posee una cabeza floral enorme con vistosos colores. La propagación de hortensia es por semillas o estacas y cada método ha presentado inconvenientes: las semillas de la planta varían y no permiten la propagación deseada; en cambio la multiplicación por esquejes es lenta y carece de buena ramificación basal (Sebastián & Heuser, 1987). El cultivo *in vitro* de esta especie se considera como una importante opción para lograr una mejor selección, cruzamiento, control de enfermedades y producción en masa de esta especie (Calva, 2005).

Sin embargo, en el Ecuador existen muy pocos estudios realizados en hortensia y relacionados a la biotecnología vegetal, la bibliografía indica que existen investigaciones enfocadas al cultivo *in vitro* de esta especie, debido a sus propiedades ornamentales pero sus características fitoquímicas por medio de métodos biotecnológicos aún no han sido exploradas especialmente en el contexto de comparación entre *in vitro* e *in vivo*.

El tratamiento fitosanitario cumple un rol fundamental para el establecimiento *in vitro* de hortensia ya que en esta fase se selecciona la planta donadora; es decir, aquella especie que no presente daños causados por plagas y diversas enfermedades. La correcta selección de la planta madre es uno de los componentes principales para el éxito del cultivo *in vitro* (Alonso, 2002). Según Dávila (2011), el tratamiento previo a la desinfección disminuye el porcentaje de contaminación al momento de la introducción.

Las plantas madre de hortensia fueron mantenidas en invernadero bajo condiciones controladas. Según Abdelnour (1994) las especies vegetales que se desarrollan en invernadero tienen mejores características que las que se mantienen en campo. Además, las muestras vegetales fueron sometidas a un tratamiento fitosanitario

con la aplicación de Phyton, fungicida/bactericida sistémico cuyo principio activo es el sulfato de cobre pentahidratado, que inhibe el crecimiento micelial.

Cada una de las aplicaciones de los fungicidas y bactericidas se realizó en horarios de 7:00 am y 5:00 pm donde la temperatura ambiental es baja; esto permite tener los estomas de la planta abiertos y un estado activo de intercambio foliar (Hikosaka, 2005). Además, para disminuir la oxidación de compuestos fenólicos se tomó en cuenta la edad del material vegetal, por lo tanto se utilizó explantes jóvenes con el objetivo de reducir la concentración de fenoles excretados por la planta al momento de realizar los cortes y la siembra de los mismos. Villalobos (1980) dice que los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo.

Por esta razón, la selección del explante es el primer paso en el desarrollo de investigaciones en el cultivo *in vitro*. En este trabajo se utilizaron dos tipos de explantes; hojas y yemas; debido a que se han realizado estudios que exponen que estas muestras vegetales tienen mayor concentración de principios activos que en el resto de la planta (Ishih *et al.*, 2003).

Además, el tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de las plantas; a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil será la regeneración, mientras que con el aumento del tamaño del explante, mayor es el peligro de contaminación y más rápido es el crecimiento y la regeneración de la planta (Abdelnour *et al.*, 1994). El tamaño promedio de los explantes obtenidos de las yemas de hortensia fue de 3 a 4 cm y en hojas de 1 cm, estos tamaños fueron los adecuados; ya que permitió el establecimiento del cultivo *in vitro*.

4.1. FASE I: Desinfección de las muestras vegetales

La técnica del cultivo *in vitro* se fundamenta en la obtención de un explante aislado, libre de contaminación, sembrado en un medio de cultivo que aporte con los nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta (Roca & Mroginski, 1993). Es

por esto que la presente investigación busca un método óptimo de desinfección para los explantes previamente seleccionados.

En la fase de desinfección, se modificó un protocolo propuesto por Orozco (2012) para explantes de yema, de igual manera para muestras vegetales de hoja usando el protocolo presentado por Liu (2010). Inicialmente se realizó lavados con agua corriente; ya que Pierik (1990) indica que ayuda a disminuir la contaminación externa. De la misma forma se usó detergente al 1%; porque se considera que un tensoactivo ayuda a eliminar la suciedad de una superficie; además, puede tener acción germicida y antiséptica (Vera, 2004). Después, la utilización de un fungicida cuyo principio activo es el sulfato de cobre fue de gran importancia en la desinfección, debido a que este convierte las moléculas de cobre en absorbibles por el follaje y las transporta de manera sistémica a los tejidos de toda la planta y de esta manera le proporciona una protección efectiva contra hongos y bacterias (Edifarm, 2016). Durante la introducción de los explantes existía contaminación bacteriana para esto se añadió al protocolo alcohol al 70%. Rodríguez (2004) señala que esta concentración es óptima por su actividad bactericida.

Se experimentó con diferentes soluciones de hipoclorito de sodio variando concentraciones y tiempos de inmersión, se escogió usar este compuesto porque; es el más usado, por su efectividad, fácil acceso y uso (Roca & Mroginski, 1993). Las concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) debían causar la muerte de agentes patógenos y a su vez causar el menor daño posible al explante como señala Chawla (2002). En la presente investigación se observó que la concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) es inversamente proporcional a la contaminación; es decir si la concentración de NaClO aumenta el porcentaje de explantes no contaminados aumenta, lo que se verifica con los estudios realizados por Abdelnour & Escalant (1994). La concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) influye directamente en el nivel de contaminación más no en el tiempo de inmersión. Los datos revelan que la concentración de 1,5 % para hojas y 3,5 % para yemas generan un mayor número de explantes no contaminados por lo que estas concentraciones son tomadas como óptimas para la eliminación de agentes patógenos.

En cambio, al analizar la variable oxidación análisis anteriores muestran que a mayor concentración, mayor oxidación existe, porque este compuesto produce estrés fisiológico por ser un componente oxidante para las plantas (Vera, 2004). Los resultados obtenidos no mostraron una diferencia significativa por lo que se elige el mejor tratamiento tomando en cuenta el nivel de contaminación.

El tiempo de inmersión de los explantes fue la última variable que influyó directamente en los resultados, logrando que en un tiempo de cinco minutos a una concentración de 1,5 % para hojas y 3,5% para yemas fuera el tiempo óptimo para el desarrollo del protocolo; ya que se obtuvo como mejores resultados un 10-15 % de contaminación fúngica y bacteriana en los explantes sembrados.

Como se evidenció la presencia de bacterias endógenas en los explantes después de 30 días y según Cassells (1996), este tipo de patógenos se hacen presentes después de un largo tiempo de incubación, se incluyó cloruro de mercurio y antibiótico en el método de desinfección. De esta manera, se mejoró el protocolo de saneamiento; ya que el cloruro de mercurio es capaz de esterilizar muestras vegetales de manera endógena, pero si se usa en altas concentraciones, este puede ser tóxico para la misma (Issa, 2003). En la investigación realizada por Orozco (2012), se utilizó la cefatoxima (1 mg/L) aplicado al medio de cultivo y se obtuvieron resultados favorables para la multiplicación de la Hortensia; en este estudio se realizaron lavados con el medicamento a la misma concentración anteriormente mencionada.

Se tomó medidas preventivas contra la contaminación, una de ellas fue realizar un cambio periódico de medio de cultivo; debido que al realizar este cambio la cantidad de explantes contaminados se reducía notablemente en relación con los explantes que no eran cambiados. Los cambios periódicos de medio a los explantes, ya sea cada 7 o 15 días ayuda a que la bacteria endógena no se exprese (Cassells *et al.*, 1996).

Este protocolo de desinfección es efectivo porque cumple con una contaminación del 12,5% que según Cruzat (2010) debe ser menor al 16,6 %. Además, el lograr un equilibrio entre la contaminación y la oxidación hace que los explantes

sean viables; ya que ayuda a la supervivencia y la capacidad de generación de estructuras (Roca & Mroginski, 1993).

4.2. FASE II: Introducción y multiplicación de brotes a partir de yemas

En esta etapa se buscó obtener el mayor número de brotes por explante y por tratamiento utilizando diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP). Orozco (2012) en su investigación experimenta con varias concentraciones de citoquininas con el fin de estimular la formación de nuevos brotes.

Además, Se evaluó la presencia/ausencia y la cantidad de brotes por explante y por tratamiento; para ello se utilizó diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) en un medio MS (Murashige & Skoog) modificado con Vitaminas de Gamborg. Mediante el análisis estadístico se demostró que las variables estudiadas dependieron de la concentración de citoquinina utilizada; ya que se obtuvo un 95 % de brotación a una concentración de 4 mg/L de 6-BAP a los 45 días de evaluación.

El 6-BAP es una fitohormona que presenta resultados propicios en la organogénesis (Abdelnour *et al.*, 1999) debido a que inducen a que se expresen otras hormonas que se encuentran dentro del explante (Bonga, 1984). Sin embargo, la concentración de 6-BAP va a depender de la especie en estudio, la constitución genética de la planta, la edad de la planta madre y de las condiciones presentadas en el medio (Ramírez & Salazar, 1998).

Al tener un balance entre auxinas y citoquininas, la proliferación de los brotes tiene un alto nivel (Orellana, 1998). Por otra parte, al obtener un alto porcentaje de brotes sin la necesidad de usar auxinas en el medio, sugiere que la Hortensia tiene una producción interna de auxinas, lo cual es confirmado por Schmulling (2004), quien indica que las plantas leñosas conservan concentraciones endógenas de hormonas, es por esto que algunas especies necesitan pocas o nulas cantidades de hormonas en el medio de cultivo.

4.3. Fase III: Inducción de callos a partir de secciones de hojas

La importancia de formar células indiferenciadas (callos) radica en que estos resultados pueden ser aprovechados para la producción de metabolitos secundarios, realizar estudios fisiológicos y bioquímicos. En este trabajo se evidenció que la aplicación de auxinas en el medio (2,4-D) en una concentración de 1 mg/L genera mayor cantidad de callo respecto a los otros tratamientos estudiados. El 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) ha sido utilizado como herbicida para controlar la maleza; además, se usa como auxina para inducir a callo y una alta concentración de este componente puede inhibir el crecimiento del mismo (Zhang *et al.*, 2001).

La primera variable que se evaluó en este trabajo es la ausencia o presencia de células indiferenciadas, donde se pudo evidenciar que para la variedad de hortensia utilizada, la concentración tanto de 2,4-D (1 mg/L) como de BAP (0,5 mg/L) dio buenos resultados para la obtención de callo. Existen autores que han usado citoquininas en bajas concentraciones junto con las auxinas, obteniendo buenos resultados en la regeneración de callos (Viñas & Jimenez, 2011). El balance entre auxinas y citocinas es un factor importante no solo en la inducción a callo sino también para la proliferación de brotes en la organogénesis (Samson *et al.*, 2006).

La segunda variable evaluada es la oxidación u oscurecimiento de los explantes de hoja cultivados *in vitro*, la fenolización es catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) que origina quinonas llamado también como pardeamiento enzimático, las mismas que son muy reactivas, genera daño e incluso la muerte celular (Azofeifa, 2009). La evaluación de oxidación tuvo buenos resultados, donde el 80 % de los explantes introducidos no presentaron oxidación fenólica. Esta variable fue evaluada por observación donde la coloración de este tejido varió, ya que algunos callos presentaban pigmentación, mientras otros tenían tonalidades blancas y cafés. El tipo y grado de pigmentación es influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se revela por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, entre otros pigmentos (Perez *et al.*, 2000).

4.4. Fase IV: Fitoquímica

Desde la antigüedad, las especies del género *Hydrangea* solo han sido utilizadas con fines ornamentales, con el avance de la ciencia y la tecnología se han analizado, identificado y caracterizado los principios activos de la hortensia, donde se puede considerar que tiene, propiedades farmacológicas como: antimalárico (Ishih *et al.*, 2003), antialérgico (Mastuda *et al.*, 2002), antifúngico (Yang *et al.*, 2002), antidiabético (Zhang *et al.*, 2009), anticoccidial, antihipercolesterolémico y antioxidantes (Kim *et al.*, 2009).

La obtención de productos terapéuticos se ha convertido en una tendencia mundial; ya que los compuestos farmacológicos que poseen las plantas ayudan a solucionar diferentes estados patológicos de salud, por tal motivo es importante conocer su composición fitoquímica entre muestras *in vitro* y *ex vitro* para en un futuro seleccionar los especímenes apropiados para el desarrollo de fármacos.

El aislamiento de sustancias naturales vegetales derivadas de la síntesis de los compuestos, usa un método de extracción líquido-sólido (Ávila, 2001). En esta investigación se utilizó este método, macerando las muestras vegetales de hortensia en metanol. Della (2009) sugiere mantener las muestras en constante agitación y sin exposición directa a la luz para obtener mejores resultados al momento de identificar los metabolitos secundarios, es por esto que se mantuvo las muestras en oscuridad por 24 horas.

El screening fitoquímico se basó, en realizar distintas pruebas de identificación para determinar: alcaloides, terpenos, carbohidratos, fenoles, taninos, flavonoides y esteroides. La marcha fitoquímica es el primer paso al momento de determinar cualitativamente los principales grupos químicos constituyentes de la especie en estudio, se usa solventes apropiados y se aplica reacciones de coloración y precipitación (Swain, 2003). A partir de estos resultados se puede orientar la extracción y fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de interés.

Estudios desarrollados por Ujihara (1995) reporta varios componentes fitoquímicos en la hortensia, entre los que se describen: flavonoides (isocumarina);

además se han encontrado una variedad de compuestos fenólicos que posee la hortensia y las diversas funciones biológicas que indican la posibilidad de tener actividad farmacológica (Taha, 2003). De igual manera estos compuestos se obtuvieron experimentalmente en la presente investigación, cuyos análisis revelaron que en el extracto de hoja *ex vitro* e *in vitro* existía presencia de fenoles, carbohidratos, taninos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, terpenos y esteroides y el callo de hoja presentó una alta concentración de carbohidratos y taninos. Esta investigación es el primer screening fitoquímico comparativo por lo que se considera un estudio pionero en el análisis cualitativo tanto a nivel *in vitro* como *ex vitro*.

La caracterización de los compuestos fenólicos mostró que en los cuatro extractos de hojas de hortensia existía una concentración de fenoles y confirmaron los estudios realizados por Dulac (2009), donde identificó cerca de 50 derivados fenólicos, flavonoides (quercetina y esencialmente kaempferol) y 20 antocianinas. La concentración de fenoles fue dependiente del tipo de muestra; ya que ésta tuvo una variación entre 388 mg/L y 44,667 mg/L, siendo el callo de 14 meses el que menor concentración tuvo; porque en él actúan enzimas oxidasas y la muestra tiene un mayor oscurecimiento.

El extracto de callo de 6 meses redujo la concentración de radical DPPH en 39,99 %, esto demuestra que posee la capacidad de capturar radicales libres, confirmando el estudio en hojas *ex vitro* por Kim *et al.*, (2009) que estudia la actividad antioxidante de la hortensia. Además, en el callo pueden existir compuestos polares que no son fenoles y por eso la actividad antioxidante es mayor. Sin embargo, los hidrolizados de hoja *ex vitro* y hoja *in vitro* si bien presentan una alta cantidad de fenoles no tienen la capacidad de capturar radicales libres en un gran porcentaje. Fratianni *et al.*, (2007) concluye que cuando no existe correlación entre la concentración de fenoles y la actividad antioxidante puede deberse a factores como: interacción con otras moléculas, condiciones del medio en que se encuentren los extractos o que el tratamiento con metanol no es el adecuado para elaborar un extracto con propiedades antioxidantes.

De acuerdo a los resultados en el análisis de azúcares reductores, el extracto que presenta mayor concentración es el de hoja *in vitro* (0,70 mmol/L), seguido de la concentración del extracto de hoja *ex vitro* (0,68 mmol/L), callo de hoja de 6 meses (0,006 mmol/L) y finalmente del callo de hoja de 14 meses (0,08 mmol/L). Según Pagter (2011) existen varios tipos de carbohidratos presentes en la hortensia como: maltosa, glucosa, fructuosa y sucrosa encontrados en los tejidos de la corteza y el xilema de la planta y su concentración varía de acuerdo a la estación del año, lo que corrobora los datos obtenidos en la presente investigación.

La variación del callo en su aspecto general depende del tejido madre, la edad del callo y las condiciones de crecimiento a las que se mantenga (González *et al.*,2000). Al comparar la concentración de fenoles, la actividad antioxidante y los azúcares reductores entre el callo de 6 meses y el de 14 meses; se puede decir que mientras más tiempo se mantiene el callo, menor va a ser sus propiedades fitoquímicas.

En la presente investigación se consiguió analizar los principios activos de la hortensia (*Hydrangea macrophylla*) mediante el uso del cultivo *in vitro* y se comparó con las plantas cultivadas en condiciones *ex vitro*; se evaluó la caracterización fitoquímica, y se comparó las concentraciones fenólicas, antioxidantes y azúcares reductores. Con este ensayo, se pretende comprobar la aplicabilidad de la técnica de cultivo *in vitro* para la cuantificación y producción de metabolitos secundarios; además, esta planta podría ser utilizada en la preparación de bebidas energéticas y como edulcorante especialmente para diabéticos.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

1. El presente estudio generó excelentes resultados al desarrollar la etapa inicial de una nueva herramienta del cultivo *in vitro* de hortensia. Gracias a esto, se realizó la caracterización fitoquímica comparativa, y se evaluó las concentraciones fenólicas, antioxidantes y azúcares reductores.

2. Los mejores tratamientos de desinfección de explantes fueron aquellos a los que se les sometió a una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % v/v para hojas y 3,5 % v/v para yemas con 5 minutos de inmersión. Además, se observó que estos tratamientos presentaron bajo índice de oxidación fenólica.
3. El mejor tratamiento para la generación de brotes en Hortensia fue el tratamiento T3 consistió en la adición de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) a una concentración de 4 mg/L al medio de cultivo.
4. La auxina 2,4-D resultó beneficiosa en la inducción del callo de hoja de Hortensia. El mejor tratamiento para la inducción y obtención de callo fue el Tratamiento T2 (0,5 mg/L BAP y 1 mg/L 2,4-D); ya que a los 30 días generó gran crecimiento de callo que cubría la mayoría de la superficie de la hoja.
5. Por medio de tamizaje fitoquímico se identificó abundante presencia de fenoles, carbohidratos, taninos, alcaloides, terpenoides, alcaloides, flavonoides, terpenos y esteroides en el extracto metanólico.
6. La caracterización cuantitativa (Folin-Ciocalteu) demostró que los extractos de hoja de hortensia contienen compuestos fenólicos en su composición, siendo la muestra de hoja *in vitro* la que mayor concentración de fenoles presentó en mg/L.
7. El extracto de callo de 6 meses redujo la concentración de radical DPPH en 39,99 %, demostrando que posee una buena capacidad de capturar radicales libres.
8. De acuerdo a los resultados en el análisis de azúcares reductores, el extracto que presenta mayor concentración es el de hoja *in vitro* (0,70 mmol/L). Lo que indica que esta planta podría ser utilizada en la preparación de bebidas energéticas y como edulcorante.
9. No existe correlación entre la concentración de fenoles y la capacidad de reducir la concentración del radical libre DPPH; ya que esta actividad también

depende de interacción con otras moléculas de diferente polaridad, así como de condiciones del medio en que se encuentren los extractos.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

1. Es necesario que se continúe con el estudio de los metabolitos secundarios de Hortensia a nivel de callo; ya que tiene moléculas con capacidad de endulzar sin que genere problemas como los azúcares normales. Además, se podría probar el uso de elicitores para evaluar y comparar la concentración de metabolitos secundarios producidos por el callo.

2. Teniendo en cuenta las concentraciones de hormonas tanto para la organogénesis directa como para callogénesis, se debería probar diferentes medios de cultivo para optimizar el protocolo del cultivo *in vitro*.
3. La identificación de la bacteria endógena que afecta a la Hortensia se la podría realizar técnicas moleculares, transformación bacteriana, identificación y aislamiento de sus genes para aprovechar esta bacteria y aumentar las bondades que tiene esta especie.
4. Se debe retirar los explantes del medio de cultivo en un periodo máximo de 21 días para evitar que la bacteria endógena se exprese.
5. Existen varios métodos de extracción para determinar fenoles, actividad antioxidante y azúcares reductores, sin embargo es importante estandarizar un protocolo para Hortensia.
6. Evaluar la actividad antioxidante por otros métodos, por ejemplo LDL, que es una prueba de oxidación que sirve para determinar la función fisiológica de la muestra.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A., & Escalant, J. (1994). Conceptos basicos del cultivo de Tejidos Vegetales. *Orton IICA-CATIE*, 1-15.
- Abdelnour, A., & Gamboa, J. (1999). Micropropagación de melina. *Agronomía Costarricense*, 23: 69-76.
- Acosta, C. (2012). *El micro propagación en especies forestales*.
- Ainsworth, E., & Gillespie, K. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. . *Nature Protocols*, 875-877.
- Albornoz, A. (1980). *Productos Naturales. Sustancias y Drogas Extraídas de plantas*.
- Alonso, M. (2002). *Biotechnology aplicada a mejora de pelargonium*.
- Álvarez, D. (2010). Aplicación del método químico DPPH para determinar la capacidad antioxidante presente en la mermelada de tuna. 14-16.
- Ávila, Z. (2001). *Química orgánica: experimentos con un enfoque ecológico*. Monterrey: Dirección general de publicaciones y fomento editorial.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de Oxidación y oscurecimiento de explantes. *agronomía mesoamericana* , 20: 153-175.
- Basco. (1994). In vitro activities of acridone alkaloids against Plasmodium falciparum. . *Antimicrob Agents Chemother*.

- Bonga, J. (1984). Adventitious shoot formation in cultures in immature female strobili of *Larix decidua*. 416-421.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *ResearchGate*, 839-851.
- Calva, G. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales. *Fuente de alimentos para el futuro. Revista digital universitaria*.
- Cassells, A., & Tahmatsidou. (1996). The influence of local plant growth conditions on non-fastidious bacterial contamination of meristem-tips of *Hydrangea* cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 15-26.
- Chawla, H. (2002). Induction of plant Biotechnology. *Science Publishers*.
- ChemSpider. (2016). *ChemSpider Search and share Chemistry*. Retrieved from <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.129391.html>
- Codarin, S., & Galopin, G. (2006). Effect of air humidity on the growth and morphology of *Hydrangea macrophylla*. *Scientia Horticulturae*, 303-309.
- Daorden, M. (2007). *Cultivo in vitro de tejidos vegetales* . Estación Experimental Agropecuaria INTA San Pedro.
- Dávila, D. (2011). *Evaluación de la actividad hormonal de TDZ, ANA, BAP como inductores de brotes en la etapa de multiplicación a partir de yemas apicales de balsa (Ochroma lagopus)*. Quito.
- Della, A., Batro, A., & Estévez, P. (2009). *Efectos alelopáticos de extractos acuosos de cerraja sobre la germinación y elongación radicular de achicoria y cebolla de verdeo*. Buenos Aires: Ciencias Agrarias.
- Ding, B., & Wang, S. (1997). *Flora of Henan* Science & Technology Press. 99.
- Dulac, A. G. (2009). Genus *hydrangea* : diversity of pigments and phenolic compounds. . *Planta Medica*, (9), 931-931. doi:10.1055/s-0029-1234427

- Durán, C. (1999). Flora de Veracruz. Hydrangeaceae. Veracruz, Instituto de ecología
- Edifarm. (2016, 10 23). *ECUAQUÍMICA*. Retrieved from http://www.ecuaquimica.com.ec/pdf_agricola/PHYTON.pdf
- Esquivel, A., & Escalant, J. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales.
- Eunju, K. (2016). Phyllodulcin as a sugar complement exerts anti-diabetic effects in db/db mouse. *The FASEB journal*. Retrieved from http://www.fasebj.org/content/30/1_Supplement/692.11
- Fратиanni, F., Tucci, M., De Palma, M., Rosa, P., & Nazzaro, F. (2007). Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke. *Food Chemistry*, 1282-1286.
- Gimeno, E. (2004). Compuestos Fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM*, 80-84.
- González, O., Silva, J., Espinosa, A., Ros, C., Acosta, L., Meneses, S., & Hernández, L. (2000). La embriogénesis somática enipomoea: Una posibilidad para la multiplicación y conservación de los recursos vegetales. *Universidad de Granma*.
- Granda, J. (2014). Monosaccharides functionalized receptors in chiral anions recognition . 12790-12795.
- Hartmann, T. y. (1995). Propagación de Plantas.
- Hikosaka, K. (2005). Leaf Canopy as a Dynamic System: Ecophysiology and Optimality in Leaf Turnover. *Annals of Botany* , 95: 521-533.
- Hufford, L. (2001). Ontogeny and morphology of the fertile flowers of Hydrangea and allied genera of tribe Hydrangeeae (Hydrangeaceae) .

- InfoAgro. (2016). *InfoAgro*. Retrieved from http://www.infoagro.com/flores/plantas_ornamentales/hortensia.htm
- INFOJARDIN. (2015, 10 17). *INFOJARDIN*. Retrieved from Hortensia: <http://fichas.infojardin.com/arbustos/hydrangea-macrophylla-hortensia.htm>
- Ishih, A., Miyase, T., & Terada, M. (2003). Comparison of antimalarial activity of the alkaloidal fraction of *Hydrangea macrophylla* var. Otaksa leaves with the hot-water extract in ICR mice infected with *Plasmodium yoelii* 17 XL. *Phytotherapy Research*.
- Issa, Y. (2003). Mercuric chloride: toxicity and apoptosis in a human oligodendroglial cell line MO3.13. *Elsevier*, 981–987.
- Kesumawati, E., Kimata, T., & Uemachi, T. H. (2006). Correlation of phytoplasma concentration in *Hydrangea macrophylla* with green-flowering stability. *FAO*.
- Kim, M., Leem, K., & Kim, H. (2009). *Food Chem. Toxicology*. 47.
- Kiseko, K. (2000). Anti-Malarial Activity of Leaf-Extract of *Hydrangea macrophylla*, a common japanese plant. *Acta MED Okayama*, 227-232.
- Lattanzio, V. (2013). Phenolic Compounds. *ResearchGate*.
- Lerchundi, A. (2006). Principios activos de las plantas medicinales. Retrieved from <http://www.acfah.org/privado/apuntes/3-fito.pdf>
- Lock de Ugaz, O. (1998). *Investigación Fitoquímica*. Perú: Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Lock, O. (1994). *Métodos en el estudio de* (Segun edición ed.). Pontificia Universidad Católica del Perú: Fondo.
- Lunawati, L. (2012). Role of antioxidants in the prevention of cancer. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*.

- Martínez, E. &. (2006). *Prácticas de crecimiento y desarrollo de los materiales*. Barcelona: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Mastuda, H., Morikawa, T., Ueda, K., Managi, H., & Yoshikawa, M. (2002). Bioorg. Med. Chem., 10, 3123. Meshnick SR, Taylor TE, Kamchonwongpaisan S (1996) . *Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy*. *Microbiol.*
- Meshnick, S. (1996). Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. *Microbiological Reviews*, 60(2): 301–315.
- Nagendran, B. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial. *Elsevier*.
- Nava, M. A. (2007). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO*.
- Nordlia, A., & Stromb, M. &. (2011). Temperature and photoperiod control of morphology and flowering time in two greenhouse grown *Hydrangea macrophylla* cultivars . *Scientia Horticulturae*, 127, 372-377.
- Orellana, P. (1998). Introducción a la propagación masiva in vitro de clones selectos de *Castanea sativa* Mill. . *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*, 125-162.
- Orozco, W. (2012). *Establecimiento del protocolo de micropropagación de hortensia (Hydrangea macrophylla) a partir de segmentos nodales, como una estrategia de producción a gran escala, para su utilización ornamental en los espacios públicos del Distrito Metropolitano Quito*. Quito.
- Pagter, M., Lefevre, I., & Arora, R. (2011). Quantitative and qualitative changes in carbohydrates associated with spring deacclimation in contrasting *Hydrangea* species. *ELSEVIER*, 358-367.
- Parr, A. (2000). Phenols in the plant and in man. *Journal of the science of the food and agriculture*, 985-1012.

- Pattewar, S. (2012). *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemical and Pharmacological Profile*.
- Pérez, A. (2013). Bioactive Constituents from *Hydrangea seemanii* and Identification in the Fingerprint of the Infusion Development by UPLC-PDA. *Thieme*, 27-29. Retrieved from <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0033-1348708>
- Pérez, A. (2016). *Certificación Universidad Católica del Ecuador*. Quito.
- Pérez, J. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología.
- Perez, M., Ramirez, R., & Nuñez, H. (2000). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. . *Ciudad de México, México:: Universidad Autónoma de Aguascalientes*.
- Pierik, R. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. *Mundi-Prensa*.
- Ramírez, M., & Salazar, E. (1998). Métodos de desinfección y efecto de citocinas en el cultivo in vitro de segmentos de hojas de *Psidium guajava*. *Revista de la facultad de agronomía*, 5: 162-173.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Rodriguez, M. (2004). Personal de limpieza de centros sanitarios. *Mad S.L.*
- Samson, P., & Campa, C. (2006). Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different coffee species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 37-45.
- Sandoval, J., & Brenes, G. &. (1991). *Micropropagación de platano y banano (Musa AAB, AAA) en el CATIE*. CATIE, Turrielbe, Costa Rica.
- Schmullig, T. (2004). Cytokinin. In E. W. Lennars & M. Lane. Berlin.

- Sebastián, T., & Heuser, W. (1987). In Vitro Propagation of *Hydrangea quercifolia*. *Elsevier Science Publishers* , 303-309.
- Segretín, M. (2011). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)* Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA . Retrieved from <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Europe.pdf>
- SIGMA, A. (2015). Folin-Ciocalteu's phenol reagent. 1-2.
- Simón, E. &. (2006). *Práctica de crecimiento y Desarrollo de los Vegetales*. . Universidad de Barcelona. Departamento de Biología Vegetal.
- Smith, K., & Chenault, J. &. (2010). *Hydrangeas*.
- Smith, R. (2012). *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. (Tercera edición ed.). USA.
- Swain, T. (2003). *Chemical plant taxonomy*. New York: Academic Press.
- Taha, A. (2003). Chemical Constituents from the *Hydrangea chinensis*. *Pharmaceutical Research*, 15-20.
- Ujihara, M., Shinozaki, M., & Kato, M. (1995). Accumulation of phylloidalin in sweet-leaf plants of *Hydrangea serrata* and its neutrality in the defence against a specialist leafmining herbivore. *SpringerLink*.
- Universo. (2012). La malaria en el Ecuador. *Universo*.
- Valentin, J. (2005). Respuesta de dos genotipos de Aguacate a la micropropagación utilizando diferentes combinaciones de auxinas y citocininas.
- Vera, G. (2004). Introducción a la Microbiología. *EUNED*.
- Villalobos, A. (1980). Plantas libres de virus. *Ciencia y Desarrollo. CONACYT*, 33:35-49.

Viñas, M., & Jimenez, V. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de Palmas (Aracaceae). 229-238.

Wang, Z. (2013). Chemical constituents from *Hydrangea macrophylla*. *Springerlink*.

Yang, Q., & Gong, Z. (2002). *Protein Express*. 24-76.

Zhang, B., Wang, H., & Liu, F. (2001). IN VITRO ASSAY FOR 2,4-D RESISTANCE IN TRANSGENIC COTTON. *SpringerLink*, 37:300±304.

Zhang, H., Matsuda, H., Yamashita, C., Nakamura, S., & Yoshikawa, M. (2009). *Pharmacology*. 255-606.