

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE UN SISTEMA DE
INMERSIÓN TEMPORAL FRENTE AL MÉTODO DE
PROPAGACIÓN CONVENCIONAL EN LA
MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE CILANTRO CIMARRÓN
(*ERYNGIUM FOETIDUM*) A PARTIR DE HOJAS, YEMAS
Y SEGMENTOS NODALES**

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

CARLA PATRICIA ALBARRACÍN ACOSTA

SANGOLQUÍ, ABRIL DE 2012

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Carla Patricia Albarracín Acosta

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Tatiana Páez

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Carlos Orozco

SANGOLQUÍ, ABRIL DE 2012

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. CARLA PATRICIA ALBARRACÍN ACOSTA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Sangolquí, 19 de abril de 2012

M.Sc. Mónica Jadán G.
DIRECTORA

Ing. Cristian Peña P.
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Carla Patricia Albarracín Acosta

Declaro que:

El proyecto denominado **“Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación *in vitro* de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales”**, ha sido desarrollado en base a una investigación científica exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía.

Consecuentemente, este trabajo es de mi autoría.

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

Sangolquí, 19 de abril de 2012

Carla Patricia Albarracín Acosta

AUTORIZACIÓN

Yo, Carla Patricia Albarracín Acosta

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército, la publicación en la biblioteca virtual de la institución, del trabajo **“Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación *in vitro* de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales”**, cuyo contenidos y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 19 de abril de 2012

Carla Patricia Albarracín Acosta

DEDICATORIA

A Dios, ese ser supremo que cada día al despertar nos permite tener un nuevo proyecto, un nuevo aprendizaje, una nueva y mejor esperanza de vida. Por todas sus bendiciones, que siempre son infinitas. Y por ser Él mi guía constante en momentos de desmayo y a quien acudo cuando el camino no es tan claro.

A mi angelito, abuelita Blanquita, que desde el cielo ha iluminado siempre mi vida, y quien me enseñó que lo más importante en esta vida es ser humilde, a pesar de tener o conocer mucho.

A mi pequeña pero gran familia: mami Ali y ñaña Majo, por quienes me levanto cada día para ser mejor, y construir para nosotras algo mejor. Las amo.

Yo te haré saber, y te enseñaré el camino en que debes andar; te aconsejaré
con Mis ojos puestos en ti.
Salmos 32:8.

Carla Patricia Albarracín Acosta

AGRADECIMIENTO

Gracias Dios mío por estar a mi lado y darme la fuerza y sabiduría que me permite cada día formar y ejecutar el camino que ya Tú me has delineado. Por permitirme concluir esta etapa de mi vida, ya que sin tu bendición nada se realizaría.

A mi Mami, quien ocupando el lugar de padre y madre me ha dado el empuje y ha sido siempre mi soporte incondicional frente a cualquier problema que se presentare. Por ser un ejemplo de mujer, manteniéndose siempre firme ante sus convicciones, olvidando muchas veces su propia felicidad. Por direccionarme a cómo ser feliz y sanar mis heridas. A ti mi ñañita amada, por ser mi amiga, mi confidente y con quien he aprendido que solo al conocerse uno mismo puede conocer y entender a los demás. Por brindarme tanta seguridad al sostener una conversación amena o una historia triste y dejar las enseñanzas necesarias. Gracias a las dos, porque a pesar de inconvenientes, la vida nos mantiene unidas, y no por la sangre sino por un vínculo más grande que es el AMOR.

A mi familia, a Yoli, y en particular a mi abuelito Manuel quien es la cabeza de esta familia, y quien en compañía de nuestro Angelito ha sabido guiarnos manteniéndonos siempre juntos en tempestades. A ustedes: Tía Pauli, Galo, Tío July, Lucy, Tío Pato y Horten quienes hablándome siempre como a uno de sus hijos, son también principales artífices de que haya llegado hasta aquí, les agradezco infinitamente por acompañarme y apoyarme en todo. Primitos (David, Lucía, Diany, Edú, Alex, Sebitas y Ari), gracias por su alegría y ocurrencias, considero que ahora es nuestro llamado para mantener unida y engrandecer humildemente a esta familia que es nuestro cimiento.

A mi Directora de tesis, M.Sc. Mónica Jadán, por la oportunidad de ejecutar este proyecto en el Laboratorio que dirige y ser más que una profesora de la cátedra, una maestra en la enseñanza de la vida. A mi Codirector, Ing. Cristian Peña, por recordarme que siempre se puede conocer más dejando a un lado la

mediocridad. A la Ing. Patricia Moreira e Ing. Marco Taipe por ser un apoyo desinteresado en el desarrollo de esta tesis.

A mis amigos incondicionales: Tania, Elsita, Daniel y Santi, quienes estuvieron a mi lado en gran parte de mi vida universitaria; por compartir tantas cosas, que serían innumerables. Gracias por permitirme contar con ustedes.

Gracias a Maritza, Karlita y Liz, por compartir juntas cada una de aquellas aventuras, alegrías, tristezas y adversidades que hicieron y hacen de esta vida una risotada.

A la Sra. Mary y a Miguel, quien realizó su pasantía colaborando con la ejecución del proyecto aprendiendo un poco más del Cultivo de Tejidos Vegetales.

A todos mis amigos del laboratorio, quienes durante mucho tiempo fueron mi segunda familia ya que comprenden perfectamente el trabajo que allí se realiza. Por estar a mi lado, en momentos donde el estrés de la tesis se vuelve parte de lo cotidiano e intenta ganarnos; pero sobre todo gracias por brindarme una sonrisa, o un consejo en aquellos momentos.

A ti Criss, muchísimas gracias por ser mi apoyo en momentos donde sentía ahogarme, por mostrarme tu comprensión y llenarte de paciencia aconsejándome cuando parecía decaer; por hablarme fuerte cuando creías que ello pasaba, y por regalarme cada día una sonrisa con tanto amor. Gracias.

Finalmente, a todos quienes de una u otra forma colaboraron con la consecución de este proyecto que ahora me enorgullece tanto. Todo ha sido gracias a ustedes. Dios les pague.

Carla Patricia Albarracín Acosta

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Parte introductoria

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO.....	i
LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iv
AUTORIZACIÓN.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	ix
LISTADO DE TABLAS	xiii
LISTADO DE FIGURAS.....	xviii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xxiii
RESUMEN	xxiv
ABSTRACT	xxv
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo principal	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Marco Teórico.....	4
1.4.1 Características generales de la especie.....	4
1.4.1.1 Taxonomía	4
1.4.1.2 Descripción botánica.....	6
1.4.1.3 Distribución geográfica y origen de la especie	7
1.4.1.4 Uso y propiedades	8
1.4.1.5 Importancia de la especie.....	10
1.4.1.6 Estudios de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Eryngium foetidum</i>	11
1.4.2 Cultivo <i>in vitro</i>	12
1.4.2.1 Generalidades	12

1.4.2.2	Etapas de la micropropagación clonal <i>in vitro</i>	14
1.4.2.3	Factores que influyen en Cultivo <i>in vitro</i>	19
1.4.3	Nuevas estrategias de propagación masiva <i>in vitro</i>	28
1.4.3.1	Sistema de Inmersión Temporal.....	28
1.4.3.2	Ventajas del Sistema de Inmersión Temporal	37
1.4.3.3	Principales problemas en el Sistema de Inmersión Temporal	38
1.4.3.4	Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i> mediante SIT	40
1.5	Hipótesis	43
CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS		44
2.1	Localización del ensayo	44
2.2	Selección, colecta y transporte del material vegetal	44
2.3	Fase de establecimiento	46
2.3.1	Medio de cultivo para la desinfección	46
2.3.2	Desinfección del material vegetal	48
2.3.2.1	Desinfección de hojas	48
2.3.2.2	Desinfección de segmentos nodales y yemas.....	50
2.4	Inducción de brotes.....	54
2.4.1	Medios de cultivo para la inducción de brotes	55
2.5	Fase de multiplicación	59
2.5.1	Multiplicación convencional	59
2.5.1.1	Medio de cultivo para la multiplicación convencional	59
2.5.2	Multiplicación masiva en el SIT	64
2.5.2.1	Prueba de parámetros de control en el SIT: frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo.....	64
2.5.2.2	Prueba de medios de cultivo para multiplicación en el SIT.....	68
2.6	Análisis Estadístico	70
CAPITULO 3: RESULTADOS.....		72
3.1	Eta de Desinfección	72
3.1.1	Contaminación.....	72
3.1.1.1	Hojas	72
3.1.1.2	Segmentos nodales.....	75
3.1.1.3	Yemas	77

3.1.2 Oxidación.....	79
3.1.2.1 Hojas	80
3.1.2.2 Segmentos nodales.....	82
3.1.2.3 Yemas	84
3.1.3 Viabilidad	87
3.1.3.1 Hojas	87
3.1.3.2 Segmentos nodales.....	89
3.1.3.3 Yemas	91
3.2 Etapa de Inducción	95
3.2.1 Inducción a brote	95
3.2.1.1 Segmentos nodales.....	95
3.2.1.2 Yemas	98
3.2.2 Formación de callo	102
3.2.2.1 Segmentos nodales.....	102
3.2.2.2 Yemas	106
3.2.3 Número de brotes	110
3.2.3.1 Segmentos nodales.....	110
3.2.3.2 Yemas	112
3.2.4 Longitud de los brotes	114
3.2.4.1 Segmentos nodales.....	115
3.2.4.2 Yemas	117
3.2.5 Ancho de las hojas	119
3.2.5.1 Segmentos nodales.....	119
3.2.5.2 Yemas	122
3.3 Etapa de multiplicación	124
3.3.1 Multiplicación convencional	124
3.3.1.1 Presencia o ausencia de brotes	125
3.3.1.2 Longitud de brotes.....	126
3.3.1.3 Ancho de hojas.....	127
3.3.1.5 Índice de multiplicación	127
3.3.2 Multiplicación en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT).....	129
3.3.2.1 Prueba de parámetros de control en el SIT: Frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo.....	129

3.3.2.2 Prueba de medios de cultivo para multiplicación en el SIT.....	142
3.3.2.3 Análisis de costos de producción	153
CAPITULO 4: DISCUSION	154
4.1 Fase de desinfección.....	154
4.1.1 Contaminación.....	154
4.1.2 Oxidación.....	155
4.1.3 Viabilidad	157
4.2 Fase de inducción.....	160
4.2.1 Inducción a brote	160
4.2.2 Formación de callo	162
4.2.3 Número de brotes	164
4.2.4 Longitud de brotes	165
4.2.5 Ancho de las hojas	166
4.3 Fase de multiplicación	167
4.3.1 Multiplicación convencional	167
4.3.1.1 Presencia o ausencia de brotes	168
4.3.1.2 Longitud y ancho de los brotes.....	168
4.3.1.3 Índice de multiplicación	169
4.3.2 Multiplicación en el Sistema de Inmersión Temporal.....	170
4.3.2.1 Presencia o ausencia de plántulas.....	171
4.3.2.2 Número de plántulas	172
4.3.2.3 Longitud de las plántulas.....	173
4.3.2.4 Ancho de las hojas	174
4.3.2.5 Índice de multiplicación	175
4.3.2.6 Análisis de costo propagación convencional versus SIT	179
CAPITULO 5: CONCLUSIONES.....	182
CAPITULO 6: RECOMENDACIONES	189
CAPITULO 7: BIBLIOGRAFIA	193

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Concentraciones de Macro y microelementos empleados para cultivo <i>in vitro</i> (Evans <i>et al.</i> , 2003).	21
Tabla 2.1 Componentes del Medio MS (1962).....	47
Tabla 2.2 Concentración de Vitaminas adicionadas al medio MS para establecimiento de <i>E. foetidum</i>	47
Tabla 2.3 Tratamientos para la desinfección de hojas de <i>Eryngium foetidum</i>	50
Tabla 2.4 Tratamientos para la desinfección de yemas y segmentos nodales.	52
Tabla 2.5 Tratamientos para la inducción de brotes a partir de segmentos nodales y yemas.....	56
Tabla 2.6 Tratamientos para la multiplicación de <i>E. foetidum</i> en el SIT.....	66
Tabla 2.7 Medios de cultivo ensayados para una mayor proliferación de brotes	69
Tabla 3.1 Prueba chi – cuadrado para los tratamientos de desinfección en hojas	73
Tabla 3.2 Tabla de contingencia para contaminación respecto a los tratamientos de desinfección	73
Tabla 3.3 Prueba de chi – cuadrado para los tratamientos de desinfección en segmentos nodales	75
Tabla 3.4 Tabla de contingencia para los tratamientos de desinfección de segmentos nodales	76
Tabla 3.5 Prueba chi – cuadrado para el tiempo de inmersión en segmentos nodales	77
Tabla 3.6 Prueba chi – cuadrado para la desinfección en yemas.....	78
Tabla 3.7 Tabla de contingencia para la desinfección en yemas.....	78
Tabla 3.8 Análisis de varianza para la oxidación respecto a los tratamientos de desinfección de hojas	80
Tabla 3.9 Análisis de varianza para la oxidación de segmentos nodales en función de los tratamientos de desinfección	83
Tabla 3.10 Análisis de varianza para la oxidación de yemas respecto a los tratamientos de desinfección	84

Tabla 3.11 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para la oxidación de yemas respecto al tiempo de inmersión.....	86
Tabla 3.12 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para la viabilidad de hojas respecto al tiempo de inmersión	88
Tabla 3.13 Análisis de varianza para la viabilidad de segmentos nodales respecto a los tratamientos de desinfección.....	89
Tabla 3.14 Análisis de varianza para la viabilidad de yemas respecto a los tratamientos de desinfección.....	91
Tabla 3.15 Prueba chi – cuadrado para la formación de brote a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción	96
Tabla 3.16. Tabla de contingencia de la formación de brotes a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción	96
Tabla 3.17 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de BAP.....	97
Tabla 3.18 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de AIA	98
Tabla 3.19 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de ANA.....	98
Tabla 3.20 Prueba chi – cuadrado para la formación de brote a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción.....	99
Tabla 3.21 Tabla de contingencia de la formación de brotes a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción	99
Tabla 3.22 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de BAP.....	100
Tabla 3.23 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de AIA.....	101
Tabla 3.24 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de ANA	102
Tabla 3.25 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción	103

Tabla 3.26 Tabla de contingencia para la formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción	103
Tabla 3.27 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de BAP	104
Tabla 3.28 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de AIA.....	105
Tabla 3.29 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de ANA.....	105
Tabla 3.30 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción.....	106
Tabla 3.31 Tabla de contingencia para la formación de callo a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción	106
Tabla 3.32 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de yemas respecto a la concentración de BAP	108
Tabla 3.33 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de yemas respecto a la concentración de AIA	108
Tabla 3.34 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de yemas respecto a la concentración de ANA	109
Tabla 3.35 Análisis de varianza para el número de brotes generados a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción.....	110
Tabla 3.36 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para el número de brotes generados a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción	112
Tabla 3.37 Análisis de varianza para el número de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de ANA	114
Tabla 3.38 Análisis de varianza para la longitud de brotes generados a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción.....	115
Tabla 3.39 Análisis de varianza para la longitud de brotes generados a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción	117
Tabla 3.40 Análisis de varianza para el ancho de hojas de brotes generados a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción	120

Tabla 3.41 Análisis de varianza para el ancho de las hojas de brotes generados a partir de yemas respecto a la concentración de BAP, AIA y ANA.....	122
Tabla 3.42 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para la tasa de proliferación en los tres subcultivos de la multiplicación convencional.....	128
Tabla 3.43 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de plántulas generadas respecto a la prueba de parámetros de control en el SIT.....	129
Tabla 3.44 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de plántulas en relación a la frecuencia y tiempo de inmersión ensayados en el SIT.....	130
Tabla 3.45 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de plántulas generadas en relación a la densidad del inóculo por unidad de SIT.....	131
Tabla 3.46 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para el número de plántulas generadas mediante la aplicación de tratamientos en el control del SIT.....	132
Tabla 3.47 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para el número de plántulas generadas respecto al tiempo de inmersión en la prueba de parámetros de control en el SIT.....	134
Tabla 3.48 Análisis de varianza para el número de plántulas respecto a la densidad del inóculo en la prueba de parámetros de control en el SIT.....	134
Tabla 3.49 Análisis de varianza para la longitud de las plántulas respecto a los tratamientos en el SIT.....	135
Tabla 3.50 Tabla de contingencia para longitud de plántulas generadas en la prueba de parámetros de control en el SIT.....	136
Tabla 3.51 Análisis de varianza para el ancho de las hojas respecto a los tratamientos en el SIT.....	137
Tabla 3.52 Tabla de contingencia para el ancho de las hojas de plántulas generadas en la prueba de parámetros de control en el SIT.....	138
Tabla 3.53 Análisis de varianza y LSD Fisher respecto al índice de multiplicación y los tratamientos de la prueba de parámetros de control.....	140

Tabla 3.54 Análisis de varianza para la interacción de los parámetros de control en el SIT sobre el índice de multiplicación	141
Tabla 3.55 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de plántulas aplicando los tratamientos de multiplicación en el SIT	142
Tabla 3.56 Porcentajes de ausencia y presencia de plántulas al ensayar los tratamientos de multiplicación en el SIT	143
Tabla 3.57 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para la relación de los tratamientos de multiplicación en el SIT y el número de plántulas.....	144
Tabla 3.58 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para los tratamientos de multiplicación en el SIT y la longitud de las plántulas generadas	145
Tabla 3.59 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para el ancho de las hojas respecto a los tratamientos de multiplicación en el SIT	147
Tabla 3.60 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para el índice de multiplicación en la aplicación de los tratamientos en el SIT	149
Tabla 3.61 Índices de multiplicación correspondientes a la fase de inducción al analizar las concentraciones de 0 – 1.5 mgL ⁻¹ de BAP	152
Tabla 3.62 Comparación del costo final por plántula obtenida mediante la propagación convencional versus el SIT.....	153

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Planta de cilantro cimarrón, <i>Eryngium foetidum</i> (Ramcharan, 1999).	5
Figura 1.2 Esquema de funcionamiento del RITA® (Alvard, et al., 1993).....	30
Figura 1.3 A) primer evento en el SIT. B) segundo evento en el SIT. C) final del ciclo en el que el líquido regresa a su posición original (Maldonado, et al., 2003)	35
Figura 1.4 Sistema de inmersión temporal adaptado para la multiplicación de plántulas de cilantro cimarrón	36
Figura 2.1 A) Recolección de <i>E. foetidum</i> con muestra del suelo del sitio. B) Plantas seleccionadas.....	45
Figura 2.2 A,B) Siembra de segmentos de hojas de cilantro cimarrón en medio de establecimiento.	49
Figura 2.3 Desinfección de yemas y segmentos nodales. A) Explante seleccionado de invernadero. B, C) Yemas y segmentos nodales previa introducción. D) Inmersión en detergente. E) Inmersión en fungicida. F) Inmersión en Alcohol al 70%. G) Inmersión en Cloro. H) Lavado con agua estéril. I) Corte de las yemas y segmentos nodales.	51
Figura 2.5 A) Contaminación bacteria. B) Contaminación fúngica.....	52
Figura 2.6 A) Contaminación bacteriana. B) Contaminación fúngica.....	53
Figura 2.7 Oxidación y necrosis de hoja.	53
Figura 2.8 A) Yema viable de a los 15 días de la siembra. B) Yema viable a los 30 días de la siembra C) Escala de viabilidad para los explantes.....	54
Figura 2.9 Hoja de cilantro cimarrón sin respuesta, a los 45 días de la siembra.	55
Figura 2.10 A) Brote organogénico a los 15 días de la siembra (2 cm). B) Brote organogénico a los 30 días de la siembra (4 cm)	57
Figura 2.11 A) Yema con presencia de callo. B) Yema sin presencia de callo.....	57
Figura 2.12 A,B) Longitud de brotes medidos en centímetros; a los 15 y 30 días respectivamente.	58

Figura 2.14 A, B) Proliferación de brotes en respuesta a la fase de inducción en el mejor tratamiento	60
Figura 2.15 Plántulas provenientes del subcultivo A por ser trasladadas a un nuevo medio de multiplicación del subcultivo B.....	60
Figura 2.16 Subcultivo de plántulas. A) Corte de las plántulas. B) Plántula de 2 cm de longitud. C) Frascos de subcultivo A.	61
Figura 2.17 Esquema de subcultivos. A) Proliferación de brotes a los 30 días. B) Subcultivo A a los 15 días. C) Subcultivo B a los 15 días. D) Subcultivo C.	61
Figura 2.18 Incubación de los subcultivos. A) Subcultivo A, plántulas a los 10 días. B) Subcultivo B, plántulas a los 2 días de la siembra. C) Subcultivo C, plántulas a los 30 días de la siembra, previa su inoculación al SIT.....	62
Figura 2.19 Esquema de plántula de <i>E. foetidum</i> para la medición de longitud de los brotes previo el subcultivo A) Brotes con presencia de yemas axilares, medición de su longitud. B) Plántula en donde las flechas indican el lugar de corte para el subcultivo. C, D) Plántulas de 2 cm obtenidas tras el corte.	63
Figura 2.20 A) División de los brotes para su multiplicación en cámaras de flujo laminar. B) Brotes obtenidos en el subcultivo B.....	64
Figura 2.21 A) Plántulas en subcultivo C, previa su introducción al SIT. B) Plántulas de 2 cm de largo para ser inoculadas en el SIT.....	65
Figura 2.22 Plántulas obtenidas tras el ciclo de inmersión en el SIT.	67
Figura 2.23 Medición de la altura de las plántulas.	67
Figura 2.24 Medición del ancho de hojas de las plántulas provenientes del SIT.....	68
Figura 3.1 Porcentaje de contaminación para hojas respecto a los tratamientos de desinfección.	74
Figura 3.2 Porcentaje de contaminación para segmentos nodales al aplicar los tratamientos de desinfección.	76
Figura 3.3 Porcentaje de contaminación respecto a tiempo de inmersión en segmentos nodales.....	77
Figura 3.4 Porcentaje de contaminación en los tratamientos de desinfección de yemas.....	79

Figura 3.5 Medias y desviación estándar para la oxidación en los tratamientos de desinfección de hojas	81
Figura 3.6 Porcentajes de oxidación de hojas en diferentes niveles respecto a los tratamientos de desinfección	81
Figura 3.7 Porcentajes de oxidación de segmentos nodales en diferentes niveles respecto a los tratamientos de desinfección	81
Figura 3.8 Medias y desviación estándar para la oxidación en los tratamientos de desinfección de yemas	85
Figura 3.9 Porcentajes de oxidación de yemas en los tratamientos de desinfección	85
Figura 3.10 Porcentajes de viabilidad de hojas por niveles para cada tratamiento de desinfección	87
Figura 3.11 Porcentajes de viabilidad de hojas en diferentes niveles respecto al tiempo de inmersión	89
Figura 3.12 Porcentaje de viabilidad de segmentos nodales para cada tratamiento de desinfección	90
Figura 3.13 Porcentaje de viabilidad de yemas respecto a los tratamientos de desinfección	92
Figura 3.14 Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad de hojas respecto a los tratamientos de desinfección.....	93
Figura 3.16 Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad de yemas respecto a los tratamientos de desinfección.....	94
Figura 3.17 Porcentajes de formación de brotes a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción.....	97
Figura 3.18 Porcentajes de formación de brotes a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción.....	100
Figura 3.19 Porcentajes de formación de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de AIA.....	101
Figura 3.20 Porcentajes de formación de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de ANA.....	102
Figura 3.21 Porcentajes de formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción.....	104
Figura 3.22 Porcentajes de formación de callo a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción.....	107

Figura 3.23 Porcentajes de formación de callo a partir de yemas respecto a la concentración de AIA.....	108
Figura 3.24 Porcentajes de formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de ANA	109
Figura 3.25 Número de brotes a partir de segmentos nodales al aplicar los tratamientos de inducción.....	111
Figura 3.26 Número de brotes a partir de yemas evaluados a los 30 días.	113
Figura 3.27 Porcentaje de longitud de los brotes en niveles generados a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción.....	116
Figura 3.28 Porcentaje de longitud de los brotes en niveles generados a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción	118
Figura 3.29 Porcentaje de ancho de las hojas de los brotes generados a partir de segmentos nodales por niveles respecto a los tratamientos de inducción	121
Figura 3.30 Porcentaje de ancho de hojas de los brotes generados a partir de yemas por niveles respecto a los tratamientos de inducción	123
Figura 3.31 Porcentaje de formación de brotes en el Subcultivo A.....	125
Figura 3.32 Porcentaje de formación de brotes en el Subcultivo B.....	125
Figura 3.33 Porcentaje de formación de brotes en el Subcultivo C	126
Figura 3.34 Promedio de longitud de brotes originados en los tres subcultivos en la multiplicación convencional.	126
Figura 3.35 Promedio de ancho de las hojas de brotes originados en los tres subcultivos en la multiplicación convencional.....	127
Figura 3.36 Tasa de proliferación en los tres subcultivos	127
Figura 3.37 Porcentaje de formación de plántulas en cada tratamiento utilizando la prueba para parámetros de control en el SIT	130
Figura 3.38 Porcentaje de formación de plántulas para los brotes inoculados en relación a la densidad del inóculo por unidad de SIT.....	131
Figura 3.39 Número de plántulas formadas en la prueba de parámetros de control en el SIT	133
Figura 3.40 Porcentaje total por nivel para la longitud de plántulas en el SIT.....	137

Figura 3.41 Porcentaje total por nivel para el ancho de las hojas de plántulas en el SIT	139
Figura 3.42 Coeficientes de multiplicación obtenidos en la prueba de parámetros de control en el SIT transcurridos 22 días de la inoculación.....	140
Figura 3.43 Porcentaje de formación de plántulas en la multiplicación en el SIT.....	143
Figura 3.44 Número de plántulas desarrolladas en la multiplicación en el SIT.....	144
Figura 3.45 Porcentaje de longitud de plántulas en la multiplicación en el SIT.....	146
Figura 3.47 Porcentaje de ancho de hojas de las plántulas en la multiplicación en el SIT	148
Figura 3.48 Porcentaje total por nivel para el ancho de las hojas de las plántulas en la multiplicación en el SIT	148
Figura 3.49 Coeficiente de multiplicación en el Sistema de Inmersión Temporal tras 22 días de la inoculación.....	150
Figura 3.50 Índice de multiplicación y promedios de longitud de las plántulas y ancho de las hojas en el SIT.....	151
Figura 3.51 Contraste entre el índice de multiplicación frente al promedio de longitud de las plántulas y ancho de las hojas en el SIT.....	151
Figura 3.52 Regresión lineal del índice de multiplicación frente a las concentraciones de BAP ensayadas.....	152

LISTADO DE ABREVIATURAS

AIA	ácido indolacético
ANOVA	análisis de varianza
ANA	ácido naftalenacético
BAP	bencilaminopurina
BRA	brasinolida
DCA	diseño completamente al azar
di	densidad de inóculo inicial
IASA	Instituto Agropecuario Superior Andino
id	initial inoculation density
L	litro
LSD	least significant difference (menor significativa)
MS	Murashigue&Skoog
mg	miligramo
NaClO	hipoclorito de sodio
PBZ	paclobutrazol
pH	potencial hidrógeno
PVP	polivinilpirrolidona
SIT	Sistema de inmersión temporal
TIS	Temporary immersion system
v/v	porcentaje de concentración volumen/volumen

RESUMEN

En el presente trabajo se utilizó el cilantro cimarrón como modelo para el desarrollo de futuros proyectos de propagación de plantas de interés vía Sistema de Inmersión Temporal (SIT). Para la micropropagación de *Eryngium foetidum*, se emplearon hojas, segmentos nodales y yemas, que fueron introducidos utilizando diferentes concentraciones de NaClO. Las yemas de cilantro cimarrón que fueron sometidas a una desinfección empleando enjuagues con fungicida comercial, alcohol 70% v/v e hipoclorito de sodio 0.8% v/v durante 10 minutos de inmersión resultaron ser el explante más viable frente a la formación de brotes *in vitro* obteniendo un 90% de descontaminación. Las plántulas se regeneraron vía organogénesis directa cultivando las yemas en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. Se obtuvieron múltiples brotes adventicios, un 100% de formación de brotes y un promedio de 2.7 brotes por explante cultivado al emplear MS suplementado con 1.5mgL^{-1} de bencilaminopurina (BAP) y 0.1mgL^{-1} de ácido naftalenacético (ANA). Se realizaron tres subcultivos de plántulas obtenidas en el medio descrito adicionado con 5mgL^{-1} de BRA. Los subcultivos fueron realizados tanto para la obtención de mayor número de plántulas, cuanto para asegurar la asepsia del cultivo previo el ingreso al SIT. Plántulas provenientes del tercer subcultivo fueron inoculadas en el SIT, y se ensayó diferentes frecuencias, tiempos de inmersión y densidades de inóculo inicial (di). Finalmente, en la multiplicación en el SIT, se obtuvo un mayor número de plántulas por brote, mayor longitud y ancho de las hojas y una mayor tasa de proliferación (7 – 8) comparado con lo obtenido en la multiplicación convencional. Dicho proceso resultó ser más eficiente al emplear como parámetros de control una frecuencia de 4 horas, tiempo de inmersión de 2 minutos y di de 3 explantes por unidad de SIT en un medio de cultivo líquido de Murashige & Skoog suplementado con 2.5mgL^{-1} BAP, 0.1mgL^{-1} ANA y 5mgL^{-1} de BRA.

ABSTRACT

In this investigation, *Eryngium foetidum* (spirit weed) was used as a model plant in order to develop future projects about micropropagation of other productive and economically interesting species through temporary immersion systems (TIS). At the establishment stage of micropropagation of spirit weed, leaves, petioles, and axilar buds were used by applying different concentrations of NaClO. Axilar buds which were washed thoroughly in tap water, surface sterilized using a commercial detergent 1% (p/v), given a rinse in 70% (v/v) ethanol for 30 seconds and disinfected on 0.8% (v/v) of NaClO for 10 minutes and rinsed several times in sterile water resulted to be the most viable explant. The buds were then immersed on 250 mgL⁻¹ PVP dissolution and inoculated on Murashigue&Skoog (MS) medium. *E. foetidum* plants were regenerated through direct organogenesis by using different concentrations of growth regulators. Adventitious multiple shoots, a 100% of buds laid on shoot formation and an average of 2.7 shoots per bud resulted from MS medium supplemented with 1.5mgL⁻¹ BAP and 0.1mgL⁻¹ ANA. At the conventional multiplication stage, three subcultures were done by using MS medium supplemented with 1.5mgL⁻¹ BAP and 0.1mgL⁻¹ ANA and 5 mgL⁻¹ BRA in order to obtain several shoots and aseptic plants. Third subculture plantlets were inoculated on TIS by essaying different frequencies, immersion times and inoculation densities (id). The multiplication on TIS allowed to obtain higher plantlets per shoot, longer and wider leaves, and higher proliferation rates (7 – 8) compared with conventional multiplication. This process resulted to be more efficient by using a four hour frequency, two minutes for the immersion time and a inoculation density of three explants per TIS as control parameters over a Murashigue&Skoog liquid medium supplemented with 2.5mgL⁻¹ BAP, 0.1mgL⁻¹ ANA y 5 mgL⁻¹ de BRA.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

En los últimos años, las producciones y estudios tecnológicos han tomado un carácter prioritario en la economía a nivel mundial, y Ecuador no es la excepción. De allí que en nuestro país se están adoptando políticas que permitan el desarrollo de investigaciones que aporten a la realización de este fin. En Ecuador se invierte recursos materiales y humanos para desarrollar tecnologías de información que humanicen los procesos de investigación biotecnológicos y eleven la producción masiva de recursos. Sobre este aspecto, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, con sus diferentes estrategias de micropropagación, permite la obtención de plántulas élite que puede ir desde producciones a nivel de laboratorio hasta nivel industrial y comercial

Sin embargo, se conoce también que las principales limitantes de los protocolos de micropropagación convencional son bajos coeficientes o tasas de multiplicación, alto costo de la mano de obra y una escasa posibilidad de automatización; factores que repercuten negativamente en el precio unitario de la planta obtenida a través de este proceso. Además que en el proceso convencional de producción masiva de plántulas *in vitro*, se invierte una alta cantidad de agente gelificante conocido comúnmente como agar; un solidificador del medio utilizado para cultivo de tejidos. La producción mundial de agar bordea las 6000 Tm de acuerdo a reportes de la FAO (2000) de las cuales el 80% es destinada a la industrial y el 20% a bacteriología y farmacia. En cultivo de tejidos vegetales el componente principal es el agar constituyéndose en alrededor del 70% del gasto general de la técnica. Las razones expuestas han limitado el empleo masivo de la micropropagación convencional a escala comercial, convirtiéndose en una técnica factible de aplicar sólo en aquellas especies para las cuales el valor unitario de la semilla sea alto o cuando se desee masificar la producción de clones de gran valor genético.

1.2 Justificación del problema

Existe la necesidad de utilizar tecnologías innovadoras que tiendan a automatizar la micropropagación, tales como los sistemas de inmersión temporal (SIT), como también a mejorar los protocolos de producción y aclimatación de las plántulas *in vitro*. Esta tecnología se está desarrollando también en Ecuador, debido a que permite la automatización de todas, o algunas de las etapas de la micropropagación y presenta diversas ventajas como reducción de la mano de obra, costo bajo de producción de las plantas, reducción en el empleo de agar para producción masiva, entre otras.

El desarrollo de la presente investigación permitirá someter a comprobación los antecedentes acerca de la producción de plantas en un SIT reportados por Winkelmann y colaboradores (2006) que indican que en biorreactores, la obtención de plántulas reduce los costos de producción entre un 50 y 60%. Además, estos sistemas superan a los tradicionales de producción de plantas *in vitro* debido a que son más baratos, dada la sustitución de la materia sólida que sirve de alimentación de las plantas por una disolución acuosa mucho más económica. Por otro lado estos sistemas permiten elevar la eficiencia en la producción y controlar los parámetros en función del tipo de cultivo a producir; así como dotar de un conjunto de herramientas que permitan realizar investigaciones sobre las condiciones ideales para determinada variedad de cultivo, lo que justifica la implementación de un sistema automatizado flexible que permita el escalado de la propagación de cilantro (*Eryngium foetidum*) a nivel industrial (Winkelmann, *et al.*, 2006) .

Resulta fundamental que se cuente con este tipo de equipos de propagación masiva en un laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. De allí que por parte de la Ing. Patricia Moreira B., colaboradora en la cátedra de Biotecnología Industrial de la ESPE, se presentó en el año 2010 el proyecto que bajo su autoría fue denominado “Construcción de un biorreactor de inmersión temporal para la propagación *in vitro* de de cilantro cimarrón

(*Eryngium foetidum*)”, el mismo que fue financiado por el Vicerrectorado de Investigaciones y Vinculación con la Colectividad. Así, como parte del proyecto se pudo efectuar el desarrollo de la presente tesis de grado que permite sentar un precedente en el cultivo masivo de plántulas *in vitro*, iniciando con la implementación del SIT en la propagación de una especie tipo *E. foetidum*. Con ello, en el futuro se podrá emplear esta nueva tecnología para la producción de plantas de interés comercial o de conservación a gran escala.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo principal

Evaluar la eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal frente a la propagación convencional en la multiplicación *in vitro* de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales.

1.3.2 Objetivos específicos

- Establecer un método de desinfección para hojas, yemas y segmentos nodales de *Eryngium foetidum* con la finalidad de controlar la contaminación exógena.
- Determinar la concentración de reguladores de crecimiento adecuada en el medio de cultivo para la inducción y multiplicación de brotes de *Eryngium foetidum*.
- Determinar la densidad del inóculo, tiempo y frecuencia de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal para la obtención de mayor vigorosidad, número y altura de los brotes.

- Calcular y comparar el índice de multiplicación en cada subcultivo empleando el Sistema de Inmersión Temporal y la propagación convencional.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Características generales de la especie

1.4.1.1 Taxonomía

El cilantro cimarrón es una planta herbácea de la familia del perejil. Su género *Eryngium* pertenece a la familia Apiaceae del orden de las Apiales (SIIT, 2009). Dentro de éste género existen aproximadamente 200 especies de las cuales 30 se distribuyen en Argentina. Siete especies conocidas del género *Eryngium* son predominantes en América tropical; entre ellas están: *E. chubutense*, *E. coronatum*, *E. echinatum*, *E. ekmanii*, *E. divaricatum*, *E. dorae*, *E. foetidum*, entre otras (Martínez, *et al.*, 2001).

A continuación, se detalla la clasificación taxonómica del cilantro cimarrón:

Reino:	Plantae
Subreino:	Traqueobionta
Superdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Apiales
Familia:	Apiaceae
Género:	<i>Eryngium</i>
Especie:	<i>foetidum</i>

En el año de 1913 Wolf, H. divide al género *Eryngium* en secciones basadas en taxones infragenéricos debido a la gran variación de sus hojas en forma y venación. Allí se encuentra la sección Foetida a la que pertenece la especie *Eryngium foetidum*. A partir de un estudio realizado por Cerceau-Larrival en 1971, se sugiere que la mayoría de especies americanas del género se derivan de las del viejo mundo, y específicamente *Eryngium foetidum* podría constituir, por su morfología y distribución en Asia y América tropical, el nexo entre especies americanas y euroasiáticas (Figura 1.1). En el mismo estudio se señala que existe un pequeño grupo de especies de dicha sección que ameritan “examinación exhaustiva” ya que únicamente se conoce que los miembros de Foetida son diploides ($n=8$ $n=7$), por lo que aproximadamente la mitad de las especies americanas estudiadas son poliploides aunque su citología es aún muy poco conocida (Martínez, *et al.*, 2001).

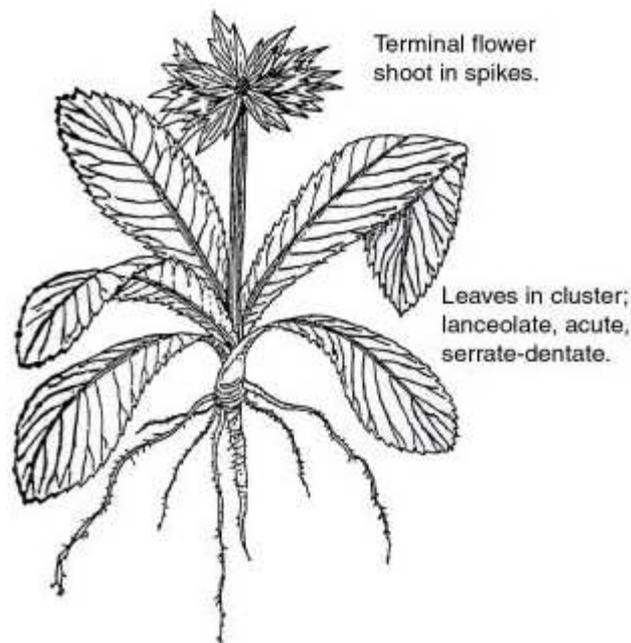


Figura 1.1 Planta de cilantro cimarrón, *Eryngium foetidum* (Ramcharan, 1999).

El género *Eryngium* se deriva del vocablo griego “eruma” que significa protección; ello en referencia a las espinosas hojas que rodean la inflorescencia de éstas plantas (Denton, *et al.*, 2008). Existen diversos nombres asignados a *Eryngium foetidum*, así como cilantro tropical, cilantro coyote, cilantro extranjero, cilantro real, alcapate, escorzonera, samat, xamat, cilantro

cimarrón. En ciertos países como Puerto Rico se lo denomina recaó; shado beni bhandhania (Trinidad y Tobago), chadron benee (Dominica), coulante (Haití), y fit weed en Guyana (Ramcharan, 1999). En el Ecuador, es conocido como culantrillo de monte o simplemente cilantro.

La mayoría de especies del género *Eryngium* son hierbas ornamentales con usos generalmente medicinales. Aunque el cilantro cimarrón está botánicamente relacionado con el cilantro (*Coriandrum sativum*), no debe ser confundido ya que su apariencia y más predominantemente su potente y volátil aceite esencial son muy diferentes (Ramcharan, 1999).

1.4.1.2 Descripción botánica

Las especies de plantas pertenecientes a la familia Apiaceae se caracterizan por ser de distribución cosmopolita. Son generalmente aromáticas y la química de su aceite esencial, que es muy distintiva, refleja su toxicidad y amplio uso medicinal (Downie, Ramanath, Katz-Downie & Llanas, 1998). Se distinguen por poseer inflorescencias y una sola bráctea por flor; la morfología y venación de las hojas es diferente para cada especie y poseen hojas largas y pecioladas, con márgenes espinosos, entrecortados y con venación paralela o palmada (Calviño, *et al.*, 2008).

Respecto a la especie, el cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum* L., Apiaceae) es una hierba indígena bienal, fuertemente aromática que puede alcanzar hasta 60 cm de alto. Su raíz es carnosa, larga y muy ramificada; su tallo es solitario, simple o ramificado, con o sin hojas (Standley & Williams, 1975). Sus hojas son basales, oblanceoladas de hasta 30 cm de largo y cinco cm de ancho, se distribuyen de forma espiral alrededor del tallo desde la base del mismo. Poseen los márgenes dentados y se hacen angostas en la base. La inflorescencia es terminal y ramificada, se compone de cabezas cilíndricas de aproximadamente 1 cm de largo y 5 mm de ancho; es de color verde-amarillo y en su base presentan de cinco a seis brácteas lanceoladas de hasta cuatro cm de largo cuyos márgenes son espinuloso-aserrado. Los frutos y semillas son

globosos de hasta dos mm de diámetro cubierto de vesículas globosas amarillentas; en la madurez, el fruto se separa en dos frutillos (mericarpos) cada uno conteniendo una semilla (Standley, *et al.*, 1975).

El cilantro cumple su ciclo de vida en aproximadamente seis meses, sin embargo, durante todo el año produce abundantes flores, frutos y semillas, por lo que se propaga con facilidad durante el año aunque es susceptible al ataque de nematodos (Fiallo, *et al.*, 1996). Crece de forma óptima en suelos con alto contenido de materia orgánica, luz moderada y requiere de altos contenidos de nitrógeno, lo que favorece al crecimiento de hojas. Su cultivo se inicia a partir de semillas que germinan entre los 25 y 30 días (Ramcharan, 1999). Se ha reportado que el cilantro posee altos contenidos de calcio, hierro, caroteno y riboflavina. Las hojas frescas presentan del 86–88% de humedad, 3.3% de proteína, 0.6% grasa, 6.5% carbohidratos, 1.7% ceniza, 0.06% fósforo y 0.02% hierro. Además son fuente de vitaminas: A (10,460 I.U/100 g), B₂ (60 mg %), B₁ (0.8 mg %), y C (150–200 mg %) (Ramcharan, 1999).

1.4.1.3 Distribución geográfica y origen de la especie

El género *Eryngium* se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo. Estudios sobre evolución señalan que *Eryngium* y los subgéneros *Eryngium*, *Monocotyloidea* son provenientes de ancestros del este del Mediterráneo y que la distribución global actual del mismo se debe a varios eventos de dispersión que incluyen una dispersión trans-Atlántica; lo que ha dado lugar a la diversidad y complejidad taxonómica que se observa actualmente dentro del género (Calviño, *et al.*, 2008). El cilantro es nativo de América tropical y este de la India. Además, crece naturalmente a través de las Islas del Caribe e incluso en Sudamérica se encuentra distribuido en diversos países incluido el Ecuador. Se incluye un área de distribución desde Argentina, Brasil y Paraguay. En estos países el hábitat común de la mayoría de las especies de este género son campos desde semi húmedos a inundados, en zanjas al costado del camino y en suelos pantanosos (Calviño & Martínez, 2007).

Por otro lado, de acuerdo con Martínez y colaboradores (2001), la especie más extendida en Argentina corresponde a *Eryngium coronatum*, mientras que *Eryngium nudicaule* alcanza también el centro de Argentina y se extiende hasta Bolivia y Perú (Martínez, *et al.*, 2001). Sin embargo, es necesario precisar que existen variedades de *Eryngium foetidum* que no se encuentran distribuidos en Ecuador, tales como *Eryngium foetidum* L, *Eryngium foetidum* Walter, y *Eryngium foetidum* fo. *nudum* H. Wolff. De allí que, de acuerdo al Missouri Botanical Garden (2010), la variedad encontrada en nuestro país corresponde a *Eryngium foetidum* fo. *comosum* Urb. Datos que pueden ser corroborados por Flora Brasiliensis, en donde se encuentra tanto información taxonómica acerca de la familia Apiaceae, como ilustraciones para la identificación de una especie en particular. (Missouri Botanical Garden, 2010).

El cilantro crece en zonas boscosas en donde exista alta humedad, en lugares sombríos y cerca de zonas cultivadas en donde predominen suelos arcilloso-arenosos. Aunque para la comercialización de éstas plantas se procura que tengan amplios períodos de sol, *E. foetidum* se desarrolla de mejor manera en áreas sombrías. Allí se producen plantas con hojas más largas y verdes que son más reconocidas y comerciales por su aroma. Además poseen menor número de inflorescencias, reduciendo el peso fresco. Como ya se mencionó, el cilantro crece en suelos arcilloso-arenosos, y preferentemente en suelos arenosos con buen drenaje de humedad, alta carga orgánica y luz moderada (Ramcharan, 1999).

1.4.1.4 Uso y propiedades

El cilantro es rico en ciertos minerales y vitaminas como carotenos, riboflavinas, que son responsables del olor y sabor característico; por ello, ésta especie es ampliamente utilizada para propósitos culinarios (Ramcharan, 1999). Aunque la apariencia de *E. foetidum* y *C. sativum* es muy similar; el aroma del cilantro cimarrón es más intenso. Debido a esta característica, las

hojas de esta especie son usadas en la preparación de un sinnúmero de alimentos y platos tradicionales en países en donde se encuentra distribuido. A pesar de que en la cocina Americana, el cilantro es una hierba nueva, se ha usado ampliamente en lugares como el Caribe y el lejano Este. En países de Asia como Tailandia, Malasia y Singapur se lo emplea como condimento sobre sopas y pastas. En la zona de América Latina, está asociado a la cocina puertorriqueña y en general a recetas típicas de toda esa región. Se lo usa especialmente en salsas donde consta como un acompañante indispensable para salsas picantes preparadas con tomate, ajo, cebolla, jugo de limón y chiles, dichos constituyentes se sofríen y mezclan hasta formar una pasta que es acompañada con tortillas o carnes (Ramcharan, 1999).

Por otro lado, se lo utiliza también en el campo de la medicina tradicional; puede ser empleado para aliviar gripe, constipación, fiebres y diarreas y se conoce que puede ser empleado como estimulante del apetito. De forma general se realiza infusiones de las hojas y raíces para el alivio de dichas enfermedades. Además, se conoce que ésta puede ser empleada para picaduras de escorpión (Ramcharan, 1999). En países como India y especialmente en comunidades de la costa pacífica ecuatoriana se emplea la raíz en decocción, para infecciones estomacales o para combatir la anemia. En la Amazonía peruana, la hoja se usa para dolor de estómago y flatulencia y la infusión de la planta completa se usa para combatir el vómito (Cárdenas, Marín, Suárez, Guerrero & Nofuya, 2002).

Análisis fitoquímicos realizados evidencian la presencia de esteroides y triterpenoides, lactonas terpénicas y sesquiterpenos que confieren propiedades curativas para las enfermedades hepáticas y contra la hepatitis. Aunque no se registra un uso igual en la literatura, la actividad antiinflamatoria de las lactonas terpénicas podría conferirle alguna actividad protectora del hígado (Cárdenas, *et al.*, 2002).

De acuerdo a Ramcharán (1999) en cuanto a la actividad biológica, el cilantro cimarrón es una planta relativamente libre de enfermedades. Además, se conoce que no solo constituye una planta atractiva para insectos benéficos como mariquitas, crisopas verdes entre otros, sino también que proveen excelente defensa para plantas de jardín en contra de pulgones (Ramcharán, 1999). En estudios reportados por Blair (2005) el extracto acuoso de *E. foetidum* resultó inactivo frente a *Plasmodium falciparum*; sin embargo, las plantas entera de *E. foetidum* y *E. yuccifolium* presentaron actividad antimalárica frente a *P. gallinaceum*. Además, que posee efecto cardiovascular, actúa sobre el sistema nervioso central como analgésico y diurético (Blair, 2005).

Finalmente, en un estudio realizado por Cárdenas y colaboradores (2002), a las 48 horas de empleado, los mejores efectos bactericidas *in vitro*, para el control del género *Erwinia* se consiguieron con cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) (Cárdenas, *et al.*, 2002).

1.4.1.5 Importancia de la especie

El cilantro es una especie que ese ha convertido en un cultivo de interés para el mercado internacional principalmente para cumplir con las demandas de grupos étnicos de los países desarrollados del Oeste. Potenciales consumidores de esta planta herbácea constituyen comunidades de Londres, Nueva York y Toronto. De acuerdo a Ramcharan (1999) un solo exportador de Trinidad empaca y envía a los Estados Unidos aproximadamente 2.4 toneladas semanales de cilantro fresco. En el año de 1988, el departamento de Agricultura de Puerto Rico reportó una producción de alrededor de 165.000 Kg de cilantro por un valor de \$ USD 201,000.00 dólares. Debido a que esta hierba es ampliamente requerida con fines culinarios, países como India y Corea en Asia, e Islas del Caribe representan un mercado de interés para exportar el cilantro cimarrón (Ramcharan, 1999).

Además, como ya se describió anteriormente, el uso medicinal del cilantro representa también una característica apetecible por diversos mercados que buscan el uso de la medicina alternativa como una fuente de curación para diversas enfermedades (Ramcharan, 1999). Por otro lado, su aceite esencial que consiste en alrededor de 40 componentes tiene un alto valor comercial en el mercado internacional. El aceite puede ser empleado para realizar rituales de aromaterapia como para el uso cosmético y la industria de la perfumería (Gayatri *et al.*, 2006).

1.4.1.6 Estudios de cultivo *in vitro* de *Eryngium foetidum*

En la propagación de *Eryngium foetidum* se encuentran diversos trabajos desarrollados a nivel mundial, especialmente en Asia. Es así que se encuentra un gran interés por el cultivo *in vitro* de esta especie en India, ya que se prevé su alto valor económico en el mercado internacional. La mayoría de investigaciones al respecto se ven encaminadas a la regeneración *in vitro* de cilantro cimarrón empleando diferentes reguladores de crecimiento, lo que pretende aportar con innovaciones acerca de su propagación mediante esta técnica tal es el caso del proyecto denominado: “Challenges encountered while initiating medicinal plants into tissue culture conditions: case study of cerasee (*Momordica charantia*) and spirit weed (*Eryngium foetidum*)” (Denton, *et al.*, 2008).

Además, el proyecto denominado: “A protocol for *in vitro* regeneration of *Eryngium foetidum* L.” (Gayatri *et al.*, 2006) y además, el trabajo titulado “Direct organogenesis from mature leaf and petiole explants of *Eryngium foetidum* L.” (Arockiasamy, Prakash & Ignacimuthu, 2002) en los que se emplea la técnica de organogénesis directa para la obtención de brotes de la planta de interés evaluando el número de brotes por explante obtenidos a partir de hoja, pecíolo y yemas axilares. Asimismo, ciertas investigaciones publicadas a partir del año 2000 hacen referencia a la utilización de diferentes partes de la planta, como explantes nodales e inflorescencias para la regeneración directa de cilantro

cimarrón: “*In vitro* regeneration, flower and plant formation from petiolar and nodal explants of culantro (*Eryngium foetidum* L.)” (Yassen, 2002).

Por otro lado, la embriogénesis somática es otra técnica para propagación de *E. foetidum* tal es el caso del trabajo: “Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment” (Inacimuthu, Arockiasamy, Antonysamy & Ravichandran, P., 1999) o “Efficacy of different growth regulators at different stages of somatic embryogenesis in *Eryngium foetidum* L. – a rare medicinal plant” (Martin, 2004) donde se evalúan reguladores de crecimiento en las diferentes etapas de la embriogénesis somática.

Cabe recalcar que, en la actualidad, no existen trabajos de investigación acerca de propagación clonal de *E foetidum* mediante SIT; sin embargo, existen diversas publicaciones en las que se emplea esta técnica para la propagación masiva de plantas de interés tales como: banano, caña de azúcar, fresas, entre otras.

1.4.2 Cultivo *in vitro*

1.4.2.1 Generalidades

El Cultivo de Tejidos corresponde a un término que se refiere tanto al cultivo de órganos como al cultivo de células. El concepto recae en realizar cultivos de individuos o grupos celulares, desarrollados en órganos completos, en condiciones asépticas en un medio de cultivo nutritivo apropiado (Harisha, 2007). De acuerdo con Stewart (2008), el término *in vitro* puede ser traducido literalmente a “dentro de un vidrio”, por lo que el Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* no es más que la manipulación de células y tejidos de plantas cultivadas en recipientes de vidrio que servirán para aplicaciones biotecnológicas; lo que es muy útil en el momento de realizar propagación de plantas élite de diversas especies vegetales de interés (Stewart, 2008).

Aunque se cree que la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* es relativamente nueva, ésta se remonta al año 1902 en donde Gottlieb Haberlandt, botánico alemán, propuso que una sola célula de una planta puede ser cultivada en condiciones *in vitro*. En el año de 1955, la kinetina una citoquinina, regulador de crecimiento importante para las plantas, fue descubierta; y en el año de 1962, Murashige y Skoog publicaron la composición de un medio de cultivo, conocido hasta la actualidad como medio MS, para el cultivo de tejidos. Dicho medio es considerado como ideal para la mayoría de plantas a cultivarse mediante las técnicas *in vitro*, ya que contiene todos los nutrientes que una planta requiere para su crecimiento (Stewart, 2008).

El cultivo de tejidos constituye una herramienta de propagación vegetativa en donde la descendencia de una determinada especie vegetal presenta las mismas características que la planta madre, es decir, corresponden a clones de la planta de la cual se originaron (Abdelnour & Escalant, 1994). Así también, el éxito de esta técnica radica en la capacidad de dediferenciar las células del explante elegido y devolverles su capacidad de multiplicarse y especializarse en cualquier tipo de tejido (Cubero, 2003). Es así que esta técnica presenta numerosas ventajas sobre el cultivo tradicional de diversas especies, ya que, tal como lo señala Cubero (2003) las plantas de reproducción asexual responden de mejor manera que las plantas sexuales en estrictas condiciones *in vitro*.

Roca y Mroginski (1991) señalan que los métodos de propagación *in vitro* permiten la obtención de una gran cantidad de plantas a partir de una planta madre en cortos períodos de tiempo, así como la reducción del espacio físico empleado para la propagación, reducción del tiempo de multiplicación de una planta y los costes del desarrollo de esta implica. Además, la producción de un cultivo a través de la micropropagación elimina la posibilidad de interrupciones debido a los cambios de estación ya que se puede controlar las condiciones de humedad y temperatura en un invernadero (Harisha, 2007).

Una de las técnicas más empleadas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es la Micropropagación, la misma que comprende cinco fases definidas como: etapa cero o de selección de material vegetal; etapa uno o de establecimiento, en la que se establece un cultivo primario; etapa dos o de inducción; etapa tres o de multiplicación, en la que se procura obtener mayor cantidad de plántulas clones; etapa cuatro o de enraizamiento, en la que se desea devolver a la planta cultivada en condiciones *in vitro*, sus características autotróficas, para su supervivencia en campo; y finalmente la etapa de transferencia final a campo, en donde se traslada la planta de un ambiente *in vitro* a uno *ex vitro* (Roca, *et al.*, 1991).

1.4.2.2 Etapas de la micropropagación clonal *in vitro*

- ETAPA 0: Selección del material vegetal o planta donadora

Esta etapa corresponde a la selección del material vegetal y es uno de los factores claves para el éxito o fracaso del cultivo de una especie determinada. El cultivo de una planta puede ser iniciado de cualquier parte de ella y su estado fisiológico representa una mayor influencia en su respuesta al inicio del cultivo de tejidos (Harisha, 2007). Por ello, existen ciertas consideraciones que se deben tomar para la selección del explante: la planta madre debe estar saludable, fuera del estado de senescencia y libre de signos de enfermedad por patógenos, teniendo en cuenta que un tejido joven contiene una proporción más alta de células en división por lo que al iniciar en tejido desdiferenciado su tasa de crecimiento será mayor (Harisha, 2007).

Se recomienda mantener las plantas madre en condiciones de invernadero, controlando temperatura, humedad, condiciones sanitarias óptimas, y nutrientes necesarios para su desarrollo adecuado; de preferencia se debe encontrar en estado juvenil ya que el material vegetal obtenido mantendrá las edad y características fisiológicas de la planta madre (Abdelnour, *et al.*, 1994).

- ETAPA 1: Establecimiento del cultivo aséptico

Corresponde a la obtención de un cultivo aséptico del material vegetal seleccionado, para lo que se debe efectuar un proceso de desinfección sobre el explante y así evitar la presencia de microorganismos que pudieran destruir el cultivo en un período corto de tiempo a consecuencia de la competencia por los nutrientes del medio de cultivo (Roca, *et al.*, 1991).

Se encuentran diversos agentes químicos con los que se puede realizar la desinfección de un explante. Entre ellos se puede citar el etanol en concentración al 70% (v/v), hipoclorito de sodio o calcio en concentraciones desde 0.5% hasta 3% (v/v), y el bicloruro de mercurio en concentraciones desde 0.01 a 0.05% (p/v) que es uno de los menos utilizados debido a su alta toxicidad y persistencia en el explante (Roca, *et al.*, 1991). A cada una de las soluciones empleadas en el protocolo de desinfección, se pueden añadir concentraciones (0.1%) de un agente tensoactivo como el Tween 80 o 20 con la finalidad de disminuir la tensión superficial del agua y permitir que el explante sea correctamente desinfectado. El agitar las soluciones en las cuales se encuentra inmerso el explante es también recomendable ya que ello permite que el agente desinfectante se distribuya eficazmente sobre el todo el material vegetal.

Además, se recomienda realizar enjuagues con agua destilada estéril para eliminar residuos del agente químico en los explantes (Roca, *et al.*, 1991) posterior a las inmersiones en las diferentes soluciones desinfectantes.

Finalmente, es necesario recalcar que cada especie de plantas requiere de protocolos de desinfección únicos y apropiados; de igual manera, la esterilización de los órganos o tejidos empleados como explante necesitarán diferentes métodos, concentraciones y tiempos de inmersión en las soluciones de agentes químicos desinfectantes (Roca, *et al.*, 1991).

- ETAPA 2: Inducción de brotes

Seguido a la etapa de establecimiento del cultivo que incluye la fase de desinfección del material vegetal y la preparación del medio de cultivo, se procede a la etapa de inducción de brotes. Se efectúa la introducción del material vegetal en condiciones de asepsia total en cámaras de flujo laminar horizontal para dar protección a la muestra de la especie de interés; con lo que se pretende reducir por completo la posibilidad de contaminación exógena hacia el explante o medio de cultivo.

La composición del medio de cultivo es fundamental, ya que de ella dependerá la respuesta del explante. Además, se debe tomar en cuenta que *in vitro*, las plántulas no son completamente autotróficas por lo que requieren de la adición de azúcares y otros componentes que estimulen su crecimiento. Para cada tipo de planta y de explante con el que se vaya a trabajar, existen muchas formulaciones de medios de cultivo; sin embargo, el más empleado es el medio Murashige y Skoog (1962), principalmente si el objetivo es la regeneración de plantas (Pierik, 1990).

Cabe recalcar, que entre las principales diferencias de medios de cultivo están la utilización de componentes tales como hormonas (reguladores de crecimiento) que se encargan de estimular la diferenciación y proliferación celular. Estos compuestos son de diferentes tipos: citoquininas, auxinas, giberelinas, brasinolidas, entre otros.

Tras realizada la siembra de los explantes en los medios de cultivo, se mantienen los frascos sembrados en una sala de incubación donde serán monitoreados permanentemente para registrar la existencia de contaminación. Si ello no se da los explantes permanecerán en dicha sala hasta que se produzca el crecimiento deseado o el explante requiera de un cambio de medio para la diferenciación del tejido (Roca, *et al.*, 1991).

- ETAPA 3: Multiplicación de brotes

Al conseguir supervivencia del material vegetal a la etapa de desinfección y establecimiento, se espera que los explantes hayan originado brotes con hojas. Este tejido, que ya es *in vitro*, puede ser nuevamente fragmentado y trasladado a un nuevo medio de cultivo en el cual su desarrollo continuará dando lugar a la formación de tejido desdiferenciado, callo o formación de brotes (Cubero, 2003). Con ello, se obtiene subcultivos del material vegetal inicial o planta madre, que corresponderán a plantas clones de dicha especie. Estos nuevos brotes se deben subcultivar periódicamente con la finalidad de obtener una mayor cantidad de plántulas en cada repique o división. El número de plantas que se obtenga dependerá del tipo de especie vegetal, su genética, y de condiciones del medio de cultivo (Castillo, 2004).

Los reguladores de crecimiento juegan un papel muy importante para el desarrollo de nuevas plántulas clon. Es así que, por ejemplo, el requerimiento de citoquininas varía entre más repiques existan ya que algunas plantas tienden a reducir ésta necesidad por la habituación a la hormona. La combinación de los tipos de hormonas resulta crucial para la obtención de órganos específicos necesarios para la multiplicación, como yemas apicales y axilares; de allí que se sugiere emplear concentraciones altas de citoquinina en combinación con bajas concentraciones de auxina, generalmente en proporción 10 a 1. (Pierik, 1990).

- ETAPA 4: Enraizamiento y elongación

Para la fase de enraizamiento, los brotes propagados en la etapa de multiplicación *in vitro* son trasladados a un medio de cultivo que contiene concentraciones menores de sales minerales. Es así que, por ejemplo, el medio de Murashigue y Skoog (1962) es diluido a la mitad de su concentración, obteniendo medio MS al 50%. De igual forma, la concentración de citoquininas se disminuye y las auxinas exógenas se aumentan. Es importante mencionar

que ciertas especies no requieren el empleo de medios de enraizamiento para la formación de sus sistemas radicales ya que la fase de multiplicación y enraizamiento transcurren simultáneamente; por lo que esta etapa depende directamente de la especie vegetal empleada (Roca, *et al.*, 1991). Es importante mencionar que ciertas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa ya que desarrollan raíces en el mismo medio de multiplicación; cualidad que se atribuye a la presencia de auxinas endógenas propias de la planta en investigación (Castillo, 2004).

Factores como concentraciones altas de azúcar y carbón activado (CA) favorecen también a la formación radical; tal es el caso del CA facilita la adsorción de compuestos orgánicos (Pierik, 1990).

1.4.2.2.6 Aclimatación de las plántulas enraizadas

Posterior a la fase de enraizamiento, los explantes son muy sensibles a cambios ambientales; ello debido a que pasan de un ambiente *in vitro* con condiciones de temperatura y humedad controladas, a un ambiente *ex vitro* en el que muchas veces están sujetos a variaciones bruscas en dichas variables. Las plántulas obtenidas *in vitro* tras la fase de enraizamiento poseen estomas poco adaptados a condiciones de invernadero en donde la humedad relativa desciende y se puede dar la desecación del explante. Por otro lado, un porcentaje de humedad relativa demasiado alto implica la falta de desarrollo de una cutícula cética que proteja a la plántula de la pérdida de agua (Castillo, 2004). Es recomendable, adaptar los explantes aclimatados a las condiciones de humedad de invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa y aumentando la intensidad de luz (SABIT, 2006). Por ello, el proceso de aclimatación de los explantes enraizados debe ser igualmente controlado que las etapas anteriores, puesto que en ello radica la supervivencia de las plántulas obtenidas *in vitro*.

1.4.2.3 Factores que influyen en Cultivo *in vitro*

Existen ciertos factores que influyen en el establecimiento y desarrollo de un determinado explante en cultivo *in vitro*. Entre ellos se encuentran: material vegetal, factores químicos y factores físicos.

1.4.2.3.1 Material vegetal

Como se mencionó en el apartado 1.4.2.2.1, la selección del material vegetal es clave para el éxito o fracaso del cultivo *in vitro* de una especie determinada. Es importante obtener explantes con un grado de desarrollo adecuado y altos niveles nutricionales (Peña, 2009). De allí la importancia de mantener el material vegetal en condiciones de invernadero por algunas semanas; así, se puede dar un control de las condiciones sanitarias, nutricionales y de riego de las plantas donadoras, con la finalidad de obtener un crecimiento óptimo libre de patógenos (Castillo, 2004).

Para el caso de utilizar material directamente recolectado desde el campo, se deben seguir precauciones tales como: usar yemas no durmientes o que no hayan empezado a abrirse; ramas que hayan permanecido almacenadas que hayan brotado en agua. Mientras que al utilizar material de invernadero, se debe impedir infecciones de insectos, mantener la humedad relativamente baja para evitar crecimiento de hongos y bacterias (Pierik, 1990).

1.4.2.3.2 Tipo y edad del explante

El tipo y la edad del explante que se va a utilizar para la introducción al sistema *in vitro* influye directamente en el cultivo. Correspondiente al tipo de explante, será más sencillo realizar la desinfección de hojas, pecíolos y entrenudos, por tratarse de tejidos lisos; mientras que al desinfectar yemas axilares y apicales o tejidos con tricomas la contaminación se vuelve más

persistente, por la dificultad del desinfectante para ingresar a éstos lugares. Se debe tener en cuenta el tamaño del explante, ya que mientras más grande existe mayor posibilidad de proliferación de masa callosa; sin embargo, la heterogeneidad y posibilidad de contaminación crece (Roca & Mroginski, 1993).

Si el objetivo del cultivo *in vitro* es la obtención de estructuras callosas, se puede considerar escoger peciolos u hojas como explante, ya que al ser tejidos jóvenes poseen una alta tasa de división celular. Por otro lado, la “micropropagación” implica que las plantas a propagar se desarrollen fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta donadora; para ello, las yemas laterales y meristemas son ampliamente utilizados con este fin (Roca & Mroginski, 1993). De forma general, los fragmentos de plantas en estado vegetativo se regeneran más rápidamente que fragmentos en estado generativo. De allí que, yemas en estado de reposo (final de otoño e inicios de invierno), resultan más difíciles de cultivar que las plantas que no están durmientes (Pierik, 1990).

1.4.2.3.3 Factores Químicos

a) Sales inorgánicas

Las sales inorgánicas constituyen uno de los factores químicos que influyen en el desarrollo de plántulas *in vitro*. Según su concentración empleada en un determinado medio de cultivo, se clasifican en macroelementos y microelementos. Los primeros son elementos esenciales que incluyen: Potasio (K), Azufre (S), Fósforo (P), Nitrógeno (N), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Hierro (Fe), y se utilizan en concentraciones milimolares (mM); mientras que los elementos como: Boro (B), Molibdeno (Mo), Manganeso (Mn), Cobalto (Co), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Cloro (Cl) y Yodo (I) se utilizan en concentraciones micromolares (uM). La tabla a continuación indica los elementos y concentraciones comúnmente empleadas para cultivo *in vitro* de la mayoría de especies vegetales.

Tabla 1.1 Concentraciones de Macro y microelementos empleados para cultivo *in vitro* (Evans *et al.*, 2003).

	Elementos	Concentración
Macroelementos	Nitrógeno	20 – 40 mM
	Azufre	1 – 3 mM
	Fósforo	1 – 3 mM
	Calcio	1 – 3 mM
	Magnesio	1 – 3 mM
	Potasio	20 – 30 mM
Microelementos	Hierro	-
	Boro	-
	Cobalto	0.1 uM
	Cobre	0.1 uM
	Yodo	-
	Manganeso	5 – 30 uM
	Molibdeno	0.1 uM
	Zinc	5 – 30 uM

b) Carbohidratos

El azúcar es un componente esencial del medio de cultivo para el correcto crecimiento y desarrollo de los explantes en sistemas *in vitro* debido a que en este sistema, los tejidos no son autótrofos y la fotosíntesis no siempre puede realizarse, especialmente al mantener cultivos en oscuridad. El contenido de sacarosa en los medios de cultivo, se encuentra generalmente en concentraciones del 1 al 5% y depende estrictamente de la especie y edad del explante a utilizar (Pierik, 1990).

c) Vitaminas, aditivos y aminoácidos

Las vitaminas favorecen el cultivo de tejidos *in vitro* y la ausencia de alguna de ellas puede ser un limitante en el desarrollo organogénico de ciertos

explantes (Alemán, 2000). La tiamina especialmente, es ampliamente empleada para algunas especies en concentraciones de 0.1 a 5 mgL⁻¹. Otras vitaminas como el ácido nicotínico, glicina, biotina y piridoxina son añadidos al medio de cultivo con la finalidad de mejorar la respuesta celular (Smith, 2000). El mioinositol, en concentraciones de 50 a 500 mgL⁻¹ potencializa la activación de la organogénesis (Alemán, 2000). Mientras que a pesar de que el ácido ascórbico y el ácido cítrico se encuentran en el grupo de las vitaminas, son empleadas en medios de cultivo como antioxidantes evitando así el oscurecimiento de los tejidos (Pierik, 1990).

Por otro lado, los aminoácidos son empleados como fuentes de nitrógeno orgánico y son esenciales para la morfogénesis vegetal. Los más empleados son la L-glutamina para la propagación vegetativa, la L-serina para la obtención de embriones haploides, L-tirosina que contribuye a la formación de brotes y la adenina, más soluble como sulfato, que es empleada para la formación de brotes adventicios (Smith, 2000; Pierik, 1990).

d) Reguladores de Crecimiento

Los reguladores de crecimiento conocidos también como hormonas, son compuestos sintetizados de forma natural por las plantas superiores que de forma general actúan en un lugar diferente de donde fueron producidos, y se encuentran en pequeñas cantidades. A partir del descubrimiento e identificación del ácido indolacético en 1930, se han sintetizado diferentes compuestos que han llevado clasificar las fitohormonas en auxinas, giberelinas y citoquininas. Las auxinas promueven el desarrollo radicular y alargamiento de las células; mientras que las citoquininas promueven la formación de brotes y la división celular. Es por ello, que se las emplea en combinaciones hasta encontrar su mejor interacción (Kyte.L, Kleyn.J, 2003). Los reguladores de crecimiento median la comunicación intercelular para lo cual las células utilizan sus receptores y envían la información necesaria para cada proceso de diferenciación. Una vez captada la señal se desencadenan microambientes

distintos para células genéticamente iguales, a través de cambios en la actividad del citoesqueleto, cambios osmóticos y metabólicos (Vidal, 2008). De allí que ciertos estudios sugieren que los sistemas *in vitro* de micropropagación vegetal requieren reguladores de crecimiento que mantengan y permitan el desarrollo óptimo del explante para procesos posteriores de multiplicación y enraizamiento (Applied Research Systems, 2003).

Auxinas

Las auxinas son fitorreguladores distribuidos en la mayoría de las plantas superiores. Son compuestos que poseen como característica principal la presencia de un núcleo indólico sintetizado por la ruta metabólica del ácido shikímico a partir del triptófano (Alemán, 2000); de allí que el compuesto más representativo es el ácido 3-indolacético (AIA) que es la auxina natural más común (Pierik, 1990). Entre las principales funciones fisiológicas que cumplen las auxinas están el provocar elongación en las células, retardo en la abscisión de hojas y frutos, diferenciación vascular, formación de raíces adventicias y laterales, entre otras (Jordán. M, 2006). Las auxinas se sintetizan principalmente en regiones meristemáticas y se desplazan hacia otras zonas de la planta; el transporte se efectúa a través del parénquima que rodea a los haces vasculares (García, 2005). Resulta impreciso establecer una concentración particular de auxina para un determinado tipo de explante; ello dependerá directamente del tipo de tejido que se emplea, entre otros factores. Sin embargo, tanto el AIA como ANA (ácido naftalénacético) son empleados en concentraciones entre 1 a 10 mgL⁻¹; mientras que el 2,4-D (2,4 – diclorofenoxiacético) en concentraciones de 0.1 a 5 mgL⁻¹, ya que en concentraciones elevadas podría resultar tóxico (Roca y Mroginski, 1991).

Citoquininas

Son derivados purínicos similares principalmente a la adenina. Son compuestos capaces de estimular la división celular y ejercen un amplio rango

de efectos sobre los tejidos vegetales (Alemán, 2000). Las más comunes son: bencil adenina (BA), bencil aminopurina (BAP), Kinetina (KIN), Zeatina (ZEA) y son empleadas en concentraciones de 1 a 10 mgL^{-1} especialmente para la formación de vástagos adventicios e inhibición de raíces (Pierik, 1990). Entre las principales funciones atribuidas a la presencia de citoquininas están la diferenciación de tejidos vegetales y diferenciación de tallo. Mientras que en cultivo *in vitro*, las citoquininas promueven la división celular, inducen la formación de yemas adventicias y proliferación de yemas axilares. Se conoce; además, que a nivel celular las citoquininas intervienen en la fase M del ciclo celular, favoreciendo la división (Kurina, 2009). Se sintetizan principalmente en tejidos en división activa como en semillas, frutos, y raíces; además en ciertas regiones meristemáticas (meristemas apicales y cambium) (García, 2004).

Giberelinas

Las giberelinas son sustancias relacionadas directamente con el ácido giberlético (GA_3), poseen principalmente cadenas hidrocarbonadas del gibano y al menos un grupo carboxílico que las hace comportarse como ácidos débiles en medios alcalinos (Pérez y Martínez, 2004). Se las relaciona directamente con procesos de germinación de semillas, y yemas además de que incrementan tanto la división como la elongación celular. En cultivo *in vitro*, se emplea ampliamente el AG_3 que promueve la elongación del tallo incrementando su longitud y manteniendo las hojas y vástagos verdes (García, 2004). Se utiliza en concentraciones de 0.01 a 1 mgL^{-1} con un punto óptimo de 0.1 mgL^{-1} (Roca y Mroginski, 1991).

Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides son reguladores de crecimiento muy potentes ya que incluso en bajas concentraciones expresan un amplio efecto sobre tejidos vegetales en cultivo *in vitro*.

Son compuestos de naturaleza esteroide, cuyo compuesto representativo constituye la brasinolida, aislada de *Brassica napus* (Adams, 1998), aunque en la actualidad se conocen más de 45 compuestos que pertenecen a la familia de los brasinoesteroides con similar actividad biológica (Terry, *et al.*, 2001). Entre sus principales funciones están el promover la elongación celular, incrementar la división celular, proliferación de follaje y germinación de la planta (Castillo, 2004). En presencia de citoquininas y auxinas estimulan el crecimiento de callo, aceleran la actividad fotosintética, e incrementan la biosíntesis de proteínas. Las concentraciones en el medio de cultivo de brasinolida están entre rangos de 0.1 a 0.001 mgL⁻¹ (Rossi, 2005).

e) Antioxidantes

En cultivo de tejidos *in vitro* el uso de antioxidantes constituye una herramienta necesaria para mantener la viabilidad de los explantes. Ello debido a que la herida causada por el corte del explante causa ruptura celular y consecuentemente la secreción de compuestos fenólicos que causan el oscurecimiento del medio de cultivo y en última instancia la muerte del material vegetal (Marks y Simpson, 1990). Para contrarrestar este efecto, se adicionan al medio de cultivo sustancias que actúen como antioxidantes que absorban las sustancias de tipo fenólico. Entre los compuestos empleados en etapas de establecimiento están: la cisteína que remueve cualquier formación de quinonas en el medio de cultivo; ya que induce al desarrollo de los tejidos, supliendo los requerimientos de nitrógeno del tejido. Además, la poliamida PVP (polivinilpirrolidona) en concentraciones adecuadas logra tejidos libres de oxidación; sin embargo, incrementando dicha concentración, puede producir bajas regeneraciones en los explantes (Gómez, 2007).

f) Agente gelificante

El agar es el agente solidificante más empleado para medios de cultivo de tejidos *in vitro*. Es un polisacárido derivado de las algas marinas,

específicamente del género *Gellidium* y *Gracilaria*. Posee características deseables como retención de agua, y adsorción de compuestos además de ser un compuesto estable y resistente a la digestión enzimas propias de las plantas durante su uso (Puchooa, 1990). Se conoce que mientras mayor sea la concentración del polisacárido menor es la disponibilidad de nutrientes que constituyen un determinado medio de cultivo.

El agar constituye el componente más costoso para cultivo de tejidos vegetales, por lo que el costo de la micropropagación comercial por vía convencional implica una alta inversión a gran escala. Sin embargo, éste puede ser reducido al emplear alternativas más baratas que el agar altamente purificado. Dichas alternativas incluyen la metilcelulosa y el alginato o almidones de papa, arroz y gelatinas (Puchooa, 1990).

Por otro lado, la alternativa de cultivos líquidos corresponde una herramienta de gran ayuda en la producción masiva de plantas (Takayama & Akita, 2005) con la finalidad de, por un lado, reducir significativamente la inversión de este componente en el medio de cultivo y de forma alternativa mejorar la difusión de los componentes del medio como sales macro y micronutrientes empleadas para las plántulas; ello debido a que en medios líquidos los nutrientes son más fácilmente absorbidos por el tejido vegetal a causa de su alta disponibilidad en el líquido (Puchooa, 1990).

1.4.2.3.4 Factores Físicos

En el sistema *in vitro*, las condiciones de incubación varían dependiendo del cultivar en investigación. Cada especie y explante requiere de características específicas para su desarrollo; tales como temperatura, humedad relativa, fotoperíodo e intensidad de luz (Chagas & Soares, 2003).

a) Temperatura

La temperatura es un factor importante que afecta al crecimiento de tejidos *in vitro* ya que influye directamente en la regulación del metabolismo primario o secundario, dirigiendo el desarrollo de procesos fisiológicos (Palomares, *et al.*, 2003). Cada especie presenta un intervalo de temperatura en el que su crecimiento es óptimo, el cual varía dependiendo del genotipo, órgano del explante y edad de la planta madre (Sabit, 2006). Resultados favorables de crecimiento *in vitro* se han obtenido en rangos de temperatura entre 20 y 28°C (Pierik, 1990).

b) Humedad

La humedad relativa es un parámetro que influye en el cultivo *in vitro*, esta es elevada en los recipientes o tubos de ensayo en donde se inoculó el explante, mientras que en la cámara de crecimiento oscila entre 60 y 70%. Es aconsejable mantener un control de éste parámetro ya que humedades relativas menores al 50% provocan pérdidas de agua dentro de los recipientes, concentrando sales en el medio, lo que puede resultar tóxico para los explantes; mientras que una muy elevada humedad podría elevar la probabilidad de contaminación (Pierik, 1990)

c) Intensidad de luz y fotoperíodo

Las respuestas morfogénicas de los explantes se ven influenciadas por factores como cantidad, calidad y períodos de luz a las que se ven sometidos, lo que de igual forma, depende directamente de la especie vegetal y el objetivo a investigar (Palomares, *et al.*, 2003), por lo que la luz determina el desarrollo de los organismos autótrofos. Respecto a la cantidad de luz o irradiación, un cultivo *in vitro* necesita cantidades entre 8 – 15 Wm² (Perik, 1990). Las necesidades de luz de una planta en sistema *in vitro* son menores a las de la planta *in vivo* debido a que el medio en el que se desarrolla contiene

compuestos orgánicos como la sacarosa que permiten que las plántulas se desarrollen de forma autotrófica (Sabit, 2006). En cuanto a la calidad de la luz o espectro, se conoce que los pigmentos fotosintéticos, incluida la clorofila, absorben la energía contenida en las radiaciones para efectuar las reacciones químicas del proceso (Sabit, 2006). El fotoperíodo se refiere a la alternancia de los ciclos de luz con los de oscuridad y se emplean períodos de entre 14 y 16 horas de luz continua y el resto de oscuridad; exceptuando casos especiales en los que se emplea incubación completa en oscuridad (Pierik, 1990).

1.4.3 Nuevas estrategias de propagación masiva *in vitro*

1.4.3.1 Sistema de Inmersión Temporal

1.4.3.1.1 Origen y generalidades

Steward *et al.*, (1952) fue el primero en aplicar una técnica de inmersión periódica en medios de cultivo líquido; cuya modificación realizada en el año 1956 fue denominada “los aparatos Steward”. En esta invención el medio líquido era transferido de un tubo a otro dejando el tejido en una fase gaseosa y viceversa. De allí algunos otros intentos se realizaron empleando el mismo principio, y fue hasta 1985 que Tisserat y Vandercook operaron el primer equipo automatizado que aplicaba el principio de “cambio de flujo” (citado por Preil 2005), lo que dio inicio al debate acerca de cultivar tejidos *in vitro* que permanezcan temporalmente inmersos en un determinado medio.

En 1993, Alvard, y colaboradores, introdujo el envase RITA[®] siendo en 1995 Teisson y Alvard quienes desarrollaron el nuevo concepto de inmersión temporal para cultivo *in vitro* de plantas usando medios líquidos, lo que eventualmente generaría un interés a nivel mundial por esta novedosa técnica (citado por Preil, y colaboradores, 2005). Es así que se iniciaron diversas actividades y pruebas en sistemas de inmersión temporal resultando en la variación en el diseño de recipientes, equipos, y tratamientos basados en

tiempos de inmersión y frecuencia que dependerían directamente de los tipos de cultivo de interés. Este tipo de sistemas mencionados presentarían diversas ventajas de funcionamiento y rendimiento; además, por otro lado ciertas características como contraparte que implican deficiencias que serán explicadas posteriormente.

Es necesario conocer que alrededor de 500 millones de plantas clonadas *in vitro* fueron propagadas en el año 1990 en laboratorios de Europa occidental, Estados Unidos e Israel; producción que se concentra en laboratorios comerciales cuyo objetivo es la propagación de una especie vegetal específica de acuerdo a sus requerimientos (Orellana, 1998). Hasta la actualidad estas cifras se mantienen en aumento y la propagación de plantas *in vitro* se ha incrementado en niveles exponenciales hacia países de América Latina como Cuba, Brasil, Costa Rica, entre otros. En un estudio realizado por Winkelmann y colaboradores (2006), datos estadísticos reportados para la producción comercial de plantas *in vitro* en Alemania, indican que el número de laboratorios de cultivo *in vitro* ha ido aumentando paulatinamente tanto como la producción anual de plantas propagadas en dichos centros. Es así que dicho estudio muestra que si en el año de 1984 Alemania contaba con apenas 12 laboratorios cuya producción comercial de plantas *in vitro* era de un millón de plantas anuales; en datos recopilados para el año 2006 la producción ascendió a 48 millones de plantas por año en apenas 30 laboratorios de producción comercial (Winkelmann, *et al.*, 2006). Con ello, se puede estimar que una cifra considerablemente alta de plantas propagadas *in vitro* se producen a nivel mundial anualmente.

Es importante recalcar que los datos citados corresponden a plantas cultivadas en condiciones *in vitro* mediante propagación convencional, es decir, la técnica conocida como de primera Generación experimentada en diversos países a nivel mundial. Dicha metodología implica tecnología avanzada y capacitación técnica de alta disciplina por lo que sus costos representan rubros elevados en lo que corresponde a mano de obra, instalaciones, insumos y

materiales de alta calidad (Orellana, 1998). De allí que la tendencia al cambio ha envuelto también a las técnicas biotecnológicas con la finalidad de satisfacer las demandas comerciales por diversos cultivos, las cuales mediante los sistemas de propagación tradicional no son satisfechas. Por ello, se han buscado tecnologías que consigan hacer de la micropropagación un proceso más efectivo reduciendo los costos e incrementando el número de plantas de producción *in vitro* tal como lo permiten los sistemas de inmersión temporal con el empleo de medios de cultivo líquidos.

Como se mencionó al inicio de este apartado, en el año de 1995, el CIRAD (La Recherche Agronomique Pour Le Développement, 2009) crea un sistema denominado de Inmersión Temporal. El mismo que posee como característica la semi-automatización de su empleo para la propagación de plántulas *in vitro* (CIRAD, 2009). Básicamente consiste de un recipiente en el que por medio de la aplicación de un flujo de aire se hace pasar medio de cultivo hacia los explantes durante un tiempo y frecuencia de inmersión pre determinados; posterior a dicho tiempo, el medio de cultivo líquido desciende por gravedad hasta que un nuevo ciclo de inmersión ocurra (Maldonado, Rodríguez, Gómez & Cárdenas, 2003) (Figura 1.2).

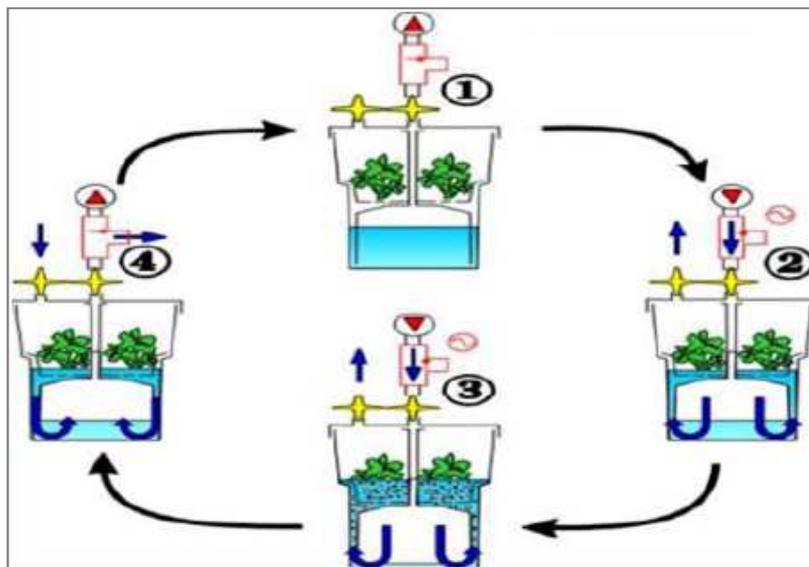


Figura 1.2 Esquema de funcionamiento del RITA® (Alvard, *et al.*, 1993)

El equipo diseñado por científicos franceses, CIRAD, se denomina RITA[®] por sus siglas en inglés correspondientes a: Recipient for Automated Temporary Inmersion System y consiste en un contenedor o frasco plástico de un litro de capacidad, dividido en dos compartimientos. En el compartimiento superior, de base perforada, se coloca el material vegetal sobre una espuma de poliuretano; mientras que en el compartimiento inferior se encuentra el medio de cultivo líquido. En el centro del compartimiento superior hay un tubo dispuesto longitudinalmente, a través del cual se inyecta aire estéril por medio de un compresor que está conectado al equipo por mangueras, con el fin de desplazar el medio líquido de la parte inferior a la superior. Este proceso es controlado por un temporizador para regular los tiempos y frecuencias de inmersión. Cabe anotar que, en lugar de utilizar la espuma de poliuretano, se pueden adaptar tamices o mallas metálicas en donde se colocan los explantes (CIRAD, 2009).

Pese a los múltiples beneficios, ya anotados, que trajo consigo la utilización de éste sistema, resulta un equipo de alto costo que al estar bajo patente implica grandes inversiones para laboratorios de cultivo de tejidos *in vitro* en países en vías de desarrollo. De allí que tomando en cuenta que América Latina es después de África, la región que menos vitroplantas produce, centros científicos y universidades de Cuba comenzaron a desarrollar nuevas tecnologías que permitan la obtención de una alta producción de plantas *in vitro* y además se pueda diagnosticar y sanear a patógenos de especies de interés. Es así que en el año de 1999 la primera Biofábrica es construida obteniendo un potencial instalado para, en la actualidad producir alrededor de 60 millones de vitroplantas por año (Pérez Ponce, Orellana, Suárez & Valdés, 1998).

El Sistema creado por científicos investigadores cubanos corresponde a una variación más efectiva que el construido por el CIRAD en el año de 1997. Este fue denominado sistema de inmersión temporal (SIT) cuya principal característica es la de emplear dos frascos idénticos difieren del sistema RITA[®]

al presentar numerosas ventajas sobre éste. De forma general, mediante este sistema, se logró revolucionar los métodos tradicionales de micropropagación, pues se ha conseguido mayores tasas de multiplicación, enraizamiento y aclimatación, así como niveles elevados de supervivencia en condiciones de campo, ya que se plantea que este sistema provoca cambios en la atmósfera interna de los frascos, trayendo consigo un mayor crecimiento y desarrollo de los explantes, además de que las vitroplantas mantienen una capa superficial de medio de cultivo hasta la próxima inmersión, lo que evita pérdidas por desecación (Jiménez & De Faria Silva, 1998).

1.4.3.1.2 Características del Sistema de Inmersión Temporal

El sistema de inmersión temporal es un sistema semi-automatizado empleado para la micropropagación de plantas. Se lo conoce comúnmente como biorreactor, ya que remitiéndose a la definición de este término un biorreactor es un recipiente en el cual se llevan a cabo bioprocesos ya sea empleando sistemas automáticos o semi-automáticos según (Dorán, 1998), por lo que un equipo como el SIT coincide con este principio. Los primeros intentos de utilizar biorreactores para la producción de brotes fueron realizados en el año de 1981 por Tkayama y Mizawa con begonias y en el año de 1988 Levin y colaboradores describieron un sistema automatizado para propagación masiva utilizando un biorreactor para la obtención de plántulas que consistía en un bioprocesador para la separación y distribución a recipientes de cultivo y una máquina transplantadora, con lo que se consiguió reducir costos hasta en un 60% comparado con los métodos convencionales de cultivo de tejidos (Jiménez, *et al.*, 1998).

El uso del sistema de inmersión temporal presenta ciertas ventajas importantes sobre la técnica de micropropagación convencional. Entre ellas se pueden mencionar su fácil automatización, reducción de costos, incremento en los coeficientes de proliferación, mayor absorción de los nutrientes y difusión de sustancias tóxicas (Escalona, 2005). En trabajos de investigación para la

propagación de una especie de gran interés comercial como el plátano, mediante la aplicación de este protocolo se ha reportado que es posible obtener una gran cantidad de plantas (360) listas para la aclimatación en sólo 3.7 meses a partir de un meristemos apical de plátano establecido *in vitro*, mientras que con la aplicación del medio semi-sólido en frascos convencionales solo es posible obtener 67 brotes en ese mismo período a partir de un meristemo apical en este cultivo. Además, con la aplicación del SIT se logra obtener 5.3 veces más brotes que con el medio semi-sólido, lo que sin duda el protocolo de proliferación propuesto logra una mayor eficiencia biológica y por ende mayor cantidad de ganancias para un laboratorio de producción (Escalona, *et al.*, 2005). Las ventajas que presenta el SIT serán señaladas de forma particular en el apartado 1.4.3.2.

1.4.3.1.3 Operatividad

A partir del concepto de SIT desde el punto de vista técnico, éste consiste en un sistema cerrado caracterizado por cambiar las condiciones fisiológicas y ambientales, no hay ni salida ni entrada de medio de cultivo (Dorán, 1998).

El primer equipo construido por investigadores cubanos constaba básicamente de dos recipientes de vidrio de forma cilíndrica de un litro de capacidad; cada recipiente tenía un tapón de hule con orificios de cinco mm en el cual se introducía dos tubos de vidrio también de cinco mm. El primer tubo se introducía hasta el fondo saliendo ocho cm por encima del tapón; y el otro tubo, se introducía hasta el ras de la parte inferior del tapón y saliendo ocho cm desde la parte superior del tapón. Los dos recipientes estaban interconectados mediante una manguera de plástico flexible y transparente uniendo los dos tubos de vidrio que se colocaron hasta el fondo de los recipientes (Maldonado, *et al.*, 2003).

A medida de que la tecnología y demanda por mejoras incrementaron, se realizaron modificaciones al SIT, teniendo en la actualidad, ciertos materiales y equipamiento que han hecho de éste un mecanismo de propagación de plántulas automatizado y de fácil alcance. De acuerdo con Berthouly & Etienne (2005) los sistemas que emplean el principio de inmersión temporal para micropropagación de plantas han sido clasificados dentro de cuatro grupos de acuerdo a la operatividad: máquinas de inclinación, inmersión completa del material vegetal y renovación del medio nutritivo, inmersión parcial y mecanismo de renovación de nutrientes, inmersión completa y transferencia del medio líquido sin renovación de nutrientes. Dichos sistemas difieren básicamente en el diseño e instalación de los componentes de un SIT, y se puede enlistar como diferencias: los tamaños de contenedor, tipo de soporte para el cultivo, existencia de un control de inmersión computarizada o un timer únicamente, uso de bombas peristálticas o bombas de aire (Berthouly & Etienne, 2005).

Sin embargo, a pesar de las variaciones, el mecanismo de operación es basado en el principio de Pascal que consiste en introducir aire mediante un compresor a través de los tubos que se encuentran al ras de la superficie de cada uno de los recipientes. Este aire es introducido en primera instancia hacia el recipiente en el que se encuentra el medio de cultivo líquido, el cual por la presión positiva generada en el interior del recipiente fuerza a este a subir por la manguera hasta llegar al segundo recipiente, en donde se encuentran los explantes. Estos se encontrarán en contacto con el medio de cultivo líquido durante un determinado tiempo y una vez completo, el proceso se invertirá y el primer recipiente se llenará nuevamente con el medio de cultivo hasta que un nuevo ciclo de inmersión empiece (Maldonado, *et al.*, 2003).

El proceso es controlado de forma secuencial mediante controladores de tiempo (timers) o tableros de control lógicos programables (PLC) que son diseñados para controlar la realización de un ciclo de inmersión con ciertas frecuencias diarias que, generalmente, son determinadas de forma

experimental. Uno de los controladores de tiempo es programado para abrir una válvula solenoide que permite que el aire ingrese a uno de los recipientes y tras alcanzar el tiempo de inmersión determinado la válvula se cierra debido a la intervención del controlador de tiempo.

La figura 1.3 señala esquemáticamente el proceso en el cual el primer evento ocurre cuando el aire expulsado por el compresor ingresa al recipiente haciendo presión en el interior del recipiente forzando al líquido a pasar de un recipiente a otro. La entrada del aire se realiza mediante una válvula que se abre mediante el un controlador de tiempo; permaneciendo cerrada una segunda válvula del otro recipiente mediante el controlador de tiempo.

En el segundo evento, cuando entra el aire en el segundo recipiente, la presión hace que el líquido regrese al primero mediante la segunda válvula que es abierta por el controlador de tiempo. Como tercer evento, se obtiene el fin del ciclo, manteniendo el sistema en reposo hasta que se cumpla la frecuencia determinada y empiece un nuevo ciclo de inmersión. (Maldonado, *et al.*, 2003).

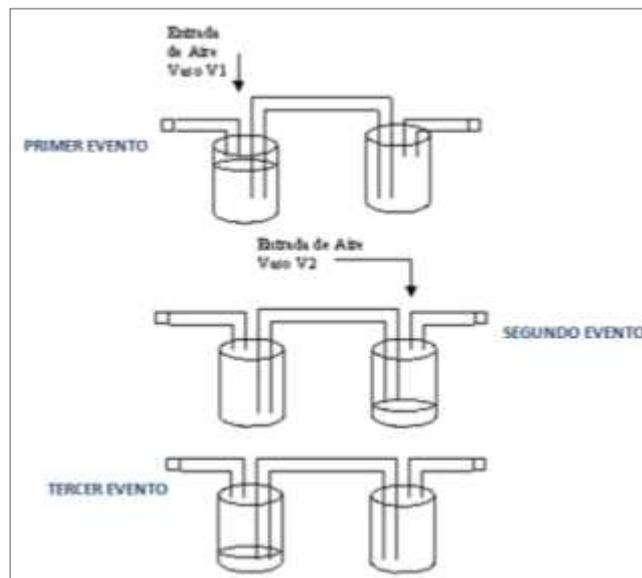


Figura 1.3 A) primer evento en el SIT. B) segundo evento en el SIT. C) final del ciclo en el que el líquido regresa a su posición original (Maldonado, *et al.*, 2003)

Asimismo, la figura 1.4 muestra una unidad de SIT con la que se realizó los ensayos de multiplicación mediante este sistema en la presente investigación, en los que el principio de operatividad es el mismo ya descrito.

De este modo, mediante el timer, el tiempo y frecuencias de inmersión son controlados tras cada ciclo en el cual los explantes estarán en contacto directo con el medio líquido hasta que las plántulas puedan ser, ya sea, sembradas nuevamente en medio sólido para el enraizamiento o trasplantadas a un sustrato en la fase de aclimatación.



Figura 1.4 Sistema de inmersión temporal adaptado para la multiplicación de plántulas de cilantro cimarrón

1.4.3.2 Ventajas del Sistema de Inmersión Temporal

Existen diversas ventajas respecto al uso de medios líquidos en procesos de micropropagación de especies vegetales las cuales se refieren principalmente a la reducción de costos en la producción masiva de plántulas y la automatización de procesos propios de dicha técnica.

El cultivo en medio líquido ofrece diversas mejoras respecto al cultivo en medio sólido con el empleo de agar, entre las cuales se encuentran el proveer de condiciones de cultivo más uniformes, el medio de cultivo puede ser renovado sin cambiar de contenedor, la esterilización es posible mediante ultrafiltración y la limpieza de los contenedores resulta menos laboriosa. Además, se pueden emplear contenedores de grandes volúmenes en donde prácticamente la totalidad de su espacio es cubierta mientras que en la multiplicación convencional con agar se necesitan cultivos planos; los tiempos de transferencia se ven reducidos en vista de que los explantes no se encuentran posicionados en un determinado sitio (Berthouly & Etienne, 2005)

De acuerdo a Takayama y Akita (citado por Preil, 2005) en cuanto a la técnica de inmersión se presentan también diversas ventajas tales como:

- Obtención de un número elevado de plántulas fácilmente producidas en el proceso de escalamiento de un cultivo.
- Reducción significativa de los costos de mano de obra en vista de que el manejo de los cultivos, tanto inoculación y mantención, resulta más fácil.
- Incremento en la facilidad de absorción de nutrientes por parte de los cultivos debido a que éstos se encuentran en contacto con el medio líquido.
- Incremento de la absorción del suministro de oxígeno mediante aireación forzada lo que mejora la tasa de crecimiento y el porcentaje de biomasa final.

- Reducción significativa de la dominancia apical y formación de yemas laterales en los cultivos debido al continuo movimiento de los cultivos en el biorreactor.

Así también, a lo largo de las investigaciones realizadas en sistemas de inmersión temporal, se ha encontrado que numerosas especies presentan un mejor desenvolvimiento al ser cultivadas en medios líquidos comparadas con las desarrolladas en medios de cultivo con agar (Berthouly & Etienne, 2005).

1.4.3.3 Principales problemas en el Sistema de Inmersión Temporal

Se ha encontrado también que este tipo de sistemas presenta ciertos problemas en cuanto al desarrollo de los cultivos de interés. En la actualidad, este sistema ha alcanzado una alta automatización y se han logrado contrarrestar algunas desventajas producidas al emplearlo; sin embargo, entre los principales inconvenientes con los que los investigadores se han encontrado frecuentemente están aquellos relacionados con la fisiología del cultivo después de efectuados los ciclos de inmersión a más del mantenimiento de la calidad genética de una determinada especie vegetal en estudio y el difícil mantenimiento de la asepsia en los recipientes (Preil & Hvoslef-Eide, 2005).

1.4.3.3.1 Hiperhidricidad o vitrificación

La hiperhidricidad constituye un problema común en sistemas *in vitro* que empleen medios de cultivo líquido para la obtención de plántulas de determinada especie. Consiste en la excesiva acumulación de agua en el tejido vegetal lo que puede resultar en ciertas consecuencias no deseadas como: disminución del oxígeno en las células, inducción a estrés oxidativo y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), desencadenando finalmente un daño al tejido (Ziv, 2005). Sin embargo, tal como lo menciona Berthouly y colaboradores (2005), la vitrificación puede ser considerablemente

reducida mediante un estricto control de los tiempos de inmersión. Además, se pueden adoptar variaciones al empleo del SIT utilizando soportes de celulosa, bloques o esponjas que sostengan las plántulas en el medio líquido (Berthouly & Etienne, 2005).

1.4.3.3.2 Variación somaclonal

La variación somaclonal que pudiere afectar a las plántulas *in vitro* en sistemas de inmersión temporal se trata de diferencias genotípicas en el material vegetal causadas por arreglos cromosomales. Estas variaciones están más ampliamente difundidas en plantas regeneradas a partir de callo (Ziv, 2005). Una de las principales desventajas de la variación somaclonal representa la divergencia del material cuando se requiere uniformidad clonal como por ejemplo en las industrias forestales y de horticultura. Para ciertas investigaciones la variación somaclonal puede representar una gran desventaja; sin embargo, puede representar una gran herramienta en la búsqueda de mutaciones con fines de obtención de nuevas líneas de plantas que amplíen la base genética de las especies vegetales a más de poder brindar resistencias a plagas para programas de mejoramiento (Prasanna, *et al.*, 1996)

1.4.3.3.3 Mantenimiento de la asepsia

Como es de conocimiento general, las técnicas de cultivo *in vitro* necesitan conservar un control estricto de la asepsia para mantener el adecuado desarrollo y producción de plántulas y las técnicas de cultivo en medios líquidos como el SIT no son la excepción. Es así que en este tipo de sistemas, la probabilidad de contaminación se puede desplegar más rápidamente y dispersar con mayor facilidad en el medio líquido y puede acarrear pérdidas hasta del 100% del cultivo (Preil & Hvoslef-Eide, 2005).

Por ello, el material vegetal a ser inoculado en el SIT debe estar sometido previamente a subcultivos que permitan asegurar su asepsia en fin de controlar el crecimiento indeseado de microorganismos patógenos (Preil & Hvoslef-Eide, 2005). De acuerdo a Takayama & Akita (2005), en su mayoría las especies herbáceas se desarrollan adecuadamente en el SIT realizando previamente al menos 3 subcultivos, mientras que para especies forestales, se debe tomar en cuenta en primera instancia el tejido del que provengan las plántulas para realizar al menos 3 subcultivos sucesivos previo el ingreso al SIT. Este enunciado pudiere estar atribuido a que en especies forestales a más de tener cierta “dificultad” para desarrollarse en medios líquidos, el tejido del cual provienen las plántulas pudiere tender a presentar mayor cantidad de contaminación endógena que eventualmente podría manifestarse en un cultivo con inmersión temporal.

1.4.3.4 Factores que influyen en el cultivo *in vitro* mediante SIT

1.4.3.4.1 Aireación

La aireación corresponde a uno de los factores más influyentes sobre la propagación *in vitro* mediante sistemas de inmersión temporal. En primer lugar debido a que mediante el ingreso del flujo de aire a los envases del SIT se acciona el mecanismo de cada ciclo de inmersión que eventualmente mantendrá a los explantes en contacto con el medio de cultivo líquido. Por otro lado, debido a que mediante la inyección de aire se puede cumplir con los requerimientos de aireación de cada cultivo permitiendo así que se dé un intercambio gaseoso entre el CO₂ y etileno generados con el O₂ filtrado que ingresa al sistema (Preil & Hvoslef-Eide, 2005).

Así, la presión del flujo de aire que ingrese al biorreactor deberá ser determinada experimentalmente ya que está directamente relacionada con el mezclado, con la minimización del estrés de los tejidos debido a la cizalla, y los requerimientos de aireación propios de cada especie en investigación (Ziv,

2005). El primer parámetro se describe en la siguiente sección como turbulencia (1.4.3.4.2) y en lo que respecta al segundo, Ziv (2005) señala que el empleo de biorreactores con levantamiento de aire exhibe un aumento en la proliferación de yemas meristemáticas y una reducción de la cizalla de los tejidos siendo este el resultado deseado al propagar plántulas mediante SIT. Respecto a los requerimientos de aireación para cada especie, Hohe y colaboradores (2005) explican que el flujo de aire de ingreso influye sobre la tasa de crecimiento de los cultivos siendo esta incrementada significativamente al airear cultivos fotoautótrofos de *Physcomitrella* con aire enriquecido con CO₂ y continua iluminación. Finalmente, como ya se describió en el apartado 1.4.3.3.1, un incremento en la aireación en el recipiente de cultivo permitiría reducir la hiperhidricidad de los tejidos de forma significativa (Berthouly & Etienne, 2005), evitando, sin embargo, que dicho incremento aumente la cizalla del tejido y por ende su necrosis.

1.4.3.4.2 Turbulencia

Como fue descrito en el apartado 1.4.3.1.3, el mecanismo de traslado de medio de cultivo de un recipiente al otro en el sistema de inmersión temporal (SIT) es accionado por la presión de un flujo de aire de entrada ejercida mediante el compresor por las válvulas de carga y descarga, generando así dicho mecanismo. De allí que el SIT es considerado, bajo estas condiciones, un biorreactor agitado por flujo de aire, lo que implica que ésta entrada de aire genere turbulencia.

La turbulencia o efecto de la agitación puede constituirse en un problema para el cultivo de células o tejidos en suspensión debido a la formación de grupos o agregados los cuales afectan a la agitación por lo tanto a la difusión del oxígeno (Pérez, 1998). Además, si en un ciclo de inmersión en el SIT, la turbulencia generada es excesiva, esto puede causar la destrucción del tejido. Por ello, dicho factor debe ser controlado adoptando diversas medidas que reduzcan la afectación del cultivo tales como: el empleo de una

presión de flujo de aire correcta que será determinada para cada tipo de cultivo y especie de interés, un control mediante variaciones en la composición del medio de cultivo que eviten la formación de agregados celulares y además la manipulación durante los subcultivos (Pérez, 1998) que eviten la acumulación de excesiva biomasa que pueda eventualmente causar su cizalla y daño en los tejidos.

1.4.3.4.3 Volumen y renovación del medio líquido

En cuanto al volumen del medio de cultivo para la propagación de plántulas en el SIT, este corresponde a un factor importante que necesita ser optimizado según las características particulares del tipo de envase, planta de interés, densidad del inóculo inicial, entre otras.

Es así que existen diversos estudios en los que se pretende optimizar el volumen de medio de cultivo por explante necesario para la obtención de altas tasas de multiplicación; como el realizado por Lorenzo y colaboradores (1998), en donde se encontró que multiplicando por 10 veces el volumen de medio de cultivo para brotes de caña de azúcar, se incrementaba el coeficiente de multiplicación de 8.3 brotes por explante a 23.9 brotes transcurridos 30 días (Citado por Berthouly & Etienne, 2005). Sin embargo, en dicha investigación no se encontró diferencias significativas de longitud de los brotes con el empleo de diferentes volúmenes de medio de cultivo, acotando que una alta cantidad de medio líquido podría resultar menos eficiente (Berthouly & Etienne, 2005).

Por otro lado, la renovación del medio líquido resulta importante durante un período o ciclo de cultivo mediante SITs, debido a que ello permite prevenir la secreción de exudados fenólicos propios de ciertas especies en determinadas fases de desarrollo y morfogénesis de las plántulas propagadas (Berthouly & Etienne, 2005).

1.4.3.4.4 Acumulación de biomasa

Como se mencionó anteriormente el empleo de medios de cultivo líquido en las diferentes etapas de la micropropagación favorece al desarrollo de explantes y tal como se ha reportado para diferentes especies vegetales existen incrementos significativos de la tasa de proliferación (Bermúdez, *et. al.*, 2000). Sin embargo, se ha citado también a la acumulación de biomasa como un factor altamente influyente en el cultivo mediante este tipo de técnica como los sistemas de inmersión temporal. La acumulación de excesiva biomasa en los SITs se presenta principalmente por factores como excesivo desarrollo y crecimiento de los propágulos una vez transcurrido el ciclo de multiplicación. Dicho crecimiento puede afectar al índice de multiplicación y disminuirlo considerablemente, por ende, la eficiencia del SIT también se vería afectada. Es así que de acuerdo a Bermúdez y colaboradores (2000), se ha señalado que el uso de retardantes de crecimiento en los medios de cultivo logran disminuir el crecimiento en hojas y estimulan la producción de nuevos brotes disminuyendo así la probabilidad de afectación sobre el coeficiente de proliferación debido a acumulación de biomasa. Entre los principales retardantes de crecimiento están el paclobutrazol (PBZ), ancymidol (ANC), entre otros cuyos efectos han sido probados en diversas especies como sábila, crisantemo, caña de azúcar. El principal efecto de estos compuestos es disminuir la elongación de las plántulas ya que actúan como inhibidores en la ruta metabólica de los isoprenoides que conduce a la síntesis de giberelinas y esteroides; así también en vitroplantas de uva el PBZ ha mostrado aumentar la resistencia a la desecación asociada a una mayor habilidad para el cierre de los estomas en condiciones de humedad relativa reducida (Meneses, *et. al.*, 2000).

1.5 Hipótesis

El Sistema de Inmersión Temporal resulta un método más eficiente comparado con la micropropagación convencional en medio sólido para la multiplicación *in vitro* de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*).

CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización del ensayo

La fase de laboratorio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología - Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicada en la parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, coordenadas 0°18,81 S; 78° 26,64 O a una altitud de 2516 msnm.

2.2 Selección, colecta y transporte del material vegetal

La selección del material vegetal con el cual se realizó la micropropagación de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*), se recolectó en sectores donde se ha reportado su existencia; tal es el caso de las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Esmeraldas. Las muestras fueron seleccionadas de acuerdo a las características recomendadas por Jiménez (1998) tales como una buena constitución fenotípica de las plantas donadoras, estado fisiológico de la planta madre en crecimiento activo y de desarrollo vigoroso y sano.

Para el caso de la recolección en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, las plantas madre fueron adquiridas en una de las haciendas propiedad del IASA II, que se encuentra en el Km. 35 de la vía a Quevedo. Las plantas se extrajeron y transportaron, con una muestra de suelo del sitio, hacia el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en Sangolquí. De igual manera, para la recolección realizada en la provincia de Esmeraldas las muestras de campo se tomaron manteniendo los criterios previamente indicados.

De acuerdo a lo sugerido por Pierik (1990), las plantas muestreadas se seleccionaron *in situ* escogiendo las especies que presentaron las mejores características fenotípicas, es decir con mayor número de hojas, plantas libres de hongos y enfermedades además plantas que tengan un buen número de yemas e inflorescencias.

Se realizaron cuatro recolecciones periódicas, de las cuales tres se efectuaron en Santo Domingo de los Tsáchilas y un muestreo en la provincia de Esmeraldas (Figura 2.1). El proceso de recolección incluyó inicialmente la selección *in situ* del material vegetal, posteriormente se tomó cada una de las plantas y con una muestra del suelo del sitio, se almacenó en fundas plásticas. Se roció las plantas con agua estéril para que mantengan su humedad hasta trasladarlas vía terrestre hacia el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. En vista de que los explantes pueden presentar respuestas diferentes a los tratamientos debido a la edad y condición fisiológica de cada individuo donador, se procuró que la recolección sea lo más uniforme posible.



Figura 2.1 A) Recolección de *E. foetidum* con muestra del suelo del sitio. B) Plantas seleccionadas.

Las plantas presentaban características uniformes entre las que se puede mencionar: gran número de hojas, inflorescencia de aproximadamente 10 cm con gran número de yemas, plantas vigorosas y sobre todo

características fitosanitarias adecuadas para tomarlas como plantas madres aptas para introducir el material vegetal al sistema *in vitro*.

En el laboratorio las muestras fueron trasplantadas a macetas con la muestra de suelo del sitio donde fueron recolectadas. Se mantuvo las muestras bajo condiciones de invernadero, a una temperatura entre 25 ± 3 °C y humedad relativa entre 60 y 70% con la ventilación del invernadero. Las plantas fueron sometidas a un tratamiento fitosanitario para eliminar la posible contaminación fúngica existente. Se empleó Benomil®, fungicida sistémico de principio activo carbendazim cuya aplicación fue foliar cada tres días.

2.3 Fase de establecimiento

2.3.1 Medio de cultivo para la desinfección

El medio de cultivo empleado para el desarrollo de la fase de establecimiento del cultivo *in vitro* consiste en un medio obtenido de la compilación bibliográfica de trabajos previos realizados en la especie vegetal objeto de investigación. Cada uno de los componentes, junto al volumen a emplear para la preparación de un litro de medio, se detalla en la tabla 2.1.

Se colocó además, una solución de vitaminas cuya concentración se presenta en la Tabla 2.2. Por otro lado, como componentes del medio de cultivo para desinfección se adicionaron 250 mgL^{-1} de PVP (polivinilpirrolidona), agar en concentración de $6,3 \text{ gL}^{-1}$, 30 gL^{-1} de azúcar, 100 mgL^{-1} de mioinositol; ajustado a un pH de 5.75. El medio de cultivo fue esterilizado en la autoclave durante 30 min. a 121°C y 15 psi.

Tabla 2.1 Componentes del Medio MS (1962).

STOCK	COMPONENTES	VOLUMEN A USAR (mL L ⁻¹)
I	NH ₄ NO ₃ KNO ₃	20
II	MgSO ₄ . 7H ₂ O MnSO ₄ . 4H ₂ O ZnSO ₄ . 7H ₂ O CuSO ₄ . 5H ₂ O	10
III	CaCl ₂ . 2H ₂ O KI CoCl ₂ . 6H ₂ O	10
IV	KH ₂ PO ₄ H ₃ BO ₃ NaMoO ₄ . 2H ₂ O	10
V	Na ₂ EDTA FeSO ₄ . 7H ₂ O	10

Tabla 2.2 Concentración de Vitaminas adicionadas al medio MS para establecimiento de *E. foetidum*.

Vitaminas	Concentración (mgL ⁻¹)
Ácido nicotínico	0.5
Glicina	2
Piridoxina	0.5
Tiamina	0.1

2.3.2 Desinfección del material vegetal

Efectuado el tratamiento fitosanitario descrito en el apartado 2.2, se procedió con la desinfección del material vegetal seleccionado previo su introducción *in vitro*. Se seccionaron tres tipos de explantes: hojas, segmentos nodales y yemas que fueron sometidos al mismo tratamiento de desinfección a excepción de la desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) para lo que se aplicó diferentes concentraciones para hojas, segmentos nodales y yemas. A continuación se describe el tratamiento usado para los diferentes explantes.

2.3.2.1 Desinfección de hojas

Para el protocolo de desinfección, se seleccionaron hojas de cilantro cimarrón de las plantas de invernadero y se sometieron, primeramente, a un lavado con agua corriente por 15 min. Posteriormente, fueron sumergidas en una solución de detergente comercial en concentración 1% p/v adicionando 5 gotas de Tween 20, como agente tensoactivo, durante 15 min, tras lo cual se realizaron lavados consecutivos con aguas estéril para retirar el detergente. A continuación, se sumergió el material vegetal en una solución 1% p/v de Benomil[®], adicionando 3 gotas de Tween 20 durante 10 min; seguido se realizaron lavados con agua estéril hasta retirar restos del fungicida.

Enseguida, se trasladaron los explantes a la cámara de flujo laminar en donde se continuó con los siguientes pasos de desinfección. La cámara de flujo laminar fue previamente desinfectada con etanol al 90% v/v y esterilizada por 30 min bajo luz ultravioleta; ello con la finalidad de asegurar que se mantengan condiciones asépticas previo la siembra de los explantes.

Se introdujeron las hojas en una solución de etanol al 70% v/v durante 30 s, e inmediatamente se las sumergió en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) en diferentes concentraciones (0.4%, 0.5%, 0.6% v/v) más 3 gotas de

Tween 20, durante tiempos de inmersión de 6 y 8 min. Finalmente, se realizaron tres lavados con agua estéril previa la siembra de los explantes.

Cabe recalcar que como procedimiento fundamental en la desinfección de explantes, se empleó etanol en una concentración de 70% v/v, lo que permite la ruptura de burbujas generadas en lavados previos facilitando la penetración del hipoclorito de sodio en el explante; así como la acción del tensoactivo Tween 20 cuyo empleo permite la acción sinérgica con el NaClO facilitando la ruptura de la tensión superficial mejorando así el contacto del desinfectante con el tejido (Pierik., 1990) (Wiley, 2008).

Los explantes ya desinfectados se mantuvieron en agua estéril hasta el momento de su corte para la siembra en el medio de cultivo de establecimiento. Las hojas fueron seccionadas a un tamaño de 4 cm² y fueron sumergidas en una solución de PVP 250mgL⁻¹ con la finalidad de contrarrestar la oxidación del explante antes de la inoculación en el medio MS (1962) (Figura 2.2).

En la tabla 2.3 se describen los tratamientos de desinfección empleados para hojas en donde se evaluaron diferentes concentraciones de NaClO y tiempos de inmersión mediante un arreglo factorial de 3x2

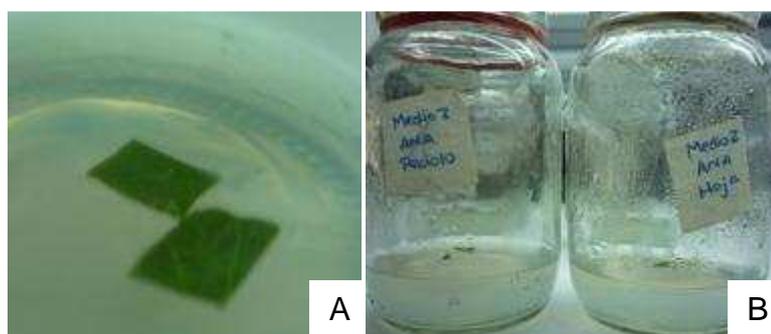


Figura 2.2 A,B) Siembra de segmentos de hojas de cilantro cimarrón en medio de establecimiento.

Tabla 2.3 Tratamientos para la desinfección de hojas de *Eryngium foetidum*.

Tratamiento	[NaClO] (%)	Tiempo (min)
1	0.4	6
2	0.4	8
3	0.5	6
4	0.5	8
5	0.6	6
6	0.6	8

2.3.2.2 Desinfección de segmentos nodales y yemas

Al igual que para la desinfección de hojas, para el protocolo de desinfección de yemas y segmentos nodales, se seleccionaron los mejores explantes de cilantro cimarrón de las plantas de invernadero. Se realizaron cortes de entre 4 y 5 cm y se sometieron a un lavado con agua corriente por 15 min. Se sumergieron los explantes en una solución de detergente comercial en concentración 1% p/v más 5 gotas de Tween 20, durante 15 min tras lo cual se realizaron lavados consecutivos con agua estéril. Se sumergió el material vegetal en una solución 1% p/v de Benomil[®] más 3 gotas de Tween 20 durante 10 min; y se realizaron lavados con agua estéril hasta retirar restos del fungicida.

Se trasladaron los explantes a la cámara de flujo laminar y se los sumergió en una solución de etanol al 70% v/v durante 30 s; seguido se colocaron los explantes en las soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones diferentes (0.7%, 0.8%, 0.9% v/v) más 3 gotas de Tween 20 durante tiempos de inmersión de 8 y 10 min. Finalmente, se realizaron 3 lavados con agua estéril previa la siembra de los explantes (Figura 2.3).



Figura 2.3 Desinfección de yemas y segmentos nodales. A) Explante seleccionado de invernadero. B, C) Yemas y segmentos nodales previa introducción. D) Inmersión en detergente. E) Inmersión en fungicida. F) Inmersión en Alcohol al 70%. G) Inmersión en Cloro. H) Lavado con agua estéril. I) Corte de las yemas y segmentos nodales.

Al igual que para hojas, las yemas y segmentos nodales se mantuvieron en agua estéril hasta el corte. Los explantes se cortaron de aproximadamente 3 cm y fueron sumergidos en una solución de PVP 250mgL^{-1} antes de la inoculación en el medio MS (1962).

La tabla 2.4 detalla los tratamientos de desinfección empleados para segmentos nodales y yemas mediante un arreglo factorial de 3×2 .

Tabla 2.4 Tratamientos para la desinfección de yemas y segmentos nodales.

Tratamiento	[NaClO] (%)	Tiempo (min)
1	0.7	8
2	0.7	10
3	0.8	8
4	0.8	10
5	0.9	8
6	0.9	10

Todos los explantes seleccionados para el establecimiento *in vitro* de *E. foetidum*, fueron sometidos al mismo ensayo estadístico y se efectuaron 10 repeticiones por cada tratamiento, en donde la unidad experimental fue un frasco con el explante. Estos fueron incubados a una temperatura entre $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de 50% en fotoperíodo de 16 horas luz. Las variables evaluadas en los diferentes tratamientos fueron:

Contaminación: Mediante observación se determinó si un explante, (hojas, segmentos nodales y yemas), está contaminado y se le asignó el valor de “1”, y a un explante no contaminado el valor de “0”; ya sea para contaminación fúngica como bacteriana (Figura 2.5, 2.6).

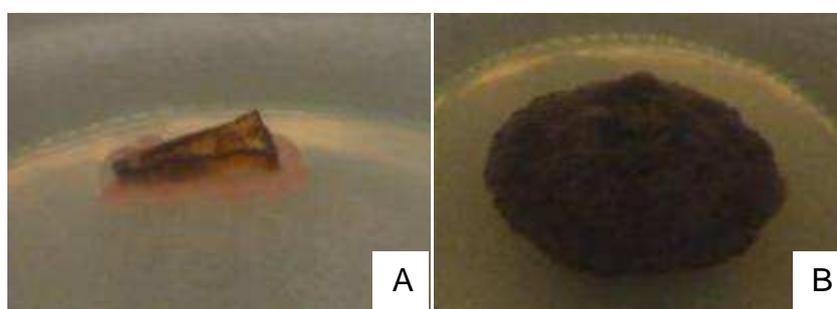


Figura 2.5 A) Contaminación bacteria. B) Contaminación fúngica.

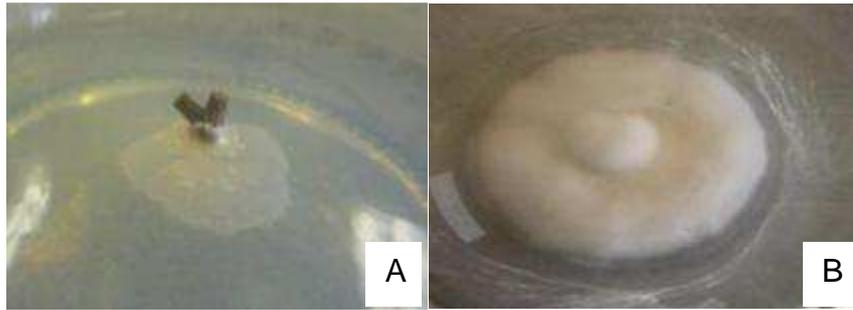


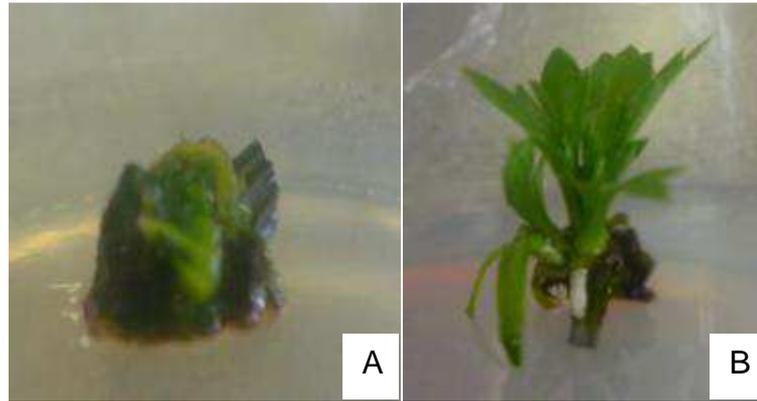
Figura 2.6 A) Contaminación bacteriana. B) Contaminación fúngica.

Oxidación: Mediante observación se determinó si un explante presenta oscurecimiento en los bordes de corte del tejido debido a la presencia de fenoles que provocan oxidación en el explante. En este caso se evaluó mediante la escala del “0” al “3”; donde “0” corresponde a un explante no oxidado y “3” a un explante oxidado (Figura 2.7).



Figura 2.7 Oxidación y necrosis de hoja.

Viabilidad: Tras observación de la respuesta del explante posterior a la siembra, se determinó la viabilidad de este estableciendo como escala del “1” al “5” para la necrosis del material vegetal, dando valor a “1” a un explante verde y “5” a un explante necrosado (Figura 2.8).



Explante viable (1)	
Explante necrosado (5)	

Figura 2.8 A) Yema viable de a los 15 días de la siembra. B) Yema viable a los 30 días de la siembra C) Escala de viabilidad para los explantes.

Para todas las variables descritas, se realizó la observación a cada unidad experimental a los 30 días de la siembra con lo que posterior se efectuó el análisis de datos mediante tablas de contingencia empleando gráficas en base a diferentes pruebas estadísticas de chi – cuadrado y análisis de varianza según la variable analizada.

2.4 Inducción de brotes

Una vez estandarizado el mejor tratamiento de desinfección, se continuó con la propagación *in vitro* de *E. foetidum*, mediante la inducción a brotes por organogénesis directa que permita regenerar plantas completas de esta especie. (Roca W, Mroginski L, 1993).

Para esta etapa, se utilizó únicamente segmentos nodales y yemas, debido a que al utilizar hojas como explante, no se obtuvo respuesta a la inducción organogénica (Figura 2.9).



Figura 2.9 Hoja de cilantro cimarrón sin respuesta, a los 45 días de la siembra.

De allí que se introdujeron únicamente segmentos nodales y yemas apicales y axilares de un tamaño de entre 2 y 3 cm, previamente sometidos al que resultó ser el mejor tratamiento de desinfección.

2.4.1 Medios de cultivo para la inducción de brotes

El medio de cultivo empleado para esta etapa fue el de Murashige y Skoog (MS) enriquecido con 250 mgL^{-1} polivinilpirrolidona (PVP), 35 mgL^{-1} ácido ascórbico, 30 gL^{-1} de sacarosa y 6.3 gL^{-1} de agar, ajustado a un pH entre 5,7 - 5,8; suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de 0,1,1.5 mgL^{-1} y diferentes concentraciones de 0,0.1,0.2 mgL^{-1} , ya sea de ácido naftalenacético (ANA) o ácido indolacético (AIA).

Los medios de cultivo fueron esterilizados en un autoclave durante 30 min a 121°C y 15 psi; posterior a la siembra se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 50 – 60% de humedad relativa, 725 – 750 luxes y un fotoperíodo de 16 h.

Para esta etapa se planteó un arreglo factorial de $2 \times 5 + 1$ en un diseño completamente al azar (DCA), incluido un tratamiento control sin reguladores de crecimiento. Los tratamientos empleados se describen en la tabla 2.5. Se realizaron 10 repeticiones para cada tratamiento, teniendo como unidad experimental un segmento nodal o yema inoculada en un frasco con medio de cultivo, incubado en las condiciones mencionadas.

Tabla 2.5 Tratamientos para la inducción de brotes a partir de segmentos nodales y yemas

Tratamiento	BAP (mgL ⁻¹)	AIA (mgL ⁻¹)	ANA (mgL ⁻¹)
0	0	0	0
1	1.5	0	0
2	1.5	0.1	-
3	1.5	0.2	-
4	1	0	-
5	1	0.1	-
6	1	0.2	-
7	1.5	-	0.1
8	1.5	-	0.2
9	1	-	0.1
10	1	-	0.2

Las variables evaluadas para esta fase se describen a continuación:

Inducción a brote: Se observó el tiempo de respuesta del material vegetal para la organogénesis directa. Esta variable fue evaluada en días, para lo que se realizó la observación de la presencia o ausencia de brote a los 30 días a partir de la siembra.

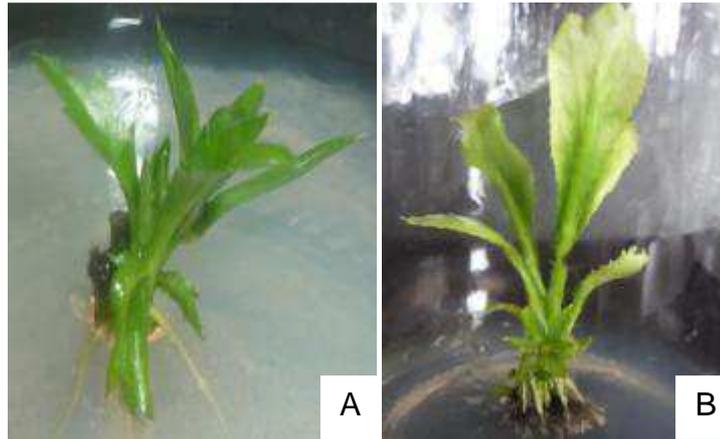


Figura 2.10 A) Brote organogénico a los 15 días de la siembra (2 cm). B) Brote organogénico a los 30 días de la siembra (4 cm)

Formación de callo: Se observó el apareamiento de callo y se asignó el valor de “1” a la presencia y “0” a la ausencia de callo, aplicado para segmentos nodales y yemas.

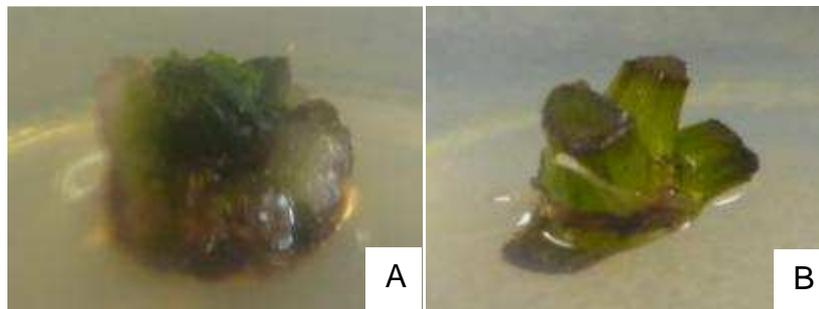


Figura 2.11 A) Yema con presencia de callo. B) Yema sin presencia de callo

Número de brotes por explante: Se contabilizó el número de brotes por explante en cada frasco, después de transcurridos 30 días de la siembra.

Longitud del brote: Se evaluó la longitud de los brotes originados a partir de cada explante tras los 15 y 30 días de la siembra del material vegetal. La medición fue tabulada en centímetros, y para el análisis estadístico se categorizaron los datos en cuatro niveles de longitud diferentes para yemas y

segmentos nodales. La categorización se muestra en el capítulo de resultados en el apartado correspondiente para cada tipo de explante.

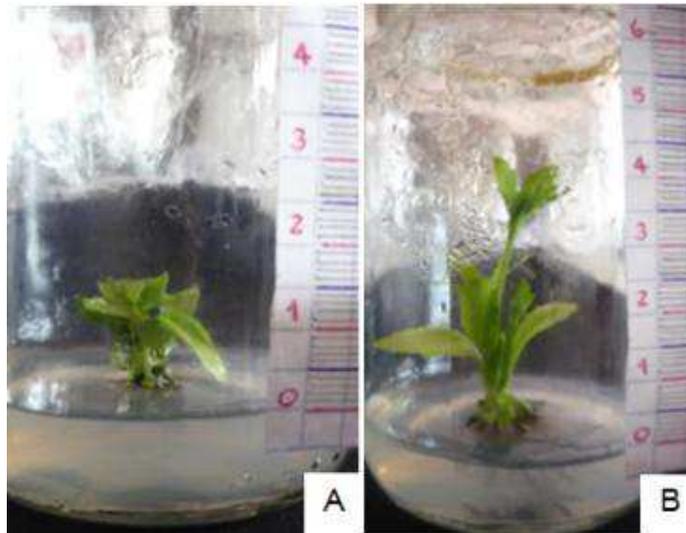


Figura 2.12 A,B) Longitud de brotes medidos en centímetros; a los 15 y 30 días respectivamente.

Ancho de las hojas: Se evaluó esta variable con la medición de la extensión de lámina foliar en centímetros y al igual que para la longitud, los datos fueron categorizados en cuatro niveles para el ancho de las hojas de los brotes generados a partir de yemas y segmentos nodales. La categorización se muestra en el capítulo de resultados en el apartado correspondiente para cada tipo de explante.



Figura 2.13 Medición de hojas *in vitro* en centímetros.

La evaluación se realizó al cabo de un mes y para el análisis estadístico exploratorio de datos se empleó tablas de contingencia en base a las cuales se elaboraron gráficas de barras. Además se realizó el análisis inferencial mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando simultáneamente pruebas de LSD Fisher según el nivel de significancia estadística encontrado.

2.5 Fase de multiplicación

2.5.1 Multiplicación convencional

Para los ensayos de la primera etapa en la fase de multiplicación convencional, se emplearon los explantes con brotes resultantes de la fase de inducción que presentaban un tamaño adecuado para ser seccionados y divididos hacia un nuevo medio de cultivo que permita su multiplicación.

Esta etapa constó de la realización de tres subcultivos que permitieron observar y analizar la capacidad de las plántulas para regenerar nuevos brotes organogénicos. Con ello se determinó la tasa de proliferación de cilantro cimarrón; además que al realizar subcultivos se aseguró la obtención de un cultivo aséptico, indispensable para los ensayos en el SIT y su producción masiva.

2.5.1.1 Medio de cultivo para la multiplicación convencional

Este fue seleccionado a partir del análisis de los resultados obtenidos de la inducción, es decir se escogió el mejor tratamiento de la fase anterior, para la multiplicación de *E. foetidum*. El medio de cultivo que presentó mejor respuesta de los explantes en la fase de inducción fue el Tratamiento 7 (Tabla 2.5, Figura 2.14) el cual estuvo compuesto por las sales del MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1.5 mgL^{-1} de BAP (bencilaminopurina), 0.1 mgL^{-1} de ANA (ácido naftalenacético), 5 mgL^{-1} de brasinolida, 250 mgL^{-1}

polivinilpirrolidona (PVP), 35 mgL^{-1} ácido ascórbico y enriquecido con 30 gL^{-1} de azúcar y 6.3 gL^{-1} de agar.

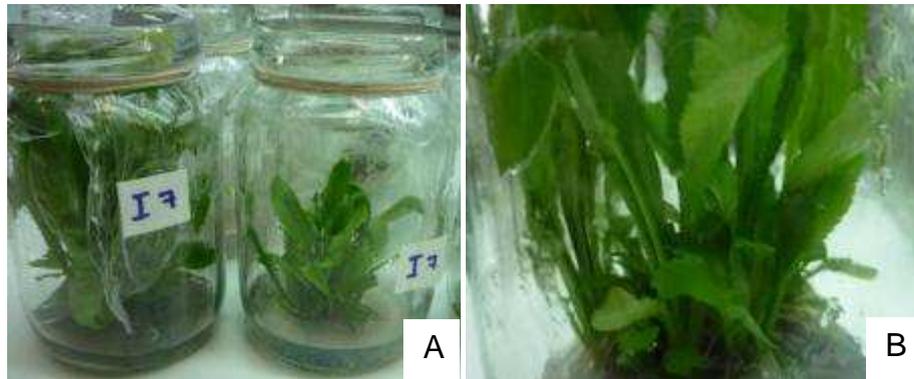


Figura 2.14 A, B) Proliferación de brotes en respuesta a la fase de inducción en el mejor tratamiento

El medio de cultivo mencionado, se empleó en la realización de los tres subcultivos, que fueron denominados como Subcultivo A, B, y C. Se tomó cada uno de los frascos con presencia de brotes y se dividió a un nuevo frasco con medio de cultivo en el que se sembró una plántula por envase. Tal como en la figura 2.14, las plántulas poseen una longitud entre 4 y 5 cm de longitud, por lo que al subcultivarlas, se realizaron cortes manteniendo una altura de 2 cm en el nuevo frasco (Figura 2.15, 2.16).



Figura 2.15 Plántulas provenientes del subcultivo A por ser trasladadas a un nuevo medio de multiplicación del subcultivo B

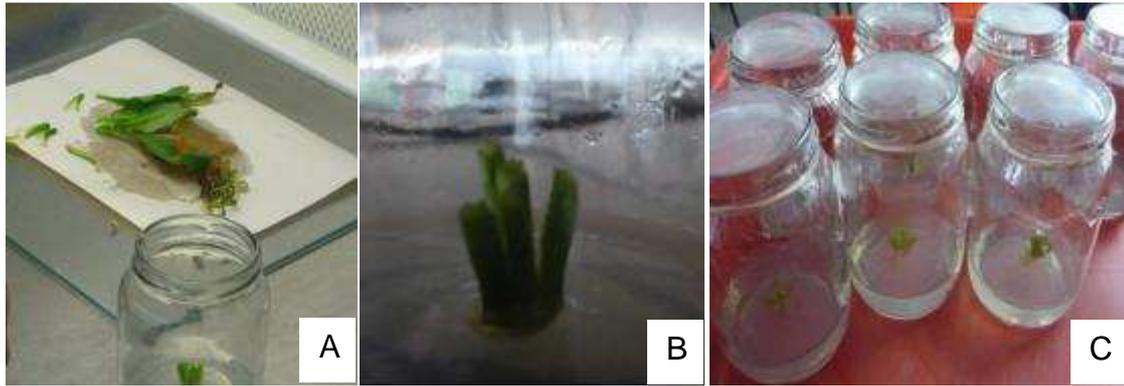


Figura 2.16 Subcultivo de plántulas. A) Corte de las plántulas. B) Plántula de 2 cm de longitud. C) Frascos de subcultivo A.

Tras la inoculación de las plántulas en nuevo medio de cultivo, se evaluó a los 30 días variables como: presencia/ausencia de brotes, número de brotes, longitud de los brotes, ancho de las hojas e índice de multiplicación.

Presencia o ausencia de brotes: Se observó la formación de nuevos brotes organogénicos a partir del explante inicial. La presencia de brote fue registrada como 1 y la ausencia como 0 (Figura 2.17).

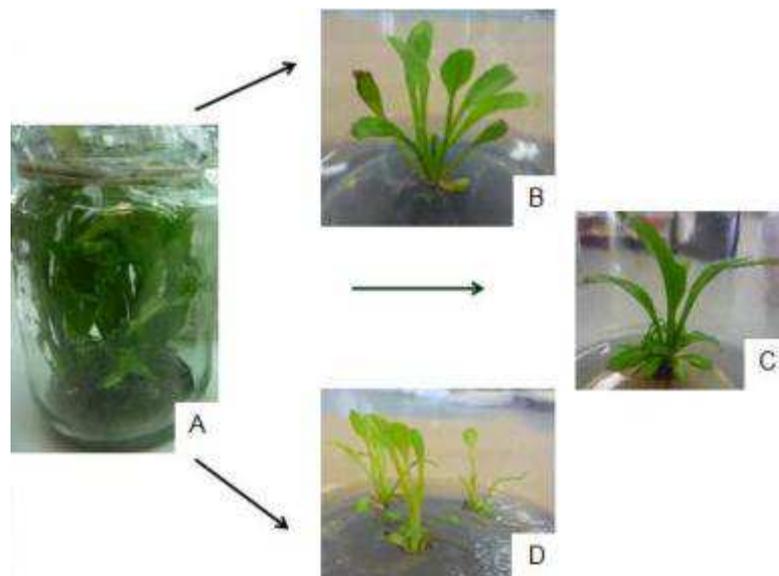


Figura 2.17 Esquema de subcultivos. A) Proliferación de brotes a los 30 días. B) Subcultivo A a los 15 días. C) Subcultivo B a los 15 días. D) Subcultivo C.

Número de brotes por explante: Se contabilizó el número de plántulas obtenidas de cada frasco tras la realización de cada subcultivo (Figura 2.18).

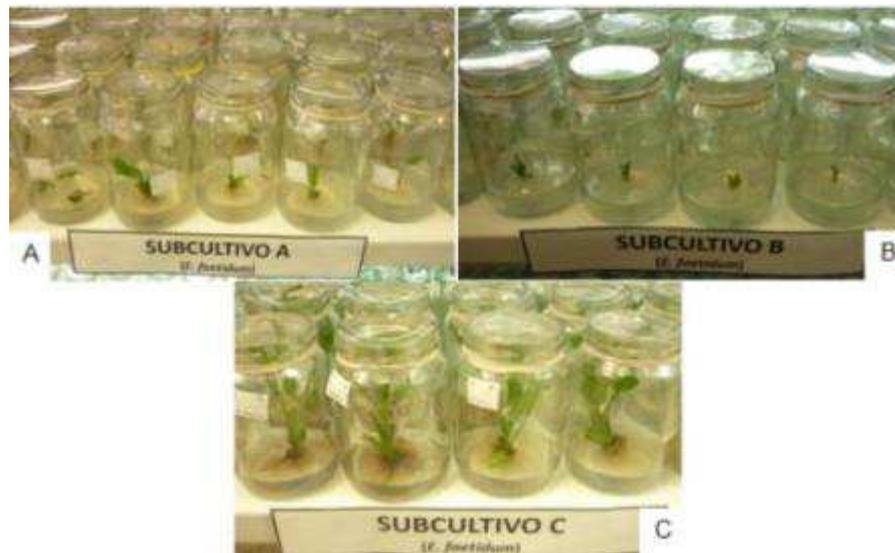


Figura 2.18 Incubación de los subcultivos. A) Subcultivo A, plántulas a los 10 días. B) Subcultivo B, plántulas a los 2 días de la siembra. C) Subcultivo C, plántulas a los 30 días de la siembra, previa su inoculación al SIT.

Longitud del brote: Se evaluó la longitud de los brotes originados a partir de cada explante 30 días de la siembra de las plántulas de cilantro cimarrón. La medición fue tabulada en centímetros (Figura 2.19).

Ancho de las hojas: Los datos fueron tomados con la medición en centímetros de la extensión de la lámina foliar de cada uno de los brotes producidos en cada subcultivo.

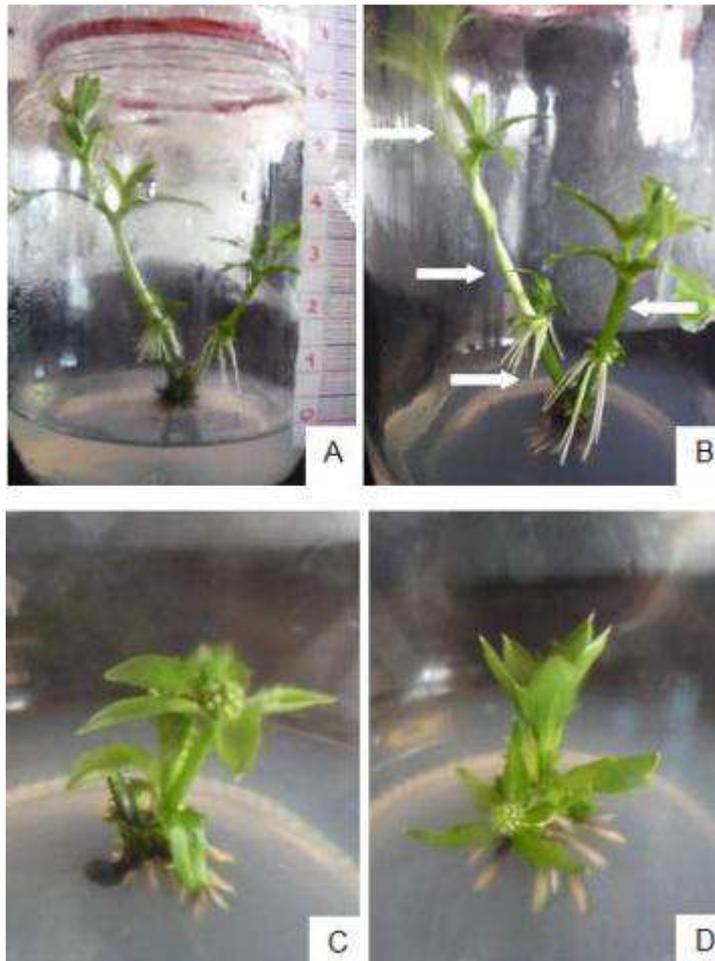


Figura 2.19 Esquema de plántula de *E. foetidum* para la medición de longitud de los brotes previo el subcultivo A) Brotes con presencia de yemas axilares, medición de su longitud. B) Plántula en donde las flechas indican el lugar de corte para el subcultivo. C, D) Plántulas de 2 cm obtenidas tras el corte.

Índice de Multiplicación: El índice de multiplicación corresponde a la razón entre el número de brotes obtenidos, tras el período de incubación, respecto a un explante o plántula (Figura 2.20).

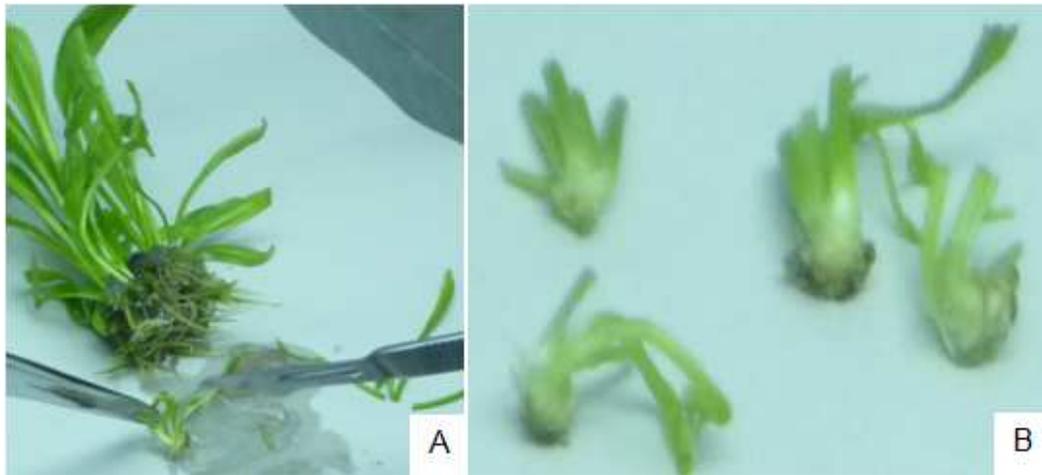


Figura 2.20 A) División de los brotes para su multiplicación en cámaras de flujo laminar. B) Brotes obtenidos en el subcultivo B.

Cada uno de los brotes obtenidos tras la realización de los subcultivos fue tomado como una unidad experimental en la que se evaluaron las variables descritas anteriormente.

El análisis estadístico para la fase de multiplicación convencional se realizó en base a las repeticiones efectuadas en los distintos subcultivos enlistándolos como subcultivos A – C, para los cuales se obtuvo porcentajes en base a las variables analizadas.

2.5.2 Multiplicación masiva en el SIT

2.5.2.1 Prueba de parámetros de control en el SIT: frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo

Inicialmente, para la multiplicación masiva de plántulas de cilantro cimarrón se desarrollaron los ensayos de acuerdo a los tratamientos propuestos en los que se varía factores como frecuencia, tiempo de inmersión, y densidad del inóculo (Tabla 2.6) y las variables evaluadas en esta fase fueron presencia o ausencia de plántulas, índice de multiplicación (tasa de

proliferación), número de brotes por explante, altura de las plántulas obtenidas y ancho de las hojas.

Se aplicará un arreglo factorial de 3x2x2 con los parámetros descritos en la tabla 2.6. Así también los ciclos de inmersión fueron desarrollados con una presión de de 8 psi de aire filtrado y con un volumen de medio de cultivo correspondiente a 500 mL.

2.5.2.1.1 Material vegetal

Para los ensayos en el SIT, se emplearon las plántulas obtenidas del subcultivo C de la fase de multiplicación convencional. Es importante que el tamaño de brote que ingresa al SIT sea uniforme (Escalona, 2005), por lo que para esta etapa se colocaron brotes que cumplan con una longitud de 2 cm previa su inoculación al SIT (Figura 2.21)

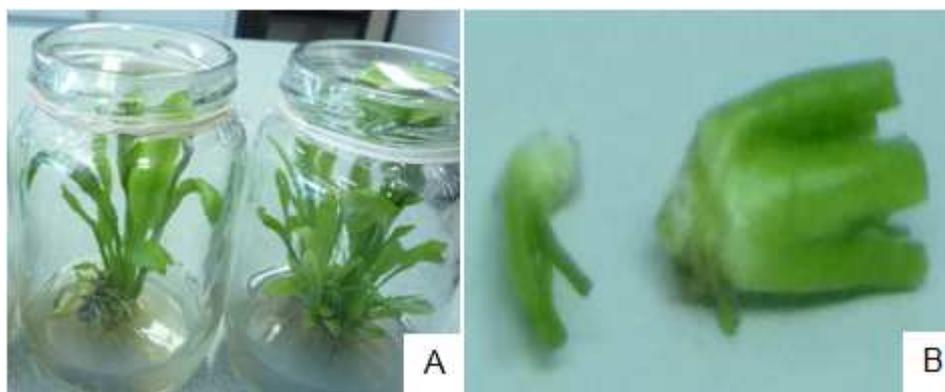


Figura 2.21 A) Plántulas en subcultivo C, previa su introducción al SIT. B) Plántulas de 2 cm de largo para ser inoculadas en el SIT

2.5.2.1.2 Medio de cultivo para la multiplicación

El medio de cultivo para la multiplicación en el SIT fue el empleado en la multiplicación convencional, omitiendo la adición de agar, debido a que el mecanismo de acción del SIT necesita medio líquido. El medio de cultivo consiste de las sales del MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1.5 mgL⁻¹ de BAP (bencilaminopurina), 0.1 mgL⁻¹ ANA (ácido naftalenacético), 5 mgL⁻¹ de Brasinolida, 250 mgL⁻¹ polivinilpirrolidona (PVP), 35 mgL⁻¹ Acido ascórbico y enriquecido con 30gL⁻¹ de azúcar.

Tabla 2.6 Tratamientos para la multiplicación de *E. foetidum* en el SIT

Tratamiento	Tiempo (min)	Frecuencia (horas)	Densidad del inóculo (No. explantes por SIT)
1	1	4	3
2	1	4	6
3	1	6	3
4	1	6	6
5	2	4	3
6	2	4	6
7	2	6	3
8	2	6	6
9	3	4	3
10	3	4	6
11	3	6	3
12	3	6	6

Se ensayaron dos repeticiones de cada tratamiento, teniendo como unidad experimental un SIT, que consistió en dos recipientes interconectados por tubos de silicona; en el que el primero fue usado para el almacenamiento del medio y el otro para el cultivo de los explantes. Las evaluaciones se realizaron al final de cada subcultivo. Las variables evaluadas tras cada ciclo en el SIT fueron:

Número de brotes por explante: Tras el día 30 del ciclo en el SIT, se contabilizó el número de brotes del explante en cada unidad experimental (Figura 2.22).



Figura 2.22 Plántulas obtenidas tras el ciclo de inmersión en el SIT.

Altura de las plántulas: Se evaluó la longitud de las plántulas originadas a partir del brote inicial posterior a los 30 días del subcultivo. La medición se tabuló en centímetros (Figura 2.23) y se realizó una categorización de acuerdo a niveles de altura de las plántulas formadas, la cual se muestra en el capítulo de resultados en el apartado correspondiente.



Figura 2.23 Medición de la altura de las plántulas.

Ancho de la hoja: Se evaluó esta variable con la medición de la extensión de lámina foliar en centímetros y se realizó una categorización correspondiente al ancho.



Figura 2.24 Medición del ancho de hojas de las plántulas provenientes del SIT

Índice de Multiplicación: El índice de multiplicación corresponde a la razón entre el número de plántulas obtenidas, tras el período de incubación en el SIT, respecto a la densidad del inóculo inicial.

2.5.2.2 Prueba de medios de cultivo para multiplicación en el SIT

Tras la realización de los ensayos en los tratamientos presentados en la Tabla 2.6 se determinó un índice de proliferación similar al de la multiplicación convencional, lo que no corresponde a lo citado en diferentes bibliografías para sistemas de inmersión temporal, por ello se efectuó un nuevo ensayo con una concentración mayor de reguladores de crecimiento, específicamente de la citoquinina BAP (bencilaminopurina) con la finalidad de obtener una mayor cantidad de brotes por explante en cada unidad experimental o SIT. Dichos ensayos fueron realizados empleando la programación del SIT en el mejor tiempo, frecuencia de inmersión y densidad del inóculo previamente determinado en la prueba de parámetros de control del SIT: (tiempo = 2 min; frecuencia = 4 h; densidad del inóculo = 3 explantes).

Los tratamientos ensayados corresponden a medios de cultivo para los que se aplica un arreglo factorial de 2x2 +1 tratamiento control descritos en la tabla 2.7:

Tabla 2.7 Medios de cultivo ensayados para una mayor proliferación de brotes

Tratamiento	BAP (mgL ⁻¹)	ANA (mgL ⁻¹)	Brasínolida (mgL ⁻¹)
1	0	0	5
2	1	0.1	5
3	2	0.1	5
4	2.5	0.1	5
5	3	0.1	5

Cada medio de cultivo contiene las sales del MS (1962) suplementado con las diferentes concentraciones de BAP, 0 y 0.1 mgL⁻¹ de ANA, 5 mgL⁻¹ de BRA, 250 mgL⁻¹ PVP, 35 mgL⁻¹ Acido ascórbico y enriquecido con 30gL⁻¹ de azúcar. Efectuado el ensayo se evaluaron las variables ya mencionadas.



Figura 2.25 Plántulas de *E. foetidum* tras la multiplicación en el SIT. A,B) Proliferación de brotes. C) Presencia de abundante raíz tras ciclo en el SIT.

Las variables analizadas para la prueba de medios en el SIT fueron las mismas detalladas anteriormente, con lo que se permitió comparar los resultados obtenidos en el SIT previa la optimización del medio de cultivo del medio líquido para la propagación de un mayor número de propágulos de *E. foetidum*. Los resultados fueron analizados mediante pruebas de chi – cuadrado y ANOVAs según el tipo de variable y se realizaron comparaciones múltiples de medias mediante el método de LSD Fisher. Los datos estadísticos se reflejarán en cuadros de comparación de los diferentes tratamientos.

2.6 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en la presente investigación se empleó el programa InfoStat/Estudiantil versión 2011e. En el capítulo siguiente se indican las pruebas estadísticas efectuadas para las diferentes variables evaluadas en las tres fases del cultivo *in vitro* de cilantro cimarrón. Las pruebas de hipótesis chi – cuadrado de independencia que fueron realizadas para el análisis de las variables dicotómicas emplean un nivel de significación $\alpha=5\%$ elaboradas sobre las tablas de contingencia generadas a partir de los datos evaluados en cada etapa. Se considera el rechazo de la hipótesis nula de la prueba chi – cuadrado al obtener valores mayores al nivel de significación ($p>0.05$); mientras que se acepta una alta significancia estadística al obtener valores de $p<0.05$.

Por otro lado, para el análisis de las variables cuantitativas, para las que se necesita conocer su dependencia respecto a los factores ensayados, se efectuaron análisis de varianza (ANOVA). Esta prueba se basa en la relación entre medias poblacionales por lo que permite poner a prueba la hipótesis de igualdad de medias. Es así que si las medias poblacionales son iguales se muestra un mismo grado de variación; por el contrario, si existe diferencia entre las medias poblacionales, se mostrará mayor grado de variación. En la presente investigación se empleó un nivel de confianza del 95%, por lo que si

el valor de p encontrado es menor al 5%, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos; mientras que si para el dominio estudiado se encuentran valores mayores al 5% se denota una igualdad de medias. Únicamente para el primer caso ($p < 0.05$), se continuará con el análisis estadístico de LSD Fisher que categoriza los valores de medias obtenidos en el ANOVA en diferentes grupos estadísticos que permiten comparar y encontrar los mejores los tratamientos ensayados.

CAPITULO 3: RESULTADOS

3.1 Etapa de Desinfección

En la etapa de desinfección se evaluaron variables como: contaminación, oxidación y viabilidad para los diferentes explantes de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*): hojas, segmentos nodales y yemas; mediante la aplicación de tratamientos con hipoclorito de sodio en diferentes tiempos de inmersión.

Para la desinfección del material vegetal se emplearon seis diferentes tratamientos en tres concentraciones de cloro comercial en dos tiempos de inmersión, y los datos fueron evaluados a los 30 días de la siembra de los explantes en el medio de cultivo de establecimiento.

3.1.1 Contaminación

3.1.1.1 Hojas

Para la desinfección de hojas de *Eryngium foetidum*, los tratamientos empleados corresponden a los descritos en la tabla 2.3 del capítulo anterior.

Para la variable contaminación, se realizaron pruebas chi-cuadrado en base a la frecuencia de explantes contaminados y no contaminados para cada tratamiento. Se realizaron análisis tanto para los tratamientos como para cada uno de los factores: cloro y tiempo de inmersión. La prueba chi – cuadrado para los tratamientos de desinfección para hojas resultó con un valor $p = 0.306$ (Tabla 3.1) por lo que no existe suficiente evidencia estadística de la inferencia de los tratamientos en el porcentaje de contaminación de hojas.

Tabla 3.1 Prueba chi – cuadrado para los tratamientos de desinfección en hojas

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	6	5	0.3062
Chi Cuadrado MV-G2	7.6	5	0.1799

La tabla 3.2 exhibe los porcentajes de contaminación obtenidos mediante un análisis de contingencia de los tratamientos de desinfección de hojas y la contaminación transcurridos 30 días después de la siembra. Se obtuvo un 83.3% de descontaminación en todos los tratamientos de desinfección mientras que un 16.7% de explantes presentaron contaminación.

Tabla 3.2 Tabla de contingencia para contaminación respecto a los tratamientos de desinfección

Tratamientos	No contaminado	Contaminado	% Total
1	100	0	100
2	75	25	100
3	83.3	16.7	100
4	66.7	33.3	100
5	91.7	8.3	100
6	83.3	16.7	100
% Total	83.3	16.7	100

La figura 3.1 presenta los porcentajes de explantes contaminados y no contaminados en cada uno de los tratamientos de desinfección aplicados, dentro de los cuales el tratamiento 1 presenta el mayor porcentaje de descontaminación (100%) mientras que el tratamiento 4 exhibe el mayor porcentaje de explantes contaminados, siendo este del 33.3%.

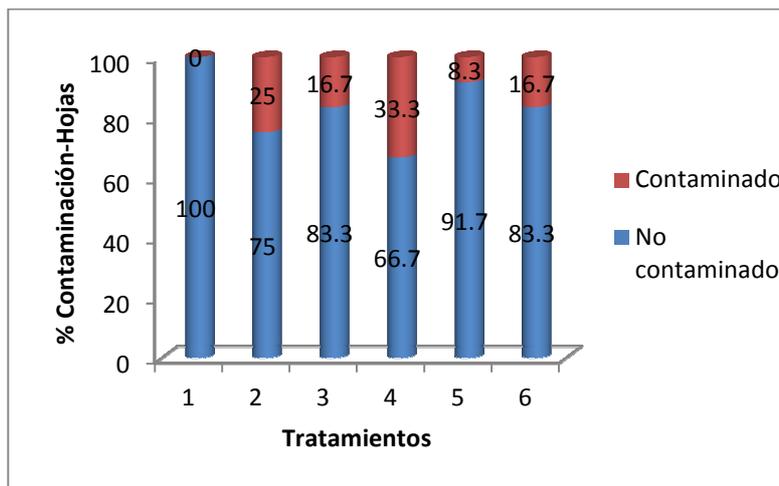


Figura 3.1 Porcentaje de contaminación para hojas respecto a los tratamientos de desinfección.

Se efectuaron pruebas de chi – cuadrado para la relación concentración de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión frente a la contaminación. Para el primer factor, se obtuvo un valor ($p = 0.406$) (Anexo A.1.1) que indica falta de diferencias significativas entre los tratamientos pese a existir una buena descontaminación en cada uno de los ensayos efectuados, la prueba fue realizada en base a la tabla de contingencia anexo A.1.2. Así también, la figura del anexo A.1.3 muestra un 87.5% de descontaminación al aplicar concentraciones de NaClO de 0.4 y 0.6%, mientras que para el 0.5% se obtiene un 75% de descontaminación de hojas. Por otro lado, para los tiempos de inmersión ensayados, se obtuvo un valor de $p = 0.057$ ligeramente menor al nivel de significancia, lo que sugiere la inexistencia de suficiente evidencia muestral para la dependencia de los tiempos de inmersión experimentados y la contaminación de hojas (Anexo A.1.4), basándose en la tabla de contingencia (Anexo A.1.5). Asimismo, el anexo A.1.6 exhibe el porcentaje de contaminados y no contaminados para los diferentes tiempos de inmersión experimentados. Es así que para una inmersión de 6 min un 91.7% de los explantes resultaron no contaminados mientras que para una inmersión de 8 min el porcentaje fue del 75% de hojas.

3.1.1.2 Segmentos nodales

Para la desinfección de segmentos nodales y yemas de *Eryngium foetidum*, los tratamientos empleados corresponden a tres concentraciones de NaClO (0.7%, 0.8%, 0.9%), en tiempos de inmersión (8 y 10 min) cada uno (Tabla 2.4). Al igual que para hojas, para yemas y segmentos nodales, se efectuaron pruebas de chi – cuadrado para la contaminación de los explantes en cuanto los tratamientos empleados y para los factores por separado.

En base al análisis de contingencia efectuado para la relación de los tratamientos de desinfección aplicados sobre segmentos nodales y la contaminación producida, se obtuvo un valor de p de 0.0193 (Tabla 3.3) lo que indica diferencia estadística significativa entre los tratamientos empleados sobre estos explantes. La figura 3.2 en base a la tabla de contingencia 3.4 muestra una descontaminación del 100% para los tratamiento 1 y 3, mientras que el menor porcentaje de descontaminación se da en el tratamiento 4 con el 50% de los segmentos nodales ensayados.

Tabla 3.3 Prueba de chi – cuadrado para los tratamientos de desinfección en segmentos nodales

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	13.48	5	0.0193
Chi Cuadrado MV-G2	16.49	5	0.0056

Para cada uno de los factores se realizaron las pruebas chi – cuadrado; se obtuvo un valor $p = 0.537$ (Tabla A.1.7) al analizar la contaminación de segmentos nodales respecto a la concentración de NaClO, lo que indica la inexistencia de suficiente evidencia muestral que permita el rechazo de la independencia entre tratamientos por lo que la contaminación no depende de la concentración de NaClO en los explantes ensayados.

Tabla 3.4 Tabla de contingencia para los tratamientos de desinfección de segmentos nodales

Tratamientos	No contaminado	Contaminado	% Total
1	100	0	100
2	75	25	100
3	100	0	100
4	50	50	100
5	75	25	100
6	83.3	16.7	100
% Total	80.6	19.4	100

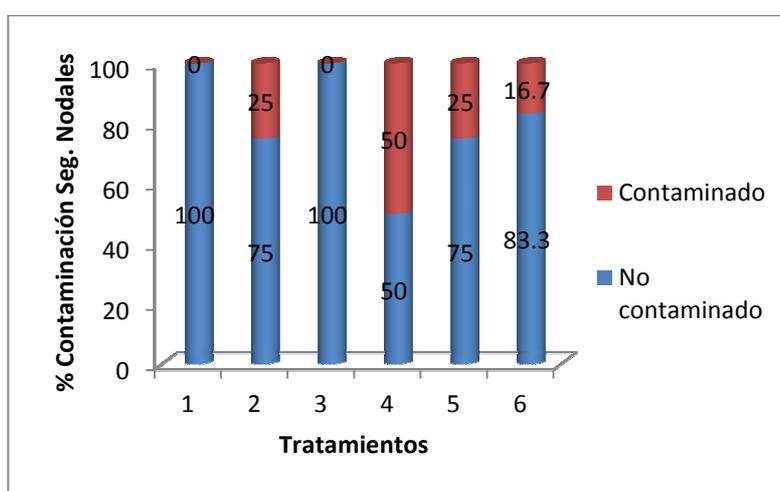


Figura 3.2 Porcentaje de contaminación para segmentos nodales al aplicar los tratamientos de desinfección.

Las tablas de contingencia para la concentración de NaClO y tiempo de inmersión se presentan en el anexo A.1.8 y A.1.10 respectivamente. La figura A.1.9 del anexo muestra el mayor porcentaje de descontaminación (87.5%) al ensayar una concentración de 0.7% mientras que para una concentración de 0.8% se encuentra un 75% de explantes no contaminados.

Al analizar el tiempo de inmersión sobre la contaminación de segmentos nodales, se encontró un valor de 0.017 (Tabla 3.5) indicando la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los tiempos de inmersión ensayados

sobre este tipo de explante; por lo que el porcentaje de contaminación se encuentra directamente relacionado con la inmersión en cloro experimentada. En la figura 3.3, se observan los porcentajes de explantes contaminados y no contaminados respecto a los dos tiempos de inmersión; es así que para una inmersión de 8 min se encuentra un alto porcentaje de descontaminación (91.7%), mientras que para inmersiones de 10 min el porcentaje disminuye a 69.4% de los segmentos nodales.

Tabla 3.5 Prueba chi – cuadrado para el tiempo de inmersión en segmentos nodales

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	5.67	1	0.0172
Chi Cuadrado MV-G2	5.97	1	0.0146

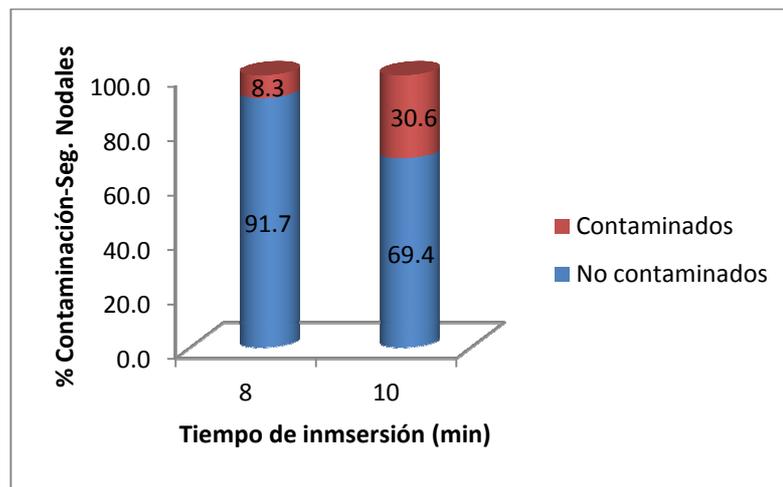


Figura 3.3 Porcentaje de contaminación respecto a tiempo de inmersión en segmentos nodales

3.1.1.3 Yemas

Se realizaron análisis de contingencia para la inferencia de los tratamientos de desinfección aplicados y los porcentajes de contaminación obtenidos. Se efectuó la prueba chi – cuadrado (Tabla 3.5), en base a la tabla de contingencia 3.7, obteniéndose un valor $p = 0.897$, lo que se denota que no existe suficiente evidencia muestral que indique el rechazo de la independencia

por ello los tratamientos ensayados para yemas no influyen en los porcentajes de contaminación encontrados.

Tabla 3.6 Prueba chi – cuadrado para la desinfección en yemas

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1.63	5	0.8978
Chi Cuadrado MV-G2	1.72	5	0.8867

Tabla 3.7 Tabla de contingencia para la desinfección en yemas

Tratamiento	No contaminado	Contaminado	% Total
1	72.7	27.3	100
2	81.8	18.2	100
3	90.9	9.1	100
4	81.8	18.2	100
5	72.7	27.3	100
6	81.8	18.2	100
% Total	80.3	19.7	100

La figura 3.4 muestra los porcentajes alcanzados para explantes contaminados y no contaminados tras la aplicación de los tratamientos de desinfección. Se observan porcentajes altos de descontaminación, es así que el mayor porcentaje de contaminación se obtuvo únicamente en el 27.3% (tratamientos 1 y 5) de las yemas mientras que en el tratamiento 3 exhibe tan solo un 9.1% de explantes contaminados.

Para la acción de la concentración de NaClO sobre las yemas, se realizó una prueba de chi – cuadrado, en la que se obtuvo un valor de $p = 0.681$ (Anexo A.1.11) por lo que no existe evidencia muestral suficiente para el rechazo de independencia indicando que la contaminación en yemas no depende de la concentración de NaClO aplicada.

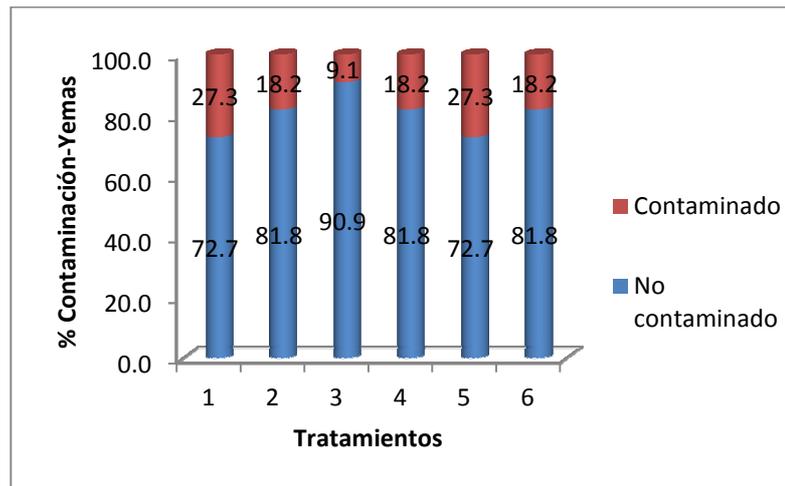


Figura 3.4 Porcentaje de contaminación en los tratamientos de desinfección de yemas

Asimismo, la figura en el anexo A.1.13 exhibe el porcentaje de contaminación respecto a la concentración de cloro, en donde se obtuvo mayor porcentaje de descontaminación al aplicar una concentración de NaClO de 0.8% encontrándose un 86.4% de los explantes no contaminados. La tabla de contingencia se muestra en el anexo A.1.12.

En cuanto al tiempo de inmersión se obtuvo un valor de $p = 0.756$ (Anexo A.1.14) mayor al nivel de significancia por lo que para el dominio estudiado no existe evidencia que permita el rechazo de la hipótesis de independencia de la contaminación respecto a los tiempos de inmersión ensayados; tabla de contingencia (Anexo A.1.15). En la figura A.1.16, el porcentaje de explantes no contaminados en los tiempos de inmersión ensayados son similares siendo de 78.8% y 81.8% de descontaminación para 8 y 10 min de inmersión respectivamente.

3.1.2 Oxidación

En cuanto a esta variable, se realizaron diferentes análisis respecto a los tratamientos de desinfección ensayados para cada uno de los explantes. Se

efectuó una transformación de los datos mediante raíz cuadrada y en base a ello se elaboraron los cuadros de ANOVA que permitan evaluar la oxidación fenólica sobre hojas, segmentos nodales y yemas. A continuación se muestran los resultados para cada uno de los explantes utilizados como material vegetal.

3.1.2.1 Hojas

Se analizó mediante un ANOVA y el método de comparaciones múltiples de Fisher (LSD Fisher) la dependencia o independencia de la oxidación frente a los tratamientos de desinfección sobre hojas de cilantro cimarrón. Se obtuvo un valor de p mayor al 5%, representado en el Tabla 3.8 que indica una independencia estadística entre los tratamientos empleados y la variable oxidación para el caso de hojas como material vegetal.

Tabla 3.8 Análisis de varianza para la oxidación respecto a los tratamientos de desinfección de hojas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ Oxidación	72	0.09	0.02	29.36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.81	5	0.16	1.28	0.2852
Tratamiento	0.81	5	0.16	1.28	0.2852
Error	8.36	66	0.13		
Total	9.17	71			

De acuerdo al valor de p exhibido en la tabla (0.285), se interpreta que los tratamientos no son significativamente diferentes y pertenecen a un mismo grupo estadístico, por lo que existe gran similitud de las medias de los tratamientos para la oxidación (Figura 3.10)

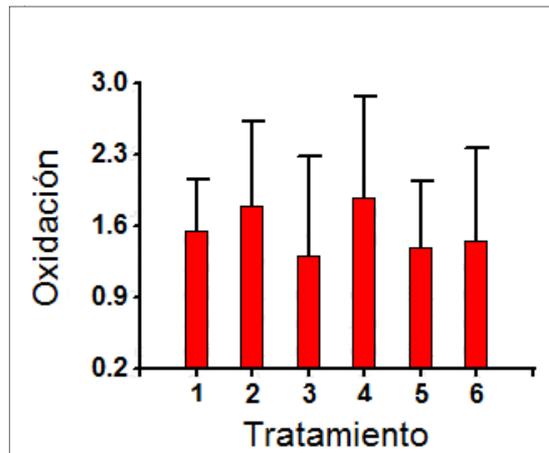


Figura 3.5 Medias y desviación estándar para la oxidación en los tratamientos de desinfección de hojas

En base a la tabla de contingencia del anexo A.2.1, se presentan los porcentajes de explantes en los diferentes niveles de oxidación respecto a los tratamientos de desinfección, es decir a la interacción de los factores concentración de NaClO versus tiempo de inmersión (Figura 3.6). El tratamiento 3 presenta el 16.3% de explantes sin oxidación (nivel 0), mientras que en el tratamiento 4 se observan el 41.7% de las hojas con mayor oxidación (nivel 3). Los tratamientos del 1 al 6 presentan el mayor porcentaje de los explantes en el nivel de oxidación 1 correspondiente al 33% de la superficie del explante oxidado.

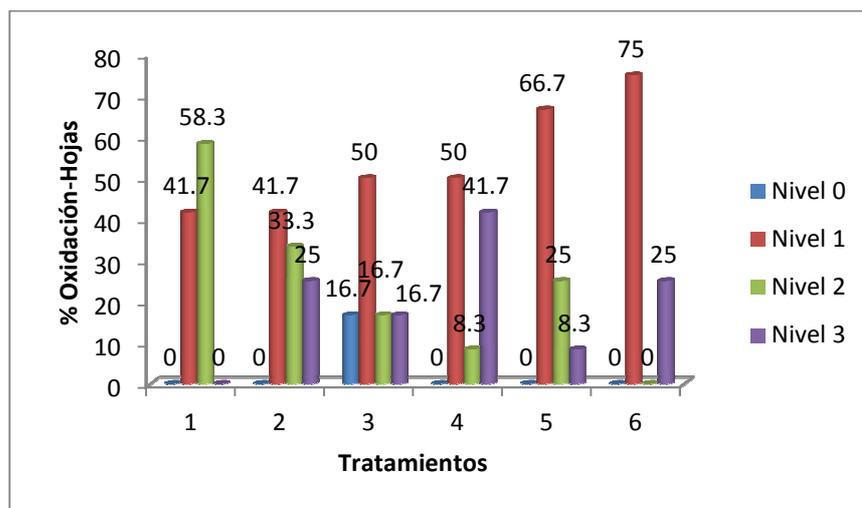


Figura 3.6 Porcentajes de oxidación de hojas en diferentes niveles respecto a los tratamientos de desinfección

Por otro lado, el análisis mediante ANOVA de los factores por separado exhiben, para el caso de concentración de NaClO un valor de $p = 0.520$ mayor al nivel de significación, por lo que para el dominio estudiado, no existe suficiente evidencia muestral que indique un rechazo de la independencia (Anexo A.2.2), siendo el porcentaje de oxidación independiente de la concentración de cloro. De igual forma, la gráfica de porcentajes para esta variable respecto a la concentración de NaClO, indica los más altos porcentajes oxidación en una concentración de 0.5% de NaClO con el 29.2% de explantes en el nivel 3 de la escala. Mientras que, de forma general, en las concentraciones ensayadas se muestran explantes con oxidación en el nivel 1 de la escala. (Figura A.2.3).

Alternativamente, el análisis del tiempo de inmersión expresa un valor de $p = 0.104$ (Anexo A.2.4) por lo que no se indica la evidencia muestral necesaria para el rechazo de la independencia, de allí que el tiempo de inmersión no influye directamente el porcentaje de contaminación encontrada. La gráfica de porcentajes para esta variable en relación a la inmersión en minutos, exhibe como mayor porcentaje al nivel 1 de oxidación (Anexo A.2.5).

3.1.2.2 Segmentos nodales

Al igual que para hojas, se analizó para segmentos nodales la dependencia o independencia de la oxidación frente a la concentración de NaClO y tiempo de inmersión mediante un ANOVA. Se obtuvo un valor de p mayor al 5%, representado en el Tabla 3.9, lo que denota independencia estadística entre los tratamientos empleados y la variable oxidación. Se elaboró una tabla de contingencia (Anexo A.2.6) y en base a ésta, la figura 3.7, en la que la oxidación para los tratamientos de desinfección en segmentos nodales se encuentra en mayor porcentaje en el nivel 1, es así que únicamente para el tratamiento 5, se encuentran el 8.3% de segmentos nodales sin oxidación, mientras que para el tratamiento 2 y 4 el 41.7% de los explantes presentan oxidación en el nivel 3.

Tabla 3.9 Análisis de varianza para la oxidación de segmentos nodales en función de los tratamientos de desinfección

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ Oxidación	72	0.06	0.00	29.89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.54	5	0.11	0.86	0.5150
Tratamiento	0.54	5	0.11	0.86	0.5150
Error	8.36	66	0.13		
Total	8.90	71			

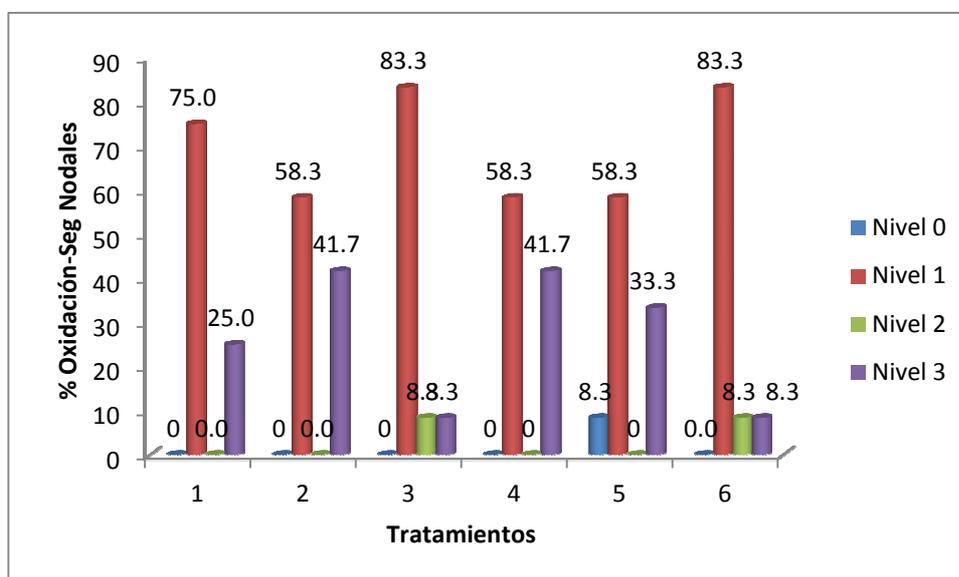


Figura 3.7 Porcentajes de oxidación de segmentos nodales en los diferentes niveles respecto a los tratamientos de desinfección

El análisis de varianza para la incidencia de la concentración de NaClO sobre la oxidación de los explantes muestra un valor de $p = 0.525$ por lo que no existe diferencia significativa de medias entre las concentraciones ensayadas (Anexo A.2.7), y la figura exhibe un alto porcentaje en el nivel 1 de oxidación que para la concentración de 0.8% y 0.9% de NaClO es del 70.8% de los explantes (Anexo A.2.3). Para el ANOVA de la oxidación de segmentos nodales respecto al tiempo de inmersión, se obtuvo un valor de $p = 0.290$ sugiriendo el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias entre los dos

tiempos de inmersión ensayados (Anexo A.2.9). Se realizó también un gráfico de barras para los porcentajes de oxidación obtenidos en los ensayos en los cuales se observa un nivel de oxidación 1 correspondiente al mayor porcentaje, que para 8 min corresponde al 72.2% y para 10 min el 66.7% de los segmentos nodales (Anexo A.2.10)

3.1.2.3 Yemas

Se elaboró un ANOVA para la oxidación de las yemas producida tras la aplicación de los tratamientos de desinfección. El valor de p resultó de 0.141 (Tabla 3.10), lo que indica la falta de evidencia muestral que indique diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos frente a la oxidación de yemas. De acuerdo al valor de p, se interpreta que los tratamientos no son significativamente diferentes y pertenecen a un mismo grupo estadístico, por lo que existe gran similitud de las medias de los tratamientos para la oxidación sobre este tipo de explante (Figura 3.8)

Tabla 3.10 Análisis de varianza para la oxidación de yemas respecto a los tratamientos de desinfección

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ Oxidación	66	0.13	0.05	87.77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.25	5	0.65	1.73	0.1415
Tratamiento	3.25	5	0.65	1.73	0.1415
Error	22.55	60	0.38		
Total	25.80	65			

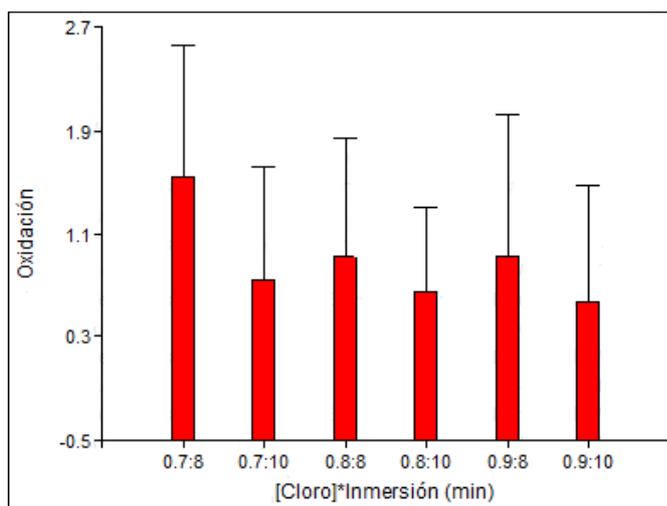


Figura 3.8 Medias y desviación estándar para la oxidación en los tratamientos de desinfección de yemas

En base a la tabla de contingencia del anexo A.2.11, se elaboró la figura 3.9 que indica los porcentajes de explantes en los diferentes niveles de oxidación obtenidos tras la aplicación de los tratamientos de desinfección. El tratamiento 6 exhibe el mayor porcentaje de explantes con menor nivel de oxidación (escala 0) mientras que la mayor oxidación de la escala (nivel 3) se encuentra al ensayar el tratamiento 1 siendo el 27.3% de los explantes 100% oxidados.

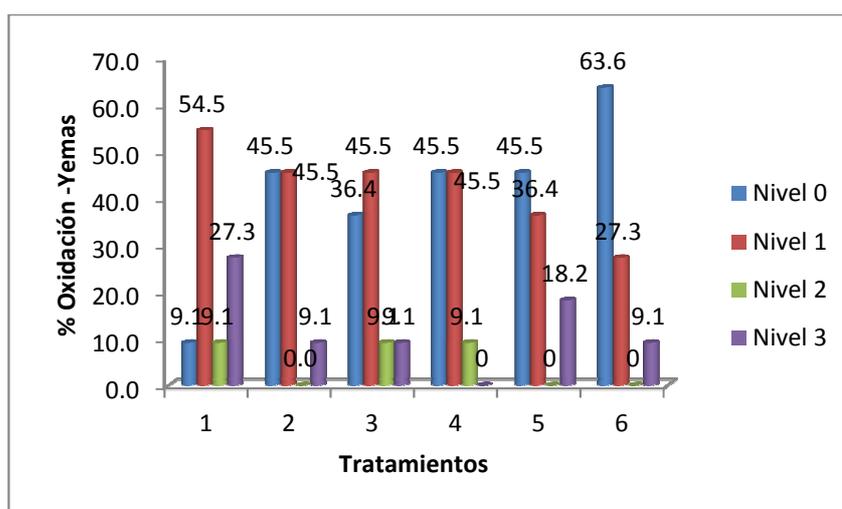


Figura 3.9 Porcentajes de oxidación de yemas en los tratamientos de desinfección

Se realizaron también análisis de varianza (ANOVA) para la relación de cada factor con la variable oxidación. Es así que para la inferencia de la concentración de NaClO se obtuvo un valor $p = 0.221$ (Anexo A.2.12), por lo que dichas concentraciones no influyen directamente en la oxidación de este tipo de explantes. El anexo A.2.13 muestra los porcentajes de oxidación para yemas en los diferentes niveles, en donde la concentración de 0.9% exhibe el mayor porcentaje de explantes sin oxidación (54.5%), mientras que la concentración 0.7% indica que el 18.2% de las yemas ensayadas se oxidaron en el nivel 3 de la escala propuesta.

Para la relación entre el tiempo de inmersión y la oxidación se obtuvo un valor $p = 0.042$ menor al nivel de significación nominal de la prueba $\alpha=5\%$, por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de los tiempos de inmersión ensayados (Tabla 3.11). Respecto a la prueba de LSD Fisher, los tiempos de inmersión se encontraron en dos grupos estadísticos diferentes, para el grupo A una inmersión de 10 min y en el grupo B la inmersión de 8 min. En el anexo A.2.14 se observan los porcentajes de oxidación por niveles para yemas, en donde una inmersión de 8 min presenta un 30.3% de explantes sin oxidación mientras que en 10 min de inmersión de obtuvo un 51.5% de las yemas en el nivel 0 de oxidación fenólica.

Tabla 3.11 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para la oxidación de yemas respecto al tiempo de inmersión

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ Oxidación	66	0.06	0.05	88.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.62	1	1.62	4.29	0.0424
Inmersión (min)	1.62	1	1.62	4.29	0.0424
Error	24.18	64	0.38		
Total	25.80	65			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.30230

Error: 0.3778 gl: 64

Inmersión (min)	Medias	n	E.E.	
10	0.54	33	0.11	A
8	0.86	33	0.11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p <= 0.05$)

3.1.3 Viabilidad

En lo que se refiere esta variable, se realizó una transformación de los datos de mediante raíz cuadrada, y así se elaboraron análisis de varianza para los tratamientos y para cada uno de los factores sobre los tres tipos de explantes: hojas, segmentos nodales y yemas.

3.1.3.1 Hojas

En relación a esta variable para el caso de hojas, el valor de la significancia, respecto a los tratamientos de desinfección, es de 0.080 (Anexo A.3.1), lo que denota que la concentración de cloro y el tiempo de inmersión empleados en los tratamientos de desinfección no influyen estadísticamente en la viabilidad de las hojas. En base a la tabla de contingencia del anexo A.3.2, se realizó la figura 3.10 que exhibe los porcentajes de viabilidad de hojas en los niveles correspondientes a la escala entre explantes viables y no viables. En el tratamiento 4, se obtuvo el mayor porcentaje de hojas en el nivel 5 de viabilidad, es decir necrosadas, siendo este del 38.3% de explantes, mientras que la mayor viabilidad presenta el tratamiento 3 con un bajo porcentaje de hojas viables del 16.7%.

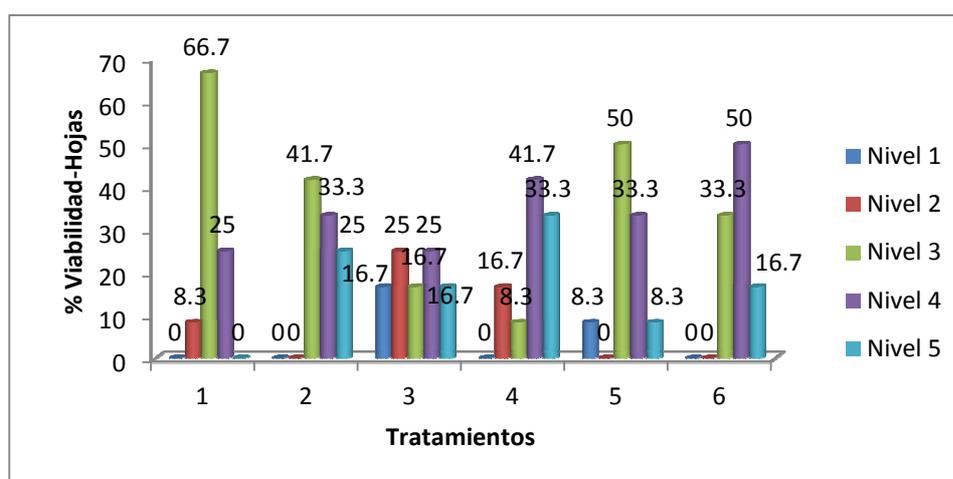


Figura 3.10 Porcentajes de viabilidad de hojas por niveles para cada tratamiento de desinfección

Respecto al análisis de varianza para la relación de la concentración de NaClO y la viabilidad de hojas, se obtuvo un valor de $p = 0.794$, por lo que las concentraciones ensayadas no infieren estadísticamente sobre la viabilidad de este tipo de explantes (Anexo A.3.3). Los porcentajes respecto al NaClO, expresan diferentes valores en los niveles de viabilidad, entre los que la concentración 0.4% presenta como el mayor porcentaje al 54.2% de explantes en el nivel 3 de oxidación, para la concentración 0.5% se encuentra una viabilidad en la escala de 1 del 8.3% de explantes mientras que la concentración 0.6% presenta el 41.7% de explantes en los niveles 3 y 4 de viabilidad (Anexo A.3.4). En cuanto al ANOVA para la influencia del tiempo de inmersión sobre la viabilidad de hojas, se obtuvo un $p = 0.002$, por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias para los dos tiempos de inmersión ensayados; encontrándose en la prueba de LSD Fisher, dos grupos estadísticos, el A que corresponde a una inmersión de 6 min mientras que 8 min corresponde al grupo B, por lo tanto existe evidencia estadística significativa entre los tiempos de inmersión respecto a la viabilidad de hojas.(Tabla 3.12). El porcentaje de viabilidad 1 en hojas corresponde al 8.3% de explantes, en un tiempo de 8 min mientras que en 10 min no existen explantes viables en esta escala (Figura 3.11).

Tabla 3.12 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para la viabilidad de hojas respecto al tiempo de inmersión

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ Viabilidad	72	0.12	0.11	14.86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.72	1	0.72	9.50	0.0029
Inmersión (min)	0.72	1	0.72	9.50	0.0029
Error	5.30	70	0.08		
Total	6.02	71			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.12936

Error: 0.0757 gl: 70

Inmersión (min)	Medias	n	E.E.	
6	1.75	36	0.05	A
8	1.95	36	0.05	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

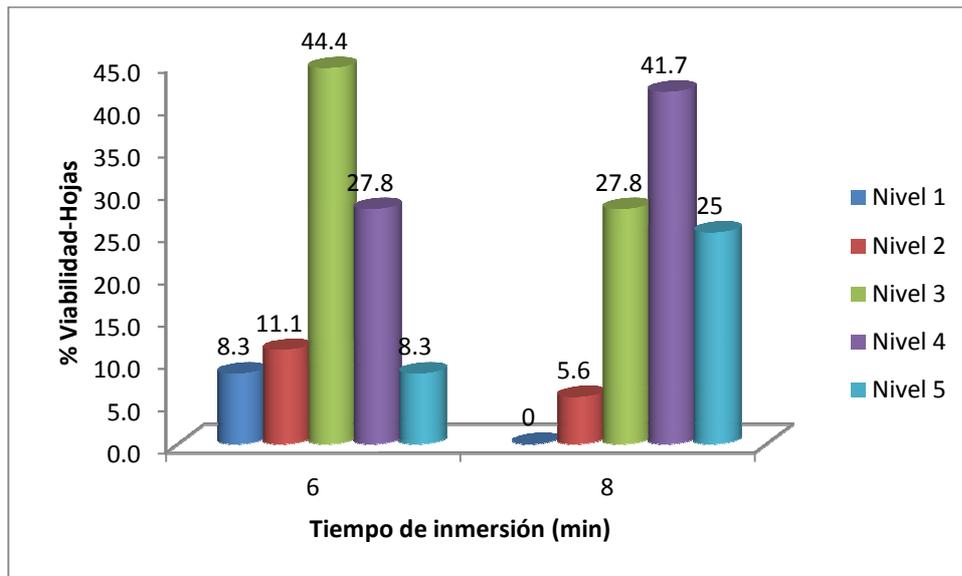


Figura 3.11 Porcentajes de viabilidad de hojas en diferentes niveles respecto al tiempo de inmersión

3.1.3.2 Segmentos nodales

Respecto a la viabilidad de los segmentos nodales, se realizó un análisis de varianza para la evaluación de los diferentes tratamientos de desinfección respecto a la escala de viabilidad propuesta en la metodología. Se obtuvo un valor de $p = 0.457$ lo que implica que los tratamientos empleados no son estadísticamente diferentes (Tabla 3.13).

Tabla 3.13 Análisis de varianza para la viabilidad de segmentos nodales respecto a los tratamientos de desinfección

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ Viabilidad	72	0.07	0.00	20.40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.62	5	0.12	0.94	0.4583
Tratamiento	0.62	5	0.12	0.94	0.4583
Error	8.72	66	0.13		
Total	9.35	71			

En base a la tabla de contingencia (Anexo A.3.5), se efectuó la gráfica de porcentajes de viabilidad de este tipo de explantes respecto a los tratamientos de desinfección. Se obtuvieron porcentajes de viabilidad para el tratamiento 1 en el nivel 3 el 75% de los explantes, el 41.7% para nivel de oxidación 3 y 5 en el tratamiento 2 y en el tratamiento 3 el mismo porcentaje para el nivel 2 y 4, mientras que para el tratamiento 5 el 41.7% de segmentos nodales presentaron viabilidad en el nivel 5 y en el tratamiento 6 el 33.3% viabilidad en los niveles 2 y 3 (Figura 3.12)

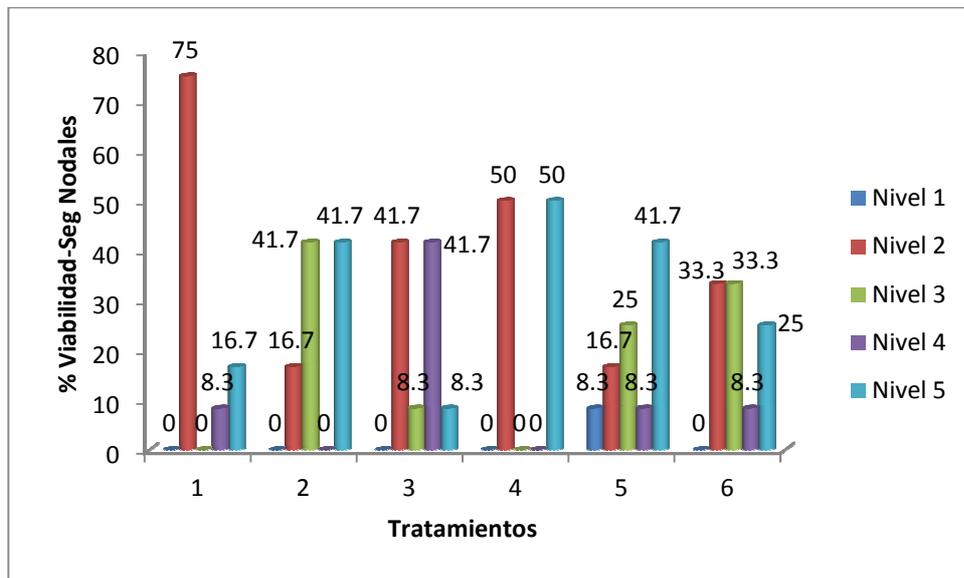


Figura 3.12 Porcentaje de viabilidad de segmentos nodales para cada tratamiento de desinfección

Los análisis de varianza efectuados para cada factor exhibieron valores de $p = 0.809$ (Anexo A.3.6) y $p = 0.269$ (Anexo A.3.8) para la concentración de NaClO y tiempo de inmersión respectivamente. Para los dos casos, los valores encontrados resultan mayores al nivel de significación nominal de la prueba $\alpha = 5\%$, por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de medias entre las concentraciones de NaClO y tiempos de inmersión ensayados.

Para graficar los porcentajes de viabilidad de segmentos nodales respecto a los factores analizados se realizaron tablas de contingencia. Para la

concentración de NaClO, los mayores porcentajes se obtuvieron en el nivel 2 de viabilidad siendo del 45.8% para las concentraciones 0.7% y 0.8%, mientras que para la concentración de 0.9%, en el nivel 5 de viabilidad se encuentra el 33.3% de segmentos nodales (Anexo A.3.7). Por otro lado, para los tiempos de inmersión ensayados, el 44.4% de los explantes presentan viabilidad 2 y el 38.9% de explantes se ubican en el nivel de viabilidad 5 (Anexo A.3.8).

3.1.3.3 Yemas

Respecto a las yemas, se analizó mediante un ANOVA la viabilidad de estos explantes sometidos a diferentes tratamientos de desinfección planteados en la metodología. Se exhibe un valor de p de 0.856, lo que indica que no existe dependencia estadística de esta variable a los tratamientos aplicados, luego de la evaluación a los 30 días de la siembra (Tabla 3.14).

Tabla 3.14 Análisis de varianza para la viabilidad de yemas respecto a los tratamientos de desinfección

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RAIZ Viabilidad	66	0.04	0.00	32.76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.62	5	0.12	0.46	0.8044
Tratamiento	0.62	5	0.12	0.46	0.8044
Error	16.21	60	0.27		
Total	16.83	65			

En la Figura 3.13 realizada en base al anexo A.3.5, se puede observar los porcentajes de viabilidad para los tratamientos de desinfección. Se observan mayores porcentajes de viabilidad en el nivel 1, siendo este porcentaje entre 18% en el tratamiento 1 hasta un 45% de los explantes en los tratamientos 2 y 6.

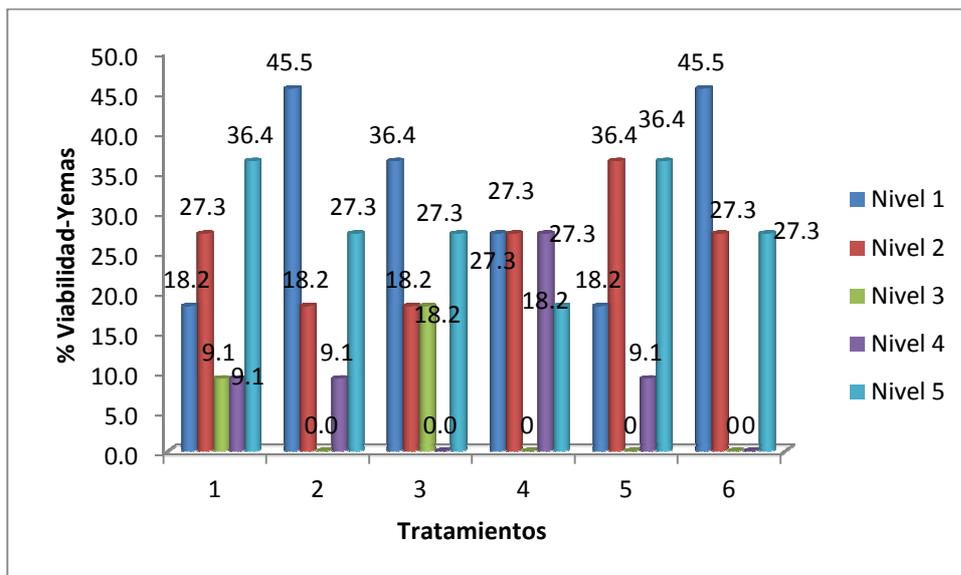


Figura 3.13 Porcentaje de viabilidad de yemas respecto a los tratamientos de desinfección

Para el análisis de varianza realizado para cada factor, se obtuvo un valor de $p = 0.961$ para la relación de NaClO y la viabilidad de yemas (Anexo A.3.6). Mientras que para la inferencia del tiempo de inmersión sobre esta variables, se encontró un valor de $p = 0.299$ (Anexo A.3.8), por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias para los factores ensayados, además de no existir evidencia estadística significativa para una diferencia de las concentraciones de NaClO y tiempos de inmersión. Se obtuvieron los mayores porcentajes de viabilidad, para la concentraciones 0.9%. (Figura A.3.7). Mientras que respecto a los tiempos de inmersión, el 39.4% de yemas resultaron en un nivel de viabilidad 1 (Figura A.3.9).

La figura 3.14 presenta de forma resumida las variables evaluadas para hojas en la fase de desinfección, en donde se evidencia que el tratamiento 1 corresponde al mejor tratamiento de desinfección para hojas ya que exhibe 0% de explantes contaminados, oxidados y muertos; sin embargo en los ensayos realizados transcurridos los 30 días después de la siembra y una vez realizada la evaluación no se obtuvo respuesta a la organogénesis directa de este tipo de explante.

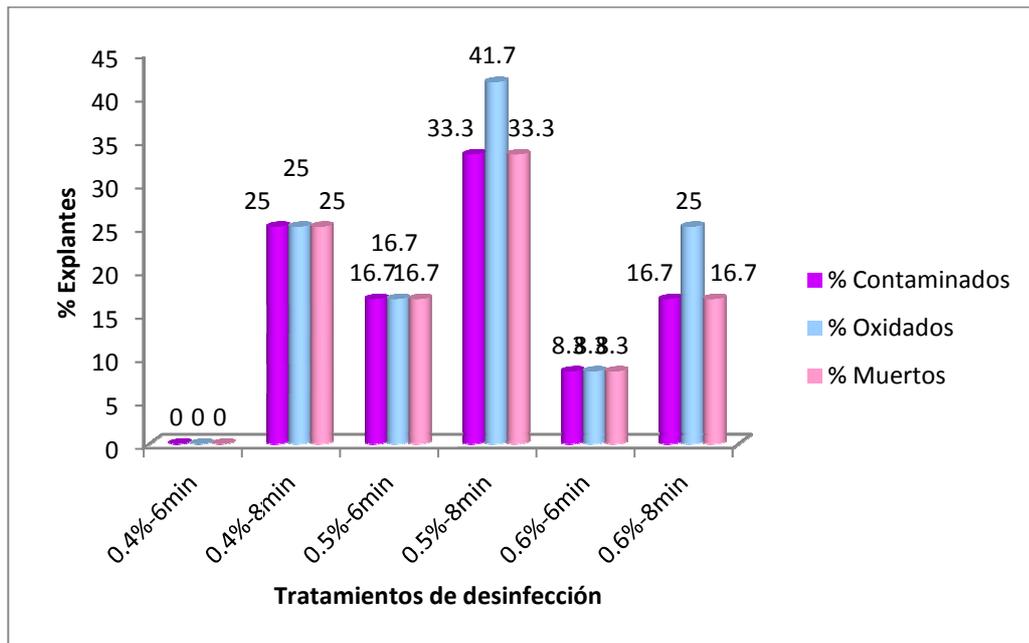


Figura 3.14 Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad de hojas respecto a los tratamientos de desinfección

Para segmentos nodales, la figura 3.15 muestra las variables evaluadas, en donde se obtiene que para el tratamiento 3 se obtuvieron los menores porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad. Finalmente, la figura 3.16 resume los porcentajes de yemas encontrados al evaluar las variables mencionadas al someterlas a los diferentes tratamientos de desinfección, obteniéndose que el tratamiento 4 es el que menor número de explantes fueron contaminados, oxidados y muertos en los ensayos realizados, por lo que se escogieron dichos tratamientos y los dos últimos tipos de explantes para continuar con la siguiente fase.

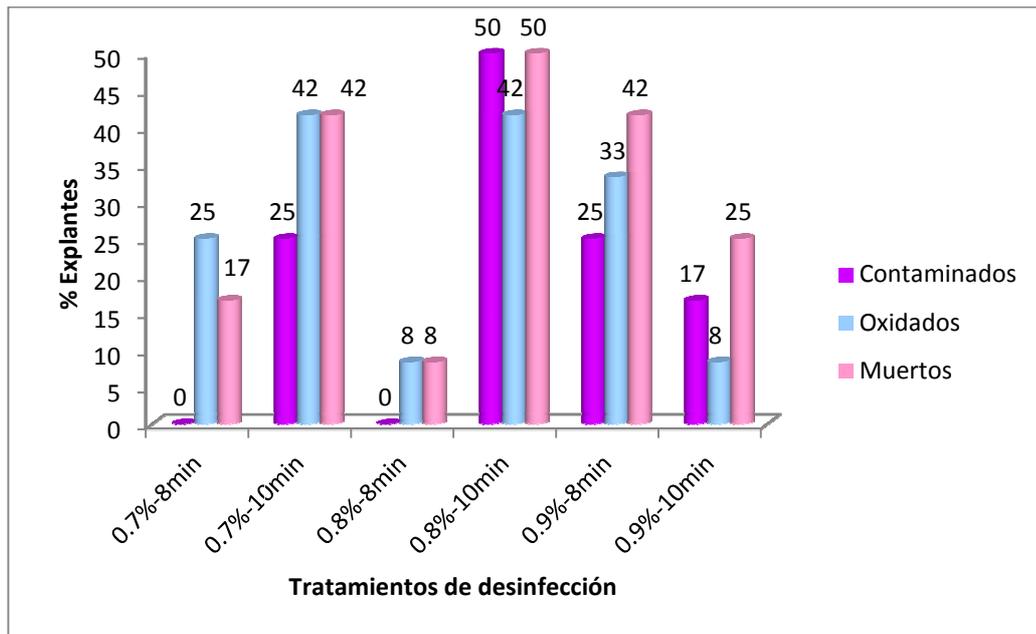


Figura 3.15 Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad de segmentos nodales respecto a los tratamientos de desinfección

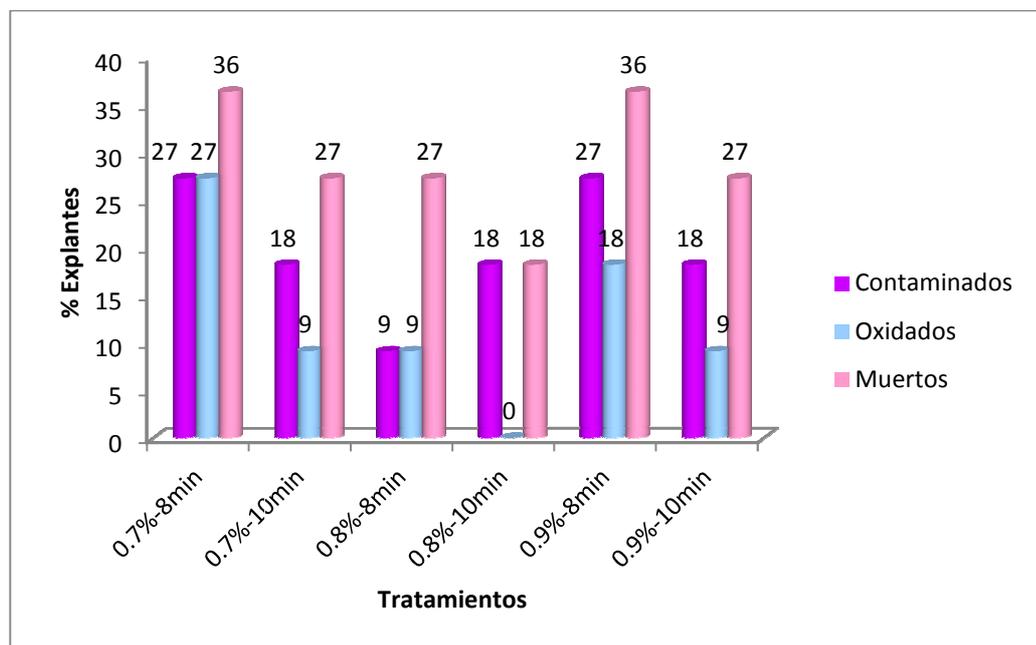


Figura 3.16 Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad de yemas respecto a los tratamientos de desinfección

3.2 Etapa de Inducción

En lo referente a la etapa de inducción, una vez obtenidos explantes desinfectados y viables en la fase anterior, se procedió a introducir el material vegetal en condiciones asépticas procurando reducir al máximo la contaminación exógena. Se utilizó yemas y segmentos nodales, puesto que a partir de hojas no se obtuvo respuesta organogénica como embriogénica.

Se emplearon diez tratamientos para la etapa de inducción, en el que se emplearon varias concentraciones de diferentes reguladores de crecimiento que estimulen la obtención de brotes organogénicos para *E. foetidum* (Tabla 2.5). Las variables evaluadas en esta etapa corresponden a:

3.2.1 Inducción a brote

Por inducción a brotes, se entiende la presencia o ausencia de brotes inducidos mediante organogénesis directa con el uso de diferentes concentraciones de reguladores de crecimientos como bencilaminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA), ensayos que fueron planteados en la metodología. Para la presencia o ausencia de brotes, se realizaron pruebas chi – cuadrado tanto para los tratamientos empleados como para la relación de cada factor sobre la variable, considerando los dos tipos de explantes: segmentos nodales y yemas.

3.2.1.1 Segmentos nodales

Para analizar la relación entre la concentración de los diferentes reguladores de crecimiento empleados y la presencia o ausencia de brotes, se efectuó la prueba de hipótesis chi – cuadrado exhibe un valor de p de 0.256 (Tabla 3.15) que indica la independencia de los tratamientos, por lo tanto la formación de brotes a partir de segmentos nodales, no es dependiente de la

interacción de los reguladores de crecimiento empleados. Dicha prueba se realizó en base a la tabla de contingencia 3.16 que exhibe los porcentajes obtenidos en cada tratamiento ante esta variable. Se obtuvo un 75% de ausencia de brotes organogénicos a partir de segmentos nodales y un 25% de formación de brotes respecto a todos los tratamientos evaluados a los 30 días de la siembra (Tabla 3.16).

Tabla 3.15 Prueba chi – cuadrado para la formación de brote a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	12.44	10	0.2564
Chi Cuadrado MV-G2	11.73	10	0.3033

Tabla 3.16. Tabla de contingencia de la formación de brotes a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción

Tratamiento (mgL-1)		Ausencia	Presencia	% Total
0 BAP, 0 AIA, 0 ANA	0	91.7	8.3	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0 ANA	1	75	25	100
1.5 BAP, 0.1 AIA, 0 ANA	2	75	25	100
1.5 BAP, 0.2 AIA, 0 ANA	3	75	25	100
1 BAP, 0 AIA, 0 ANA	4	75	25	100
1 BAP, 0.1 AIA, 0 ANA	5	83.3	16.7	100
1 BAP, 0.2 AIA, 0 ANA	6	58.3	41.7	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0.1 ANA	7	41.7	58.3	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0.2 ANA	8	83.3	16.7	100
1 BAP, 0 AIA, 0.1 ANA	9	83.3	16.7	100
1 BAP, 0 AIA, 0.2 ANA	10	83.3	16.7	100
% Total		75	25	100

Como se evidencia en la figura 3.17 existe una similitud entre los tratamientos para el porcentaje de ausencia y presencia de brotes por lo que no existe una diferencia estadística significativa. De allí que se destacan altos porcentajes de ausencia de brotes en la mayoría de tratamientos. Sin embargo, el tratamiento 7 presenta el más alto porcentaje de formación de brotes con un 58.3% de los explantes ensayados.

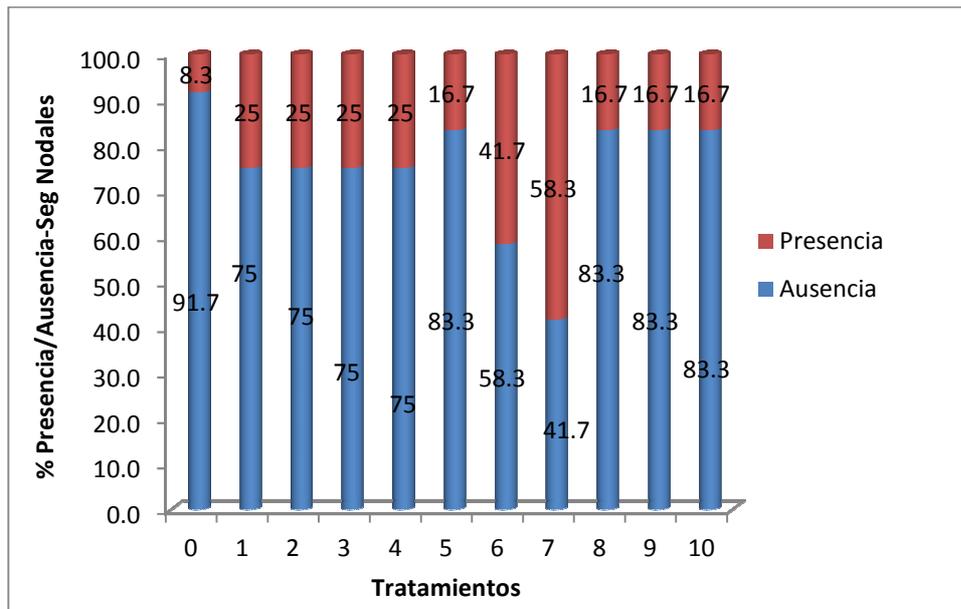


Figura 3.17 Porcentajes de formación de brotes a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción

Para el análisis de la inferencia de cada regulador de crecimiento sobre la inducción a brote, se realizaron tablas de contingencia, en base a las cuales se obtuvieron los valores p para la prueba chi – cuadrado. Es así que para la relación de la hormona BAP con la presencia o ausencia de brotes se obtuvo un valor de $p = 0.263$ que sugiere un rechazo de la independencia, por lo que la generación de brotes no depende de la concentración de BAP aplicada en los tratamientos (Tabla 3.17). Para la concentración de 1.5 mgL^{-1} , se obtuvo un 30% de segmentos nodales que dieron lugar a la generación de brotes, mientras que para la concentración de 0 mgL^{-1} se obtuvo únicamente un 8.3% de formación de brotes (Anexo B.1.1).

Tabla 3.17 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de BAP

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2.67	2	0.2636
Chi Cuadrado MV-G2	3.08	2	0.2148

Además la relación de la variable presencia/ausencia de brotes respecto a las concentraciones de AIA ensayadas reflejó un valor de $p = 0.555$ en la prueba de chi – cuadrado, por lo que la generación de brotes no depende de la concentración de AIA aplicada en los tratamientos (Tabla 3.18). Para una concentración de 0.2 mgL^{-1} , se obtiene un 33.3% siendo este el mayor porcentaje en relación al resto de concentraciones ensayadas (Anexo B.1.2).

Tabla 3.18 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de AIA

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1.17	2	0.5558
Chi Cuadrado MV-G2	1.13	2	0.5685

Finalmente, al analizar la auxina ANA mediante la prueba de chi – cuadrado, se encontró un valor de $p = 0.228$ que denota un rechazo de la independencia. De allí que la generación de brotes no depende de esta auxina (Tabla 3.19). Para una concentración de ANA de 0.1 mgL^{-1} , se obtuvo un 37.5% de segmentos nodales que dieron lugar a la generación de brotes, mientras que para las concentraciones de 0 mgL^{-1} y 0.2 mgL^{-1} se obtuvo un 23.8% y 16.7% de presencia de brotes respectivamente (Anexo B.1.3).

Tabla 3.19 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de ANA

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2.95	2	0.2285
Chi Cuadrado MV-G2	2.86	2	0.2389

3.2.1.2 Yemas

Se elaboró la prueba de hipótesis de chi – cuadrado para el análisis de la relación entre la concentración de los diferentes reguladores de crecimiento

empleados (BAP, AIA y ANA) y la presencia/ ausencia de brotes organogénicos a partir de yemas; cuyo valor ($p=0.0008$) resultó menor al de la prueba $\alpha=5\%$ por lo que existe evidencia estadística que sugiere el rechazo de la independencia de la presencia/ausencia de brotes a los diferentes tratamientos de inducción ensayados (Tabla 3.20).

Tabla 3.20 Prueba chi – cuadrado para la formación de brote a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	30.19	10	0.0008
Chi Cuadrado MV-G2	37.62	10	<0.0001

Como lo muestra la tabla de contingencia 3.21, se obtuvo un porcentaje total de 69.1% de presencia de brotes a partir de yemas y un 30.9% de ausencia al analizar los tratamientos de inducción transcurridos 30 días de la siembra (Tabla 3.21)

Tabla 3.21 Tabla de contingencia de la formación de brotes a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción

Tratamiento (mgL-1)		Ausencia	Presencia	% Total
0 BAP, 0 AIA, 0 ANA	0	46.7	53.3	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0 ANA	1	50	50	100
1.5 BAP, 0.1 AIA, 0 ANA	2	18.2	81.8	100
1.5 BAP, 0.2 AIA, 0 ANA	3	58.3	41.7	100
1 BAP, 0 AIA, 0 ANA	4	14.3	85.7	100
1 BAP, 0.1 AIA, 0 ANA	5	33.3	66.7	100
1 BAP, 0.2 AIA, 0 ANA	6	50	50	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0.1 ANA	7	0	100	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0.2 ANA	8	46.2	53.8	100
1 BAP, 0 AIA, 0.1 ANA	9	26.7	73.3	100
1 BAP, 0 AIA, 0.2 ANA	10	46.2	53.8	100
	% Total	30.9	69.1	100

La figura 3.18 muestra los porcentajes de presencia o ausencia de brotes por tratamientos, es así que entre los tratamientos con mayor generación de brotes están los tratamientos 7 y 4 presentando el 100% y 85.7% respectivamente. Mientras que el que menor porcentaje de formación de brotes presentó es el tratamiento 4 (14.3%).

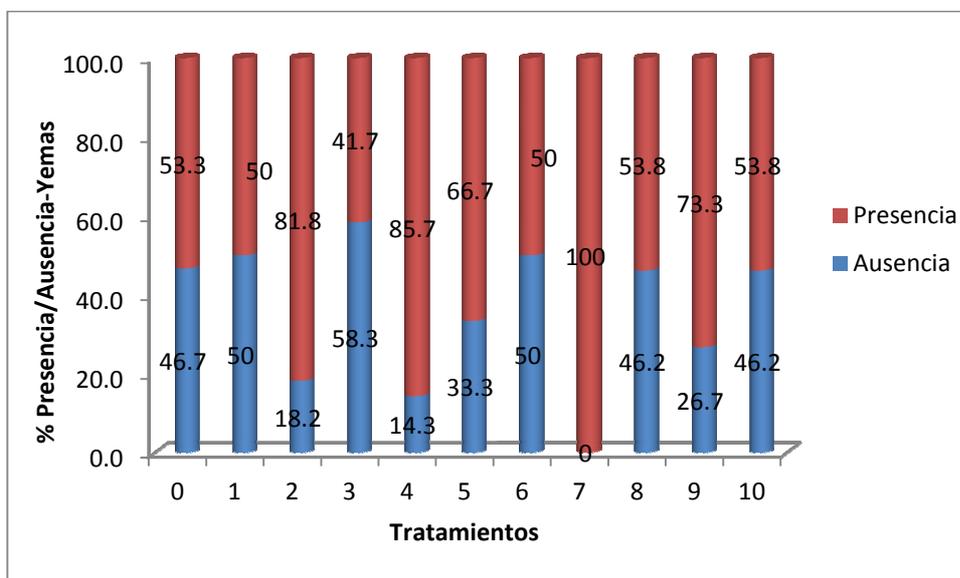


Figura 3.18 Porcentajes de formación de brotes a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción

Al analizar las hormonas de crecimiento individualmente, se encontraron diferentes valores p. En base a la tabla de contingencia para la concentración de BAP sobre la presencia/ausencia de brotes, se obtuvo un valor de $p = 0.311$, por lo que la generación de brotes a partir de yemas no depende de la concentración aplicada en los tratamientos (Tabla 3.22). Para la concentración de 1.5 mgL^{-1} , se obtuvo un 72.2% de yemas que dieron lugar a brotes, mientras que para las concentraciones de 1 mgL^{-1} y 0 mgL^{-1} se obtuvo un 67.9% y 53.3% de formación de brotes respectivamente (Figura B.1.4).

Tabla 3.22 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de BAP

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2.34	2	0.3111
Chi Cuadrado MV-G2	2.23	2	0.3278

Al analizar la relación de la variable respecto a las concentraciones de AIA ensayadas se obtuvo un valor de $p = 0.022$, existiendo evidencia estadística que sugiere el rechazo de la independencia de la presencia/ausencia de brotes a los tratamientos de inducción ensayados (Tabla 3.23). Para la concentración de 0.1 mgL^{-1} , se obtuvo un 75.7% de yemas que dieron lugar a brotes siendo éste el mayor porcentaje respecto a las demás concentraciones empleadas. (Figura 3.19).

Tabla 3.23 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de AIA

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	7.63	2	0.022
Chi Cuadrado MV-G2	7.13	2	0.0283

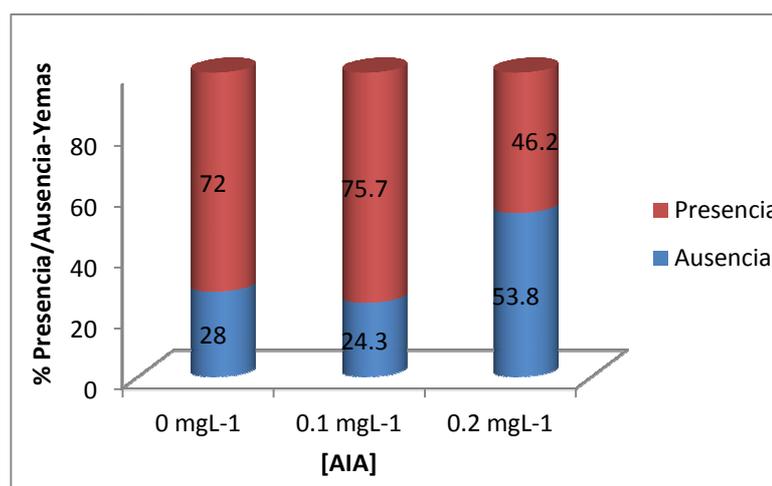


Figura 3.19 Porcentajes de formación de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de AIA

Se analizó, además, la relación entre las concentraciones de ANA y la variable presencia/ausencia de brotes y se elaboró la prueba chi – cuadrado. El valor de p fue de 0.0016 por lo que existe evidencia estadística que sugiere el rechazo de la independencia de la presencia/ausencia de brotes a los diferentes tratamientos de inducción ensayados (Tabla 3.24). Para la concentración de 0.1 mgL^{-1} , se obtuvo un 90.5% de yemas que dieron lugar a

brotos y el menor porcentaje de yemas con este tipo de respuesta corresponde a la concentración de 0.2 mgL^{-1} con el 53.8% (Figura 3.20).

Tabla 3.24 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de ANA

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	12.88	2	0.0016
Chi Cuadrado MV-G2	14.76	2	0.0006

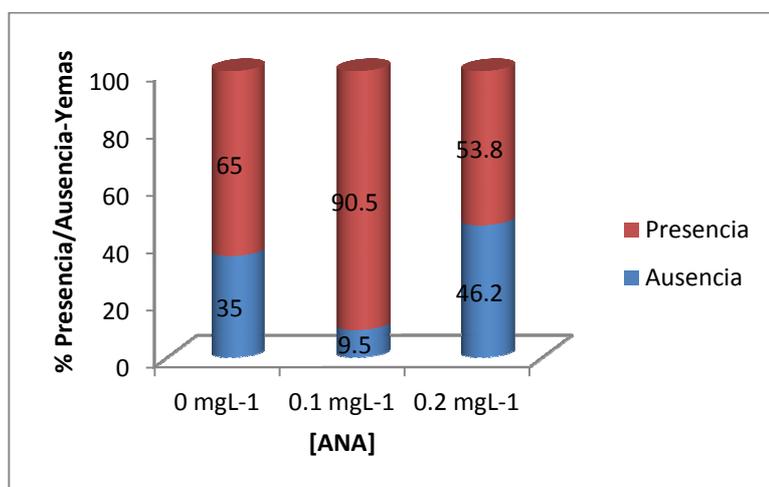


Figura 3.20 Porcentajes de formación de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de ANA

3.2.2 Formación de callo

Para la evaluación de esta variable se consideró la observación tomada a los 30 días posteriores a la siembra. Se evaluó la respuesta del explante a los diferentes tratamientos de inducción con la presencia o ausencia de callo en los dos explantes ensayados.

3.2.2.1 Segmentos nodales

En cuanto a segmentos nodales, se realizó la prueba de chi – cuadrado en base a la tabla de contingencia 3.26 obteniéndose un valor p

correspondiente a 0.6431 mayor al nivel de significancia lo que implica independencia de la variable a la aplicación de las combinaciones de reguladores de crecimiento (Tabla 3.25). La formación de callo a partir de segmentos nodales exhibe un porcentaje del 31.1% del total de los tratamientos aplicados, mientras que no se dio el apareamiento de callo en un 68.9% de los explantes inoculados en los tratamientos de inducción (Tabla 3.26).

Tabla 3.25 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	7.85	10	0.6431
Chi Cuadrado MV-G2	8.05	10	0.6242

Tabla 3.26 Tabla de contingencia para la formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción

Tratamiento (mgL-1)		Ausencia	Presencia	% Total
0 BAP, 0 AIA, 0 ANA	0	58.3	41.7	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0 ANA	1	83.3	16.7	100
1.5 BAP, 0.1 AIA, 0 ANA	2	58.3	41.7	100
1.5 BAP, 0.2 AIA, 0 ANA	3	75	25	100
1 BAP, 0 AIA, 0 ANA	4	75	25	100
1 BAP, 0.1 AIA, 0 ANA	5	66.7	33.3	100
1 BAP, 0.2 AIA, 0 ANA	6	50	50	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0.1 ANA	7	66.7	33.3	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0.2 ANA	8	83.3	16.7	100
1 BAP, 0 AIA, 0.1 ANA	9	58.3	41.7	100
1 BAP, 0 AIA, 0.2 ANA	10	83.3	16.7	100
	% Total	68.9	31.1	100

Como lo indica la figura 3.21, la ausencia de callo en segmentos nodales a los 30 días de la siembra es predominante. Para el tratamiento 6 se exhibe el mayor porcentaje de formación de callo a partir de este tipo de explante mientras que en los tratamientos 1, 8 y 10 el porcentaje de apareamiento de callo corresponde a únicamente el 16.7% de segmentos nodales; sin embargo el porcentaje de ausencia de callo es predominante en los tratamientos ensayados.

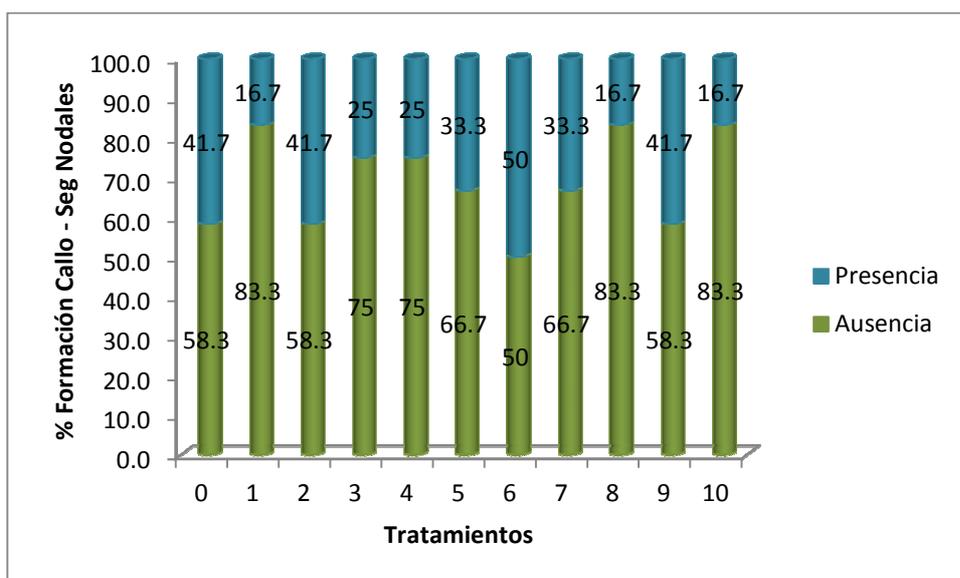


Figura 3.21 Porcentajes de formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción

Se realizaron también estadísticos para la relación de cada factor de los tratamientos de inducción sobre la formación de callo a partir de segmentos nodales. Para la relación de la concentración de BAP sobre el apareamiento de callo la prueba chi –cuadrado muestra un valor $p = 0.517$ correspondiente a la inexistencia de suficiente evidencia muestral para el rechazo de la independencia por lo que la formación de callo no depende de las concentraciones aplicadas (Tabla 3.27). La aplicación de concentraciones de 1 mgL^{-1} y 1.5 mgL^{-1} , resulta en una formación de callo del 33.3% y 26.7% respectivamente. Mientras que en ausencia de esta hormona (0 mgL^{-1} BAP), la presencia de callo es en el 41.7% de los explantes ensayados (Figura B.2.1).

Tabla 3.27 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de BAP

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1.32	2	0.5179
Chi Cuadrado MV-G2	1.3	2	0.5225

En referencia a la incidencia de AIA sobre la formación de callo, la tabla de contingencia, en base a la cual se efectuó la prueba chi – cuadrado, resultó en un valor de $p = 0.481$ mayor al nivel de significancia por lo que denota una ausencia de relación de dependencia entre el aparecimiento de callo y el regulador de crecimiento aplicado (Tabla 3.28). Al no emplear AIA sobre los explantes, se obtuvo un 27.4% de presencia de callo, mientras que para las concentraciones 0.1 mgL^{-1} y 0.2 mgL^{-1} se obtuvo un 37.5% de formación de callo en los segmentos nodales ensayados (Figura B.2.28).

Tabla 3.28 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de AIA

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1.46	2	0.4818
Chi Cuadrado MV-G2	1.44	2	0.4862

Al igual que para el caso de la auxina AIA, al analizar mediante una tabla de contingencia, la relación entre la formación de callo y el ácido naftalenacético (ANA) se obtuvo un valor ($p = 0.224$) por lo que la formación de callo no depende de la aplicación de las concentraciones ensayadas de esta hormona (Tabla 3.29). La figura del anexo B.2.3 muestra los porcentajes de presencia y ausencia de callo obtenidos con las concentraciones ensayadas, es así que para una concentración de 0.1 mgL^{-1} un 37.5% de los explantes resultaron con aparecimiento de callo.

Tabla 3.29 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de ANA

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	2.99	2	0.2243
Chi Cuadrado MV-G2	3.25	2	0.1965

3.2.2.2 Yemas

Para los diferentes tratamientos de reguladores de crecimiento aplicados en la inducción a partir de yemas, se realizó un análisis de contingencia, en base al cual se elaboró la prueba de hipótesis de chi – cuadrado en donde se obtuvo un valor de p de 0.004 (Tabla 3.30), lo que indica que existe dependencia entre la formación de callo a partir de yemas y los diferentes tratamientos de inducción efectuados. Como se presenta en la tabla 3.31, los porcentajes totales para presencia y ausencia de callo a partir de este tipo de explantes tras el análisis de la interacción de los reguladores de crecimiento empleados en los tratamientos, corresponden al 18.8% y 81.2% de los casos respectivamente.

Tabla 3.30 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	25.44	10	0.0046
Chi Cuadrado MV-G2	26.9	10	0.0027

Tabla 3.31 Tabla de contingencia para la formación de callo a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción

Tratamiento (mgL-1)		Ausencia	Presencia	% Total
0 BAP, 0 AIA, 0 ANA	0	80	20	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0 ANA	1	92.9	7.1	100
1.5 BAP, 0.1 AIA, 0 ANA	2	95.5	4.5	100
1.5 BAP, 0.2 AIA, 0 ANA	3	91.7	8.3	100
1 BAP, 0 AIA, 0 ANA	4	85.7	14.3	100
1 BAP, 0.1 AIA, 0 ANA	5	100	0	100
1 BAP, 0.2 AIA, 0 ANA	6	50	50	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0.1 ANA	7	70.4	29.6	100
1.5 BAP, 0 AIA, 0.2 ANA	8	76.9	23.1	100
1 BAP, 0 AIA, 0.1 ANA	9	60	40	100
1 BAP, 0 AIA, 0.2 ANA	10	92.3	7.7	100
	% Total	81.2	18.8	100

Como se evidencia en la figura 3.22, los porcentajes de formación de callo a partir de yemas son menores al 50%, siendo únicamente el tratamiento 6 en el que se obtiene el 50% de los explantes ensayados con este tipo de respuesta. Mientras que en el tratamiento 5 no se dio lugar a este tipo de morfogénesis bajo ningún porcentaje.

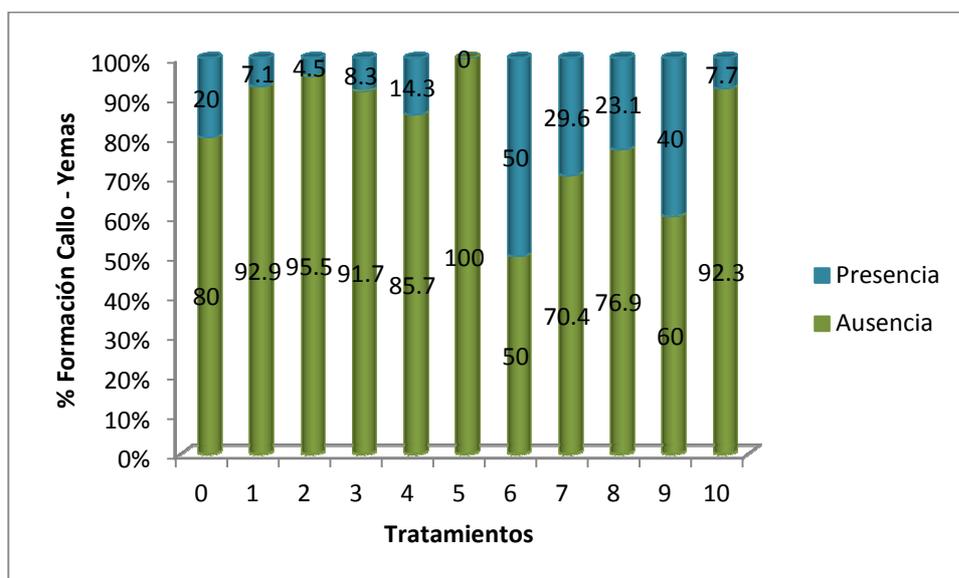


Figura 3.22 Porcentajes de formación de callo a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción

Respecto a la exploración de los datos obtenidos para la formación de callo respecto a cada uno de los reguladores de crecimiento de forma individual, se realizaron análisis de contingencia y pruebas chi – cuadrado que indiquen la relación de las hormonas sobre la variable evaluada. En referencia a la concentración de BAP, se obtuvo, un valor $p = 0.620$ mayor al nivel de significancia por lo que la formación de callo no depende de la aplicación de la concentración de BAP (Tabla 3.32). La figura B.2.4 muestra los porcentajes de callo obtenidos tras la aplicación de las diferentes concentraciones de BAP sobre las yemas, se visualiza un 21.8% de presencia de callo en la concentración de 1 mgL^{-1} .

Tabla 3.32 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de yemas respecto a la concentración de BAP

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0.95	2	0.6204
Chi Cuadrado MV-G2	0.96	2	0.6196

Al realizar la tabla de contingencia para la relación de la concentración de AIA y la formación de callo , se obtuvo un valor de $p = 0.010$ lo que indica que el porcentaje de formación de callo depende de la concentración de la hormona aplicada (Tabla 3.33). Respecto al porcentaje de apareamiento de callo en yemas, al aplicar las concentraciones de AIA, se obtuvo tan solo un 2.7% de callo al aplicar 0.1 mgL^{-1} , mientras que para 0.2 mgL^{-1} , se obtuvo una formación de callo en el 30.8% de los explantes ensayados (Figura 3.23).

Tabla 3.33 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de yemas respecto a la concentración de AIA

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	9.17	2	0.0102
Chi Cuadrado MV-G2	11.71	2	0.0029

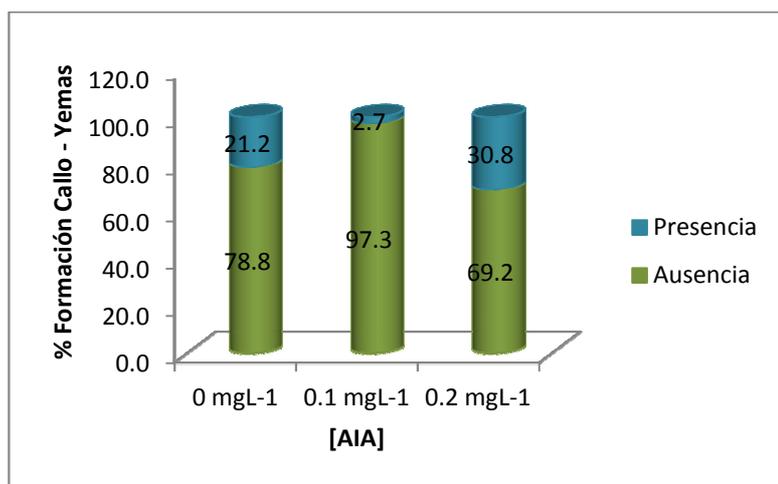


Figura 3.23 Porcentajes de formación de callo a partir de yemas respecto a la concentración de AIA

Finalmente, para la relación entre la concentración de ANA y el apareamiento de callo, obteniéndose en la prueba chi – cuadrado un valor $p = 0.022$, lo que corresponde a una dependencia de los porcentajes obtenidos en esta variable con las concentraciones de ANA aplicadas (Tabla 3.34).

Tabla 3.34 Prueba chi – cuadrado para la formación de callo a partir de yemas respecto a la concentración de ANA

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	7.61	2	0.0223
Chi Cuadrado MV-G2	6.91	2	0.0316

Es así que se obtuvo un 14.2% y 15.4% de presencia de callo en las concentraciones 0 mgL^{-1} y 0.2 mgL^{-1} de hormona respectivamente, mientras que para 0.2 mgL^{-1} , se obtuvo un 33.3% de apareamiento de callo en las yemas ensayadas bajo esta concentración del regulador de crecimiento (Figura 3.24).

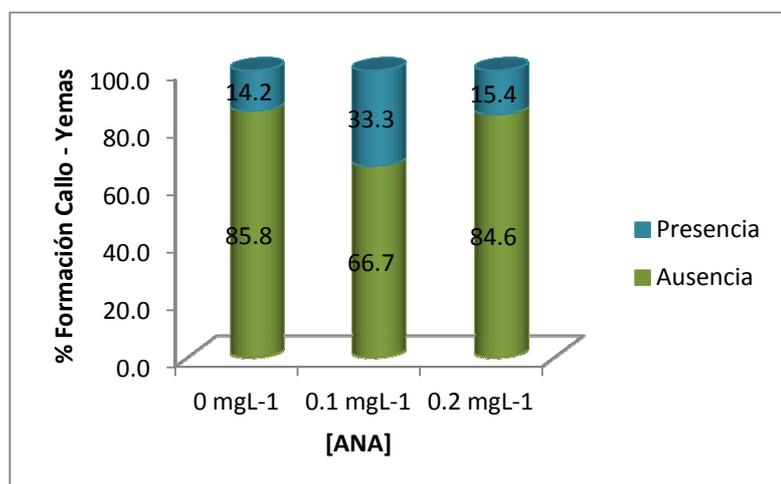


Figura 3.24 Porcentajes de formación de callo a partir de segmentos nodales respecto a la concentración de ANA

3.2.3 Número de brotes

La variable número de brotes fue evaluada a los 30 días de la siembra en cada unidad experimental ensayada. Se tomaron los datos de cada una de las 12 repeticiones tanto para segmentos nodales como para yemas de cilantro cimarrón en donde se observó la proliferación de brotes organogénicos respecto a los tratamientos empleados y a cada uno de los factores (hormonas de crecimiento) aplicadas en los dos tipos de explantes.

3.2.3.1 Segmentos nodales

Para analizar la variable número de brotes se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para el efecto de los diferentes reguladores de crecimiento empleados en los tratamientos de inducción. Se encontró un valor de p de 0.261 (Tabla 3.35), por lo que sugiere la igualdad de medias entre tratamientos; de tal forma que el número de brotes no es dependiente al tomar en cuenta la interacción de los reguladores de crecimiento (BAP, AIA, ANA) en los diferentes tratamientos.

Tabla 3.35 Análisis de varianza para el número de brotes generados a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Núm Brotes	132	0.09	0.02	172.17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2.33	10	0.23	1.26	0.2610
Tratamiento	2.33	10	0.23	1.26	0.2610
Error	22.42	121	0.19		
Total	24.75	131			

En la figura 3.25 se observa la proliferación de brotes generados a partir de segmentos nodales en los diferentes tratamientos de inducción. El

tratamiento 7 (1.5 mgL^{-1} BAP, 0 mgL^{-1} AIA, 0.1 mgL^{-1} ANA) presenta un apareamiento de brotes mayor a comparación de los demás ensayos. Por otro lado los tratamientos 1 al 4 muestran una uniformidad en los resultados siendo esta brotación estadísticamente poco significativa.

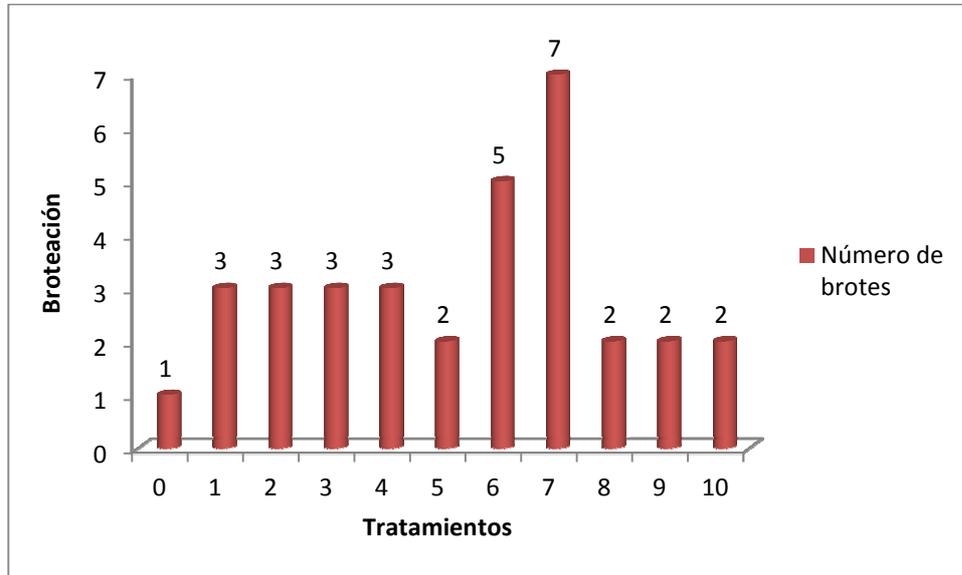


Figura 3.25 Número de brotes a partir de segmentos nodales al aplicar los tratamientos de inducción

Respecto a la relación de cada uno de los reguladores de crecimiento, se realizaron análisis de varianza, para cada factor, sobre el número de brotes generado a partir de segmentos nodales. En el ANOVA para los tres reguladores de crecimiento, se obtuvieron valores de p mayores al nivel de significación. El valor de p para la relación del BAP ($p = 0.268$) sobre número de brotes corresponde a la insuficiente evidencia muestral para el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias entre las concentraciones ensayadas (Anexo B.3.1). De igual forma para la hormona AIA, el valor ($p = 0.561$) mayor al de la prueba nominal, implica la inexistencia de una dependencia de la variable y el factor (Anexo B.3.2). Finalmente, para la auxina ANA al igual que en los casos anteriores no se obtiene un valor p que represente la inferencia directa de ANA sobre el número de brotes obtenidos a partir de segmentos nodales ($p = 0.232$) (Anexo B.3.3).

3.2.3.2 Yemas

Para analizar la interacción de las hormonas BAP, ANA y AIA sobre el número de brotes generados a partir de yemas, se realizó un ANOVA encontrándose un valor de $p = 0.0002$, por lo que para el dominio estudiado se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias entre tratamientos (Tabla 3.36). En cuanto a la prueba de LSD Fisher se encontraron tres grupos estadísticos en donde se obtiene que únicamente el tratamiento 7 pertenece al grupo estadístico C, mientras que los tratamientos 3, 1, 6, 8, 10 y 0 pertenecen al grupo A; los tratamientos 5, 9 y 2, 4 pertenecen a los grupos A – B y B – C respectivamente. De allí que las diferencias de los tratamientos son estadísticamente significativas entre las combinaciones de las tres hormonas (BAP, AIA, ANA) al analizar la variable número de brotes a partir de yemas.

Tabla 3.36 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para el número de brotes generados a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Num Brotes	132	0.24	0.18	106.07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38.55	10	3.85	3.82	0.0002
Tratamiento	38.55	10	3.85	3.82	0.0002
Error	122.08	121	1.01		
Total	160.63	131			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.81185

Error: 1.0090 gl: 121

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
3	0.42	12	0.29	A	
1	0.58	12	0.29	A	
6	0.58	12	0.29	A	
8	0.58	12	0.29	A	
10	0.58	12	0.29	A	
0	0.67	12	0.29	A	
5	0.83	12	0.29	A	B
9	0.92	12	0.29	A	B
2	1.50	12	0.29	B	C
4	1.50	12	0.29	B	C
7	2.25	12	0.29		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

La figura 3.38 muestra el número de brotes total generados para las repeticiones efectuadas bajo los tratamientos de inducción propuestos en la metodología. El tratamiento 7 (1.5 mgL^{-1} BAP, 0 mgL^{-1} AIA, 0.1 mgL^{-1} ANA), tal como para segmentos nodales, exhibe una mayor proliferación de brotes respecto a los demás tratamientos ensayados. Además se observa una similitud en la proliferación de brotes entre los tratamientos 2 y 7 que contienen una combinación de BAP (1.5 mgL^{-1}) y las auxinas AIA y ANA de 0.1 mgL^{-1} respectivamente.

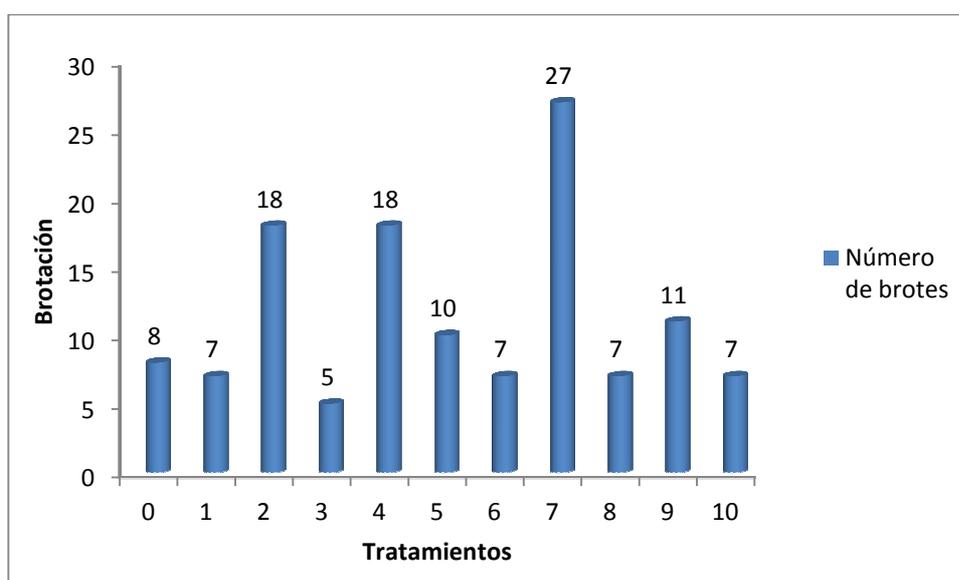


Figura 3.26 Número de brotes a partir de yemas evaluados a los 30 días.

Igualmente, se realizaron análisis de varianza para la inferencia de los reguladores de crecimiento sobre el número de brotes obtenidos a partir de yemas. En cuanto a la concentración de BAP, se obtuvo un valor de $p = 0.437$, por lo que no existe diferencia estadísticamente significativa para afirmar dependencia entre el número de brotes y las concentraciones de BAP ensayadas (Anexo B.3.4). De igual forma, el valor de p encontrado en el ANOVA respecto a las concentraciones de AIA aplicadas, fue mayor al nivel de significancia ($p = 0.075$), lo que implica una similitud de medias en referencia al número de brotes (Anexo B.3.5). En contraste, al realizar el ANOVA para la inferencia de la auxina ANA sobre el número de brotes generado a partir de yemas, se obtuvo un valor ($p = 0.0036$), lo que sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias entre las concentraciones de ANA ensayadas.

La prueba de LSD Fisher muestra dos grupos estadísticos diferentes, perteneciendo al grupo A las concentraciones de 0.2 mgL⁻¹ y 0 mgL⁻¹ de hormona, mientras que en el grupo B se encuentra el 0.1 mgL⁻¹ de ANA, es así que se obtiene dependencia entre dichas concentraciones y el número de brotes obtenido (Tabla 3.37).

Tabla 3.37 Análisis de varianza para el número de brotes a partir de yemas respecto a la concentración de ANA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Num Brotes	132	0.08	0.07	112.81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13.40	2	6.70	5.87	0.0036
ANA	13.40	2	6.70	5.87	0.0036
Error	147.23	129	1.14		
Total	160.63	131			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.49519

Error: 1.1413 gl: 129

ANA	Medias	n	E.E.	
0.2	0.58	24	0.22	A
0.0	0.87	84	0.12	A
0.1	1.58	24	0.22	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

3.2.4 Longitud de los brotes

Esta variable corresponde a la longitud alcanzada por los brotes de cilantro cimarrón evaluados a los 30 días de la siembra en los diferentes medios de cultivo empleados para la regeneración de esta planta vía organogénesis directa. Se evaluó tanto los tratamientos aplicados, como la inferencia de cada regulador de crecimiento sobre la variable, en segmentos nodales y yemas.

3.2.4.1 Segmentos nodales

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para la interacción de las hormonas BAP, AIA y ANA que muestra un valor de 0.225, lo que implica que los tratamientos ensayados no son estadísticamente diferentes al evaluar la variable longitud de brotes (Tabla 3.38). Se evidencia que entre estos tratamientos la diferencia estadística es significativa para la interacción de reguladores de crecimiento al evaluar la longitud de brotes generados a partir de segmentos nodales.

Tabla 3.38 Análisis de varianza para la longitud de brotes generados a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Longitud brote	132	0.10	0.02	62.17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10.71	10	1.07	1.32	0.2253
Tratamiento	10.71	10	1.07	1.32	0.2253
Error	97.92	121	0.81		
Total	108.63	131			

Alternativamente, se realizaron análisis de varianza para cada uno de los reguladores de crecimiento utilizados en los tratamientos de inducción. ES así que en el ANOVA para la relación de la hormona BAP con la longitud de los brotes, se obtuvo un valor $p = 0.351$ (Anexo B.4.1), siendo independiente el uso de las concentraciones de BAP sobre la variable evaluada. Así también, el uso de auxinas en el medio de cultivo no resultó estadísticamente significativo. Para la adición de AIA, se exhibe un valor de $p = 0.057$ lo cual indica el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de los tratamientos que contengan esta hormona (Anexo B.4.2). De igual manera, en el análisis de varianza para la longitud de brotes respecto al uso de ácido naftalenacético en segmentos nodales, no sugiere diferencia estadística entre las concentraciones empleadas, puesto que el valor p corresponde a 0.573 (Anexo B.4.3).

Por otro lado, para el análisis de longitud de los brotes se categorizaron los datos en cuatro niveles: comprendiendo el nivel 1 brotes entre 0.1 y 0.25 cm; 0.25 y 1 cm el nivel 2; para el nivel 3 brotes de 1 y 1.5 cm; y brotes de 1.5 a 2 cm para el nivel 4. La interacción de las concentraciones de los reguladores de crecimiento BAP, AIA y ANA, se analizó mediante un análisis de contingencia (Anexo B.4.4) que muestra la presencia del 76.5% de brotes en el nivel 1 de longitud, 9.8% brotes en el nivel 2, 6.1% de brotes en el nivel 3 y 7.6% de brotes en el nivel 4.

La mayoría de brotes se encuentran en el nivel 1 (0 - 0.25 cm) lo que indica que no existió crecimiento significativo de los brotes generados a partir de segmentos nodales en ninguno de los tratamientos de inducción empleados. (Figura 3.27).

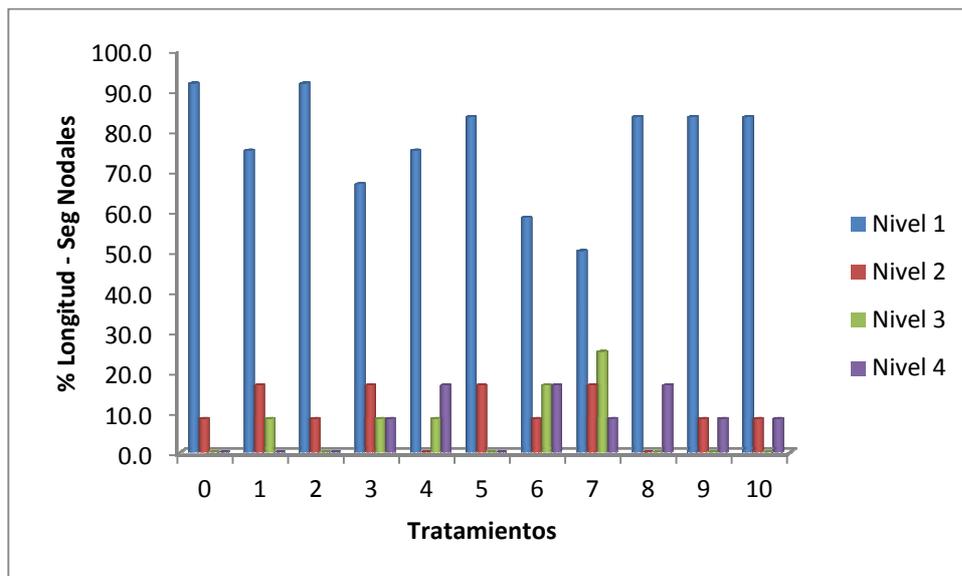


Figura 3.27 Porcentaje de longitud de los brotes en niveles generados a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción

En base a análisis de contingencia, se realizaron gráficas de los porcentajes de brotes en los diferentes niveles categorizados de longitud (Anexo B.4.5). Para las concentraciones de BAP ensayadas, se obtuvieron los mayores porcentajes en el nivel 1, de tal forma que para la concentración 1

mgL⁻¹ y 1.5 mgL⁻¹ de BAP se obtuvo un 76.1% y 73.3% respectivamente, y para la ausencia de esta hormona (0mgL⁻¹ BAP) se obtuvo un 91.7% de brotes en el nivel 1 de longitud correspondiente a 0 a 0.25cm (Anexo B.4.6).

En relación a la auxina AIA, el análisis de contingencia (Anexo B.4.7) permite realizar la gráfica en la que se observan los porcentajes de longitud de brotes en cada uno de los niveles de longitud categorizados. Para una concentración de 0.2 mgL⁻¹, se obtuvieron brotes en el nivel 4 de longitud, pero únicamente del 12.5% de los segmentos nodales ensayados (Anexo B.4.8). Asimismo, tras el análisis de contingencia (Anexo B.4.9) respecto a la inferencia de ANA sobre la longitud de los brotes, se obtuvo una mayoría de brotes que se ubicaron en el nivel 1 de longitud. (Anexo B.4.10)

3.2.4.2 Yemas

Respecto al análisis de varianza (ANOVA), para la relación entre la longitud de los brotes generados a partir de yemas y los tratamientos aplicados, se obtuvo un valor de $p = 0.629$ mayor al nivel de significancia, por lo que no se encuentra suficiente evidencia muestral para el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias (Tabla 3.39) lo que indica la inexistencia de una diferencia estadística significativa entre tratamientos.

Tabla 3.39 Análisis de varianza para la longitud de brotes generados a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Longitud brote	181	0.04	0.00	60.65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7.45	10	0.74	0.80	0.6292
Tratamiento	7.45	10	0.74	0.80	0.6292
Error	158.30	170	0.93		
Total	165.75	180			

Se realizó también análisis de varianza para cada uno de los factores (BAP, AIA, ANA). Obteniéndose diferentes valores de p que no indican la significancia estadística de la inferencia de éstos sobre la variable evaluada. Para la concentración de BAP, se obtuvo un valor de p de 0.118 (Anexo B.4.11), mayor al nivel de significancia, por lo que los tratamientos empleados son estadísticamente similares. En cuanto a las auxinas AIA y ANA se encontraron valores de p mayores al nivel de significación: 0.579 (Anexo B.4.12) y 0.459 (Anexo B.4.13) respectivamente, por lo que se considera inexistencia de diferencias estadísticas significativas para las concentraciones de los dos reguladores de crecimiento sobre la variable longitud de brotes. Al igual que para segmentos nodales, se categorizó los datos en cuatro niveles: valores entre 0.1 y 2 cm corresponde al nivel 1 de longitud, 2 a 4 cm nivel 2, 4 a 6 cm nivel 3 y de 6 a 8 cm nivel 4. La interacción de las concentraciones de BAP, AIA y ANA en cada uno de los tratamientos, se analizó mediante una tabla de contingencia (Anexo B.4.14) que muestra la presencia de un 66.9% de brotes en el nivel 1 de longitud, 14.9% en el nivel 2, 10.5% en el nivel 3 y 7.7% en el nivel 4. Como se puede observar en la figura 3.28, en todos los tratamientos existe la tendencia a obtener brotes entre 0 y 2 cm de longitud. Se observa también que el tratamiento siete presenta brotes en el nivel 4 que exhibe crecimiento significativo frente al resto de ensayos.

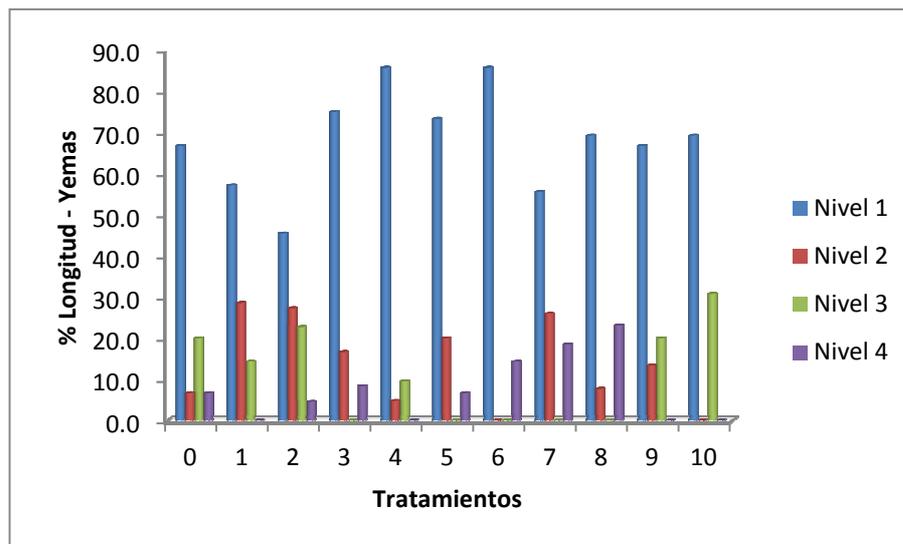


Figura 3.28 Porcentaje de longitud de los brotes en niveles generados a partir de yemas respecto a los tratamientos de inducción

En base a análisis de contingencia, se realizaron gráficas de los porcentajes de brotes en los diferentes niveles categorizados de longitud (Anexo B.4.15). Para las concentraciones de BAP ensayadas, se obtuvieron los mayores porcentajes en el nivel 1, de tal forma que para la concentración 0 mgL⁻¹ y 1.5 mgL⁻¹ de BAP se obtuvo un 66.7% y 58% respectivamente, y para 1 mgL⁻¹ BAP se obtuvo un 76.9% de brotes en el nivel 1 de longitud correspondiente a 0 a 2cm (Anexo B.4. 16).

En relación a la auxina AIA, la tabla de contingencia (Anexo B.4.17) permite realizar la gráfica en la que se observan los porcentajes de longitud de brotes en cada uno de los niveles de longitud categorizados. Para una concentración de 0.2 mgL⁻¹, se obtuvo el mayor porcentaje de brotes en el nivel 4 de longitud correspondiente a 11.5% de las yemas (Anexo B.4.18). Respecto a la inferencia de ANA sobre la longitud de los brotes, se obtuvo una mayoría de brotes que se ubicaron en el nivel 1 de longitud (Anexo B.4.19). Al igual que para AIA, el uso de 0.1 mg⁻¹ de ANA presenta el mayor porcentaje de brotes en el nivel 4 de longitud siendo éste del 11.9% de las yemas ensayadas (Anexo B.4.20)

3.2.5 Ancho de las hojas

La variable ancho de hojas corresponde a la extensión de la lámina foliar de los brotes generados vía organogénesis directa mediante la aplicación de los diferentes tratamientos de inducción propuestos en la metodología. La variable fue medida en centímetros tanto para segmentos nodales como para yemas.

3.2.5.1 Segmentos nodales

El análisis de varianza generado para evaluar la interacción de los reguladores de crecimiento empleados sobre el ancho de las hojas de los

brotos organogénicos formados a partir de segmentos nodales muestra un valor de p de 0.076, por lo que no existe diferencia estadística entre la interacción de las hormonas ensayadas y la variable ancho de hojas (Tabla 3.40).

Tabla 3.40 Análisis de varianza para el ancho de hojas de brotes generados a partir de segmentos nodales respecto a los tratamientos de inducción

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ancho de hojas	132	0.13	0.05	58.78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12.17	10	1.22	1.75	0.0763
Tratamiento	12.17	10	1.22	1.75	0.0763
Error	83.92	121	0.69		
Total	96.08	131			

Se realizaron también análisis de varianza para cada uno de los reguladores de crecimiento utilizados en los tratamientos de inducción. ES así que en el ANOVA para la relación de la hormona BAP con el ancho de hojas, se obtuvo un valor $p = 0.132$ (Anexo B.5.1) siendo independiente el uso de las concentraciones de BAP sobre la variable evaluada. El uso de auxinas en el medio de cultivo no resultó estadísticamente significativo; para la adición de AIA, se exhibe un valor de $p = 0.129$ lo que indica el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de los tratamientos que contengan esta hormona (Anexo B.5.2). Finalmente, el análisis de varianza para el ancho de las hojas respecto al uso de ANA en segmentos nodales, no sugiere diferencia estadística entre las concentraciones empleadas, puesto que el valor p corresponde a 0.411 (Anexo B.5.3).

Para el análisis del ancho de las hojas de los brotes generados a partir de segmentos nodales, se categorizaron los datos obtenidos en cuatro niveles: hojas de 0.1 a 0.25 cm corresponden al nivel 1, de 0.25 a 0.5 cm en el nivel 2, nivel 3 hojas entre 0.5 y 0.75 cm y en el nivel 4 de 0.75 a 1 cm. La combinación

de los reguladores de crecimiento empleados (BAP, AIA y ANA) fue analizada mediante una tabla de contingencia (Tabla B.5.4) que muestra el porcentaje de ancho de hojas dentro de cada uno de los noveles categorizados para esta variable respecto a los tratamientos de inducción empleados. Se observa que el 78.8% de los brotes generados a partir de segmentos nodales presentaron hojas con un ancho dentro del nivel 1 (0 – 0.25 cm), mientras que un 12.9% se encuentran en el nivel 3 (0.5 – 0.75 cm) y el ancho de las hojas en los niveles 2 y 4 presentan el 4.5% y 3.8% respectivamente

Como se puede apreciar en la figura 3.29, la mayoría de los explantes ensayados se encuentran categorizados en el nivel 1 de ancho de sus hojas. Sin embargo los tratamientos 6 y 7 exhiben porcentajes relativamente altos respecto a los demás tratamientos, con brotes que presentan hojas en el nivel 3 de ancho.

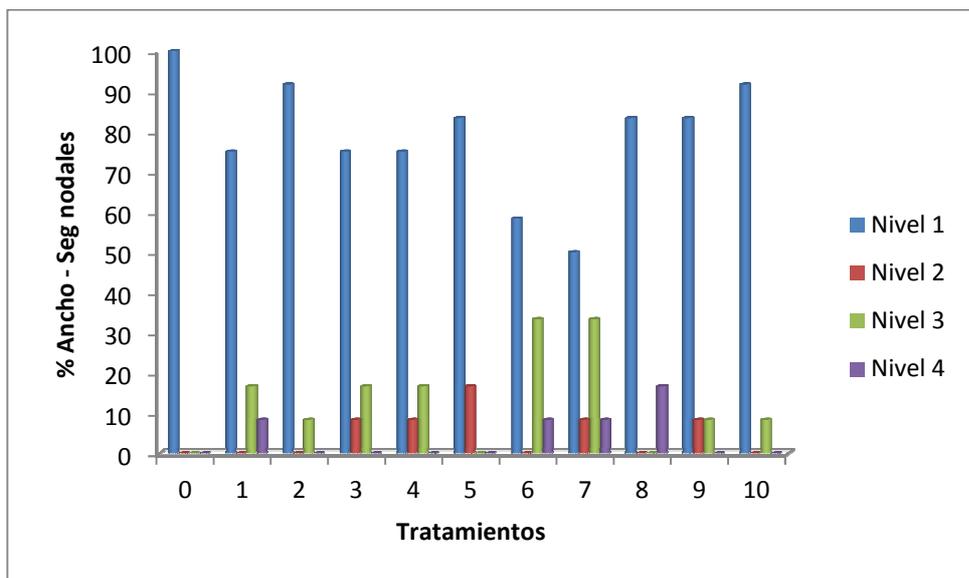


Figura 3.29 Porcentaje de ancho de las hojas de los brotes generados a partir de segmentos nodales por niveles respecto a los tratamientos de inducción

En base a la tabla de contingencia, se realizaron gráficas de los porcentajes de brotes en los diferentes niveles categorizados de ancho de las

hojas (Anexo B.5.5). Para las concentraciones de BAP ensayadas, se obtuvieron los mayores porcentajes en el nivel 1, de tal forma que para la concentración 0 mgL⁻¹ y 1 mgL⁻¹ de BAP se obtuvo un 100% y 78.3% respectivamente, y para la concentración de 1.5 mgL⁻¹ BAP se obtuvo un 75% de brotes con hojas en el nivel 1 de ancho correspondiente a 0 a 0.25cm (Anexo B.5.6). En relación al AIA, el análisis de contingencia (Anexo B.5.7) permite realizar la gráfica en la que se observan los porcentajes de ancho de hojas en cada uno de los niveles categorizados. Para las concentraciones ensayadas, la el más alto porcentaje de brotes se encuentran en el nivel 1 del ancho de sus hojas. (Anexo B.5.8). Además, para la auxina ANA, la tabla de contingencia expresa la mayoría de brotes con hojas en un ancho categorizado en el nivel 1 (Anexo B.5.9). El uso de 0.1 mg⁻¹ de ANA presenta un porcentaje de 66.7% de brotes en esa categoría, mientras que se destaca un 87.5% de brotes pertenecientes a la categoría 1 de ancho de sus hojas. (Anexo B.5.10)

3.2.5.2 Yemas

En el análisis de varianza (ANOVA) generado para la interacción de los reguladores de crecimiento empleados, se encontró un valor de p alto (0.495) (Tabla 3.41) lo que sugiere que el ancho de las hojas de los brotes generados a partir de yemas, no depende de la concentración de las hormonas BAP, AIA y ANA aplicadas en el medio de cultivo.

Tabla 3.41 Análisis de varianza para el ancho de las hojas de brotes generados a partir de yemas respecto a la concentración de BAP, AIA y ANA.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ancho de hojas	181	0.05	0.00	61.30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	11.35	10	1.13	0.94	0.4958
Tratamiento	11.35	10	1.13	0.94	0.4958
Error	204.67	170	1.20		
Total	216.02	180			

Se realizaron análisis de varianza para los reguladores de crecimiento utilizados en los tratamientos de inducción. Es así que en el ANOVA para la relación de BAP - ancho de hojas, se obtuvo un valor $p = 0.171$ (Anexo B.5.11) por lo que la variable es independiente a las concentraciones de BAP. El uso de auxinas en el medio de cultivo no resultó estadísticamente significativo. Para la adición de AIA, se exhibe un valor de $p = 0.274$ lo cual indica el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de los tratamientos que contengan esta hormona (Anexo B.5.12). El análisis de varianza para el ancho de las hojas respecto al uso de ANA en yemas, no sugiere diferencia estadística entre las concentraciones empleadas, puesto que el valor p corresponde a 0.274 (Anexo B.5.13). Para el análisis de la interacción de BAP, AIA y ANA, se categorizaron los datos en cuatro niveles: el nivel 1 corresponde a hojas de 0.1 a 0.625 cm, nivel 2: 0.625 a 1.25 cm, nivel 3: 1.25 a 1.87 cm y nivel 4: 1.875 a 2.5 cm. La combinación de los reguladores de crecimiento fue analizada mediante una tabla de contingencia (Anexo B.5.14) que muestra un 57.5% de brotes con hojas pertenecientes al nivel 1 de ancho (0 y 0.625 cm), 21% en el nivel 2 (0.625 – 1.25 cm), 6.6% brotes con hojas entre 1.25 y 1.87 cm y 14.9% correspondientes al nivel 4 (1.875 – 2.5 cm) (Figura 3.30).

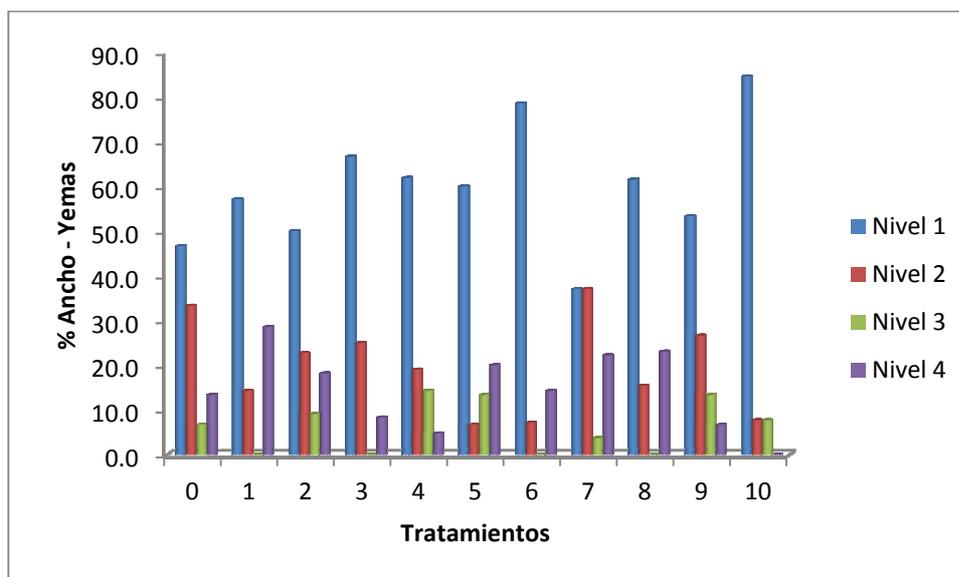


Figura 3.30 Porcentaje de ancho de hojas de los brotes generados a partir de yemas por niveles respecto a los tratamientos de inducción

En base a análisis de contingencia, se realizaron gráficas de los porcentajes de brotes en los diferentes niveles categorizados de longitud respecto a la concentración de BAP (Anexo B.5.15). Se obtuvieron los mayores porcentajes en el nivel 1, de tal forma que para la concentración 1 mgL^{-1} y 1.5 mgL^{-1} de BAP se obtuvo un 66.7% y 51.1% respectivamente, y para la ausencia de esta hormona (0 mgL^{-1} BAP) se obtuvo un 46.7% de brotes en el nivel 1 de longitud correspondiente a 0 a 0.625cm (Anexo B.5.16).

En relación a la auxina AIA, la tabla de contingencia (Anexo B.5.17) permite realizar la gráfica en la que se observan los porcentajes de ancho de hojas de los brotes en cada uno de los niveles categorizados. Para una concentración de 0.1 mgL^{-1} de AIA se obtuvo un 18.9% de brotes con hojas categorizadas en el nivel 4 de ancho. (Anexo B.5.18). La tabla de contingencia (Anexo B.5.19) respecto a la inferencia de ANA sobre el ancho de hojas se obtuvo una mayoría de brotes que se ubicaron en el nivel 1. Al igual que para el empleo de 0.1 mgL^{-1} de AIA, esta misma concentración de refleja un 16.7% de brotes con hojas de ancho nivel 4; siendo este el más alto porcentaje respecto al resto de concentraciones ensayadas (Anexo B.5.20).

3.3 Etapa de multiplicación

3.3.1 Multiplicación convencional

Tal como se indicó en la metodología, para la multiplicación convencional no se emplearon tratamientos en los que se prueben diferentes hormonas de crecimiento, puesto que el principal objetivo de esta fase es la obtención de un número de plántulas necesario para su ingreso a multiplicación en el SIT asegurándose de la ausencia de microorganismos que pueda contaminar el sistema de inmersión en los diferentes ciclos. Sin embargo, se evaluaron las mismas variables que para el SIT.

3.3.1.1 Presencia o ausencia de brotes

La presencia o ausencia de brotes encontrada tras la realización del primer subcultivo es expresada en porcentaje. Se encontró una formación de brotes en el 18.2% de los explantes inoculados inicialmente, mientras que predomina la ausencia de los mismos con un 81.8% (Figura 3.31). Para el subcultivo B, se encuentra un mayor porcentaje de ausencia de brotes siendo este el 63.6%, mientras que el 36.4% de los brotes inoculados dieron lugar a la formación de nuevos brotes en el mencionado subcultivo (Figura 3.32).



Figura 3.31 Porcentaje de formación de brotes en el Subcultivo A

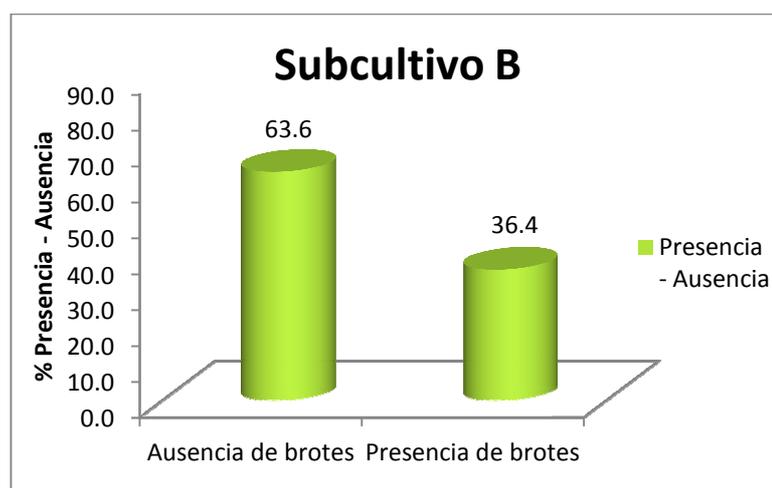


Figura 3.32 Porcentaje de formación de brotes en el Subcultivo B

En contraste, en el subcultivo C la formación de brotes fue mayor, al encontrarse un porcentaje de presencia de brotes de 67.9% mientras que la ausencia de brotes es del 32.1% encontrado para este subcultivo (Figura 3.33).

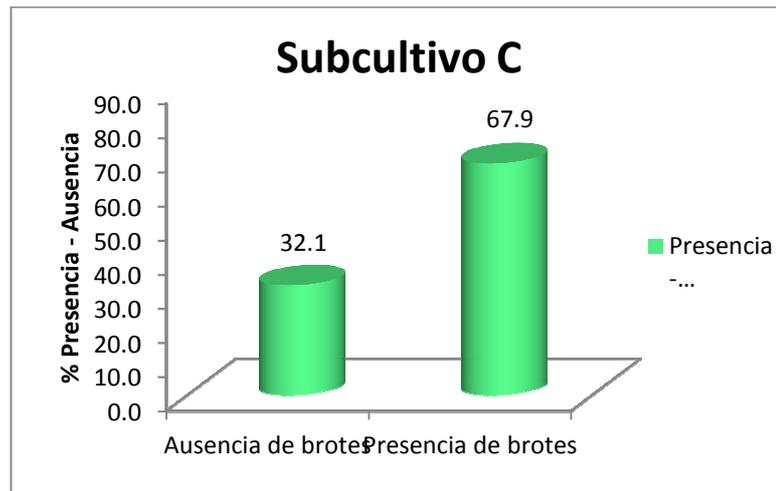


Figura 3.33 Porcentaje de formación de brotes en el Subcultivo C

3.3.1.2 Longitud de brotes

Se realizó el promedio de las longitudes de los nuevos brotes originados en la multiplicación convencional para cada subcultivo. Se obtuvo un promedio de 2.94 cm en el subcultivo A, 3.16 cm en el subcultivo B, y 3.35 cm en el subcultivo C, tal como lo indica la figura 3.34.

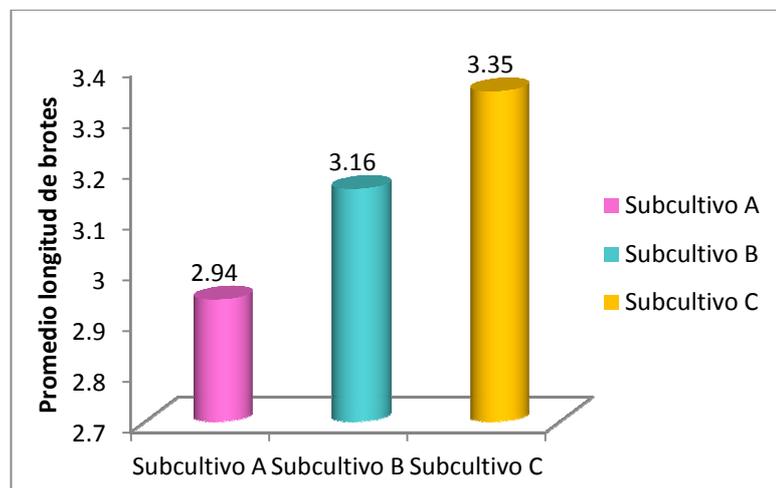


Figura 3.34 Promedio de longitud de brotes originados en los tres subcultivos en la multiplicación convencional.

3.3.1.3 Ancho de hojas

Al igual que para la variable longitud, se obtuvo el promedio de ancho de las hojas de los brotes generados en los diferentes subcultivos (A – C) en la multiplicación convencional, se obtuvo un ancho promedio de 0.86 cm para el subcultivo A, 1.07 cm y 1.05 cm de ancho de las hojas en los subcultivos B y C respectivamente (Figura 3.35).

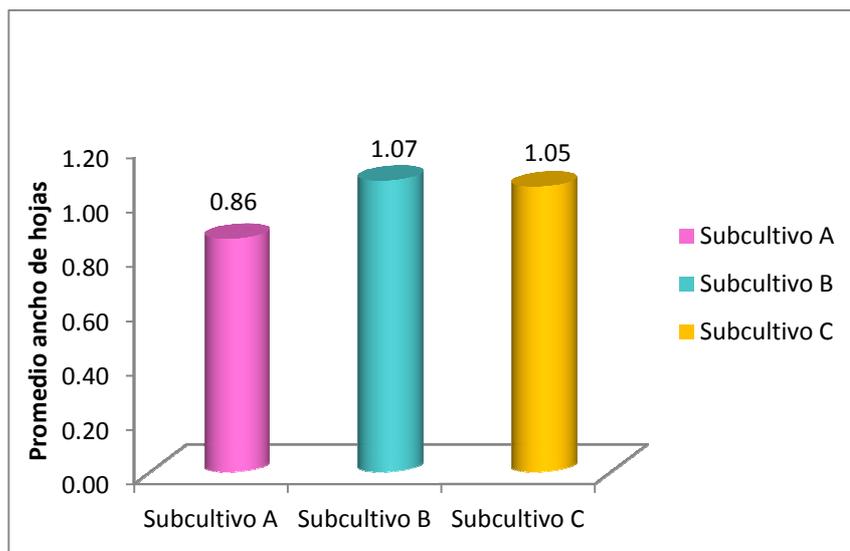


Figura 3.35 Promedio de ancho de las hojas de brotes originados en los tres subcultivos en la multiplicación convencional

3.3.1.5 Índice de multiplicación

El índice para la multiplicación convencional, o tasa de proliferación, se obtuvo mediante la razón entre la cantidad de brotes obtenidos en relación con el número de brotes inoculados inicialmente en un medio de cultivo determinado. Es así que en el subcultivo A se produjeron 12 nuevos brotes, en el subcultivo B, se obtuvieron 24 nuevos brotes y finalmente, en el subcultivo C 38 nuevos brotes tras la evaluación. Mediante el ANOVA se determinó que los tres coeficientes de multiplicación obtenidos en los subcultivos, fueron

estadísticamente diferentes dando lugar a tres grupos en la prueba de LSD Fisher que destaca una media mayor para el subcultivo C (Tabla 3.42).

Tabla 3.42 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para la tasa de proliferación en los tres subcultivos de la multiplicación convencional

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Indice de Multiplicación	188	0.17	0.16	32.22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7.57	2	3.78	18.76	<0.0001
Subcultivo	7.57	2	3.78	18.76	<0.0001
Error	37.31	185	0.20		
Total	44.87	187			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.15850

Error: 0.2016 gl: 185

Subcultivo Medias n E.E.

Sub A	1.18	66	0.06	A
Sub B	1.36	66	0.06	B
Sub C	1.68	56	0.06	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

La Figura 3.36 muestra la tendencia para el índice de multiplicación tras la realización de los tres subcultivos. Se obtuvieron índices entre 1.18 y 1.68, para el subcultivo A, y subcultivo C respectivamente; mientras que para el subcultivo B, se obtuvo un coeficiente de 1.36

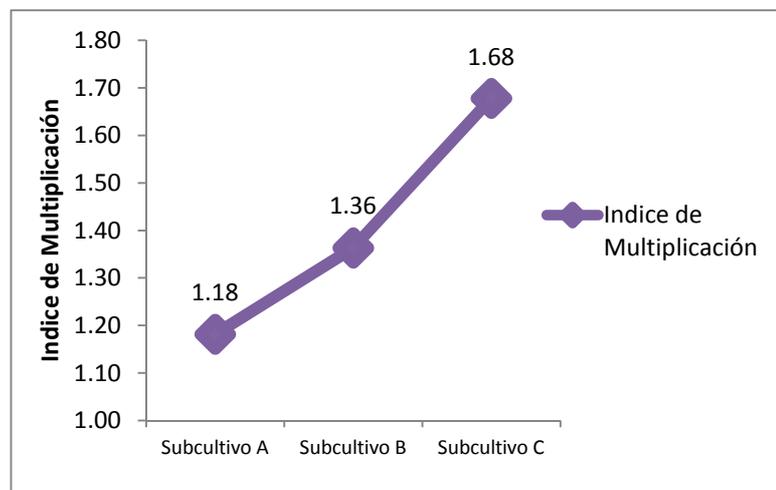


Figura 3.36 Tasa de proliferación en los tres subcultivos.

3.3.2 Multiplicación en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

3.3.2.1 Prueba de parámetros de control en el SIT: Frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo

3.3.2.1.1 Presencia o ausencia de plántulas

Para el análisis de determinación de los parámetros frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo en el SIT en relación a la presencia/ausencia de brotes, se realizó la prueba de hipótesis de chi – cuadrado que exhibe un valor de p menor al 5% (Tabla 3.43) lo que corresponde a una alta significancia estadística indicando la dependencia entre el aparecimiento o ausencia de plántulas y los tratamientos aplicados en la prueba de parámetros de control en el SIT que incluye la frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo. La prueba estadística se realizó en base a la tabla de contingencia (Anexo C.1.1) que permite visualizar la frecuencia de aparecimiento o ausencia de plántulas para cada tratamiento aplicado expresado en porcentajes, en donde se obtuvo un 26.9% de presencia de plántulas y un 73.1% de ausencia del total de ensayos efectuados.

Tabla 3.43 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de plántulas generadas respecto a la prueba de parámetros de control en el SIT

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	37.15	11	0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	37.18	11	0.0001

En la figura 3.37, se evidencian los porcentajes de aparecimiento de plántulas entre los cuales el tratamiento 5 y 7 presentan el 100 y 83.3% respectivamente para esta variable que corresponden a los más altos obtenidos; mientras que para los tratamientos 2, 4, 10 y 12 se obtiene una

porcentaje de 8.3% correspondiente al menor para presencia de plántulas en el ensayo efectuado.

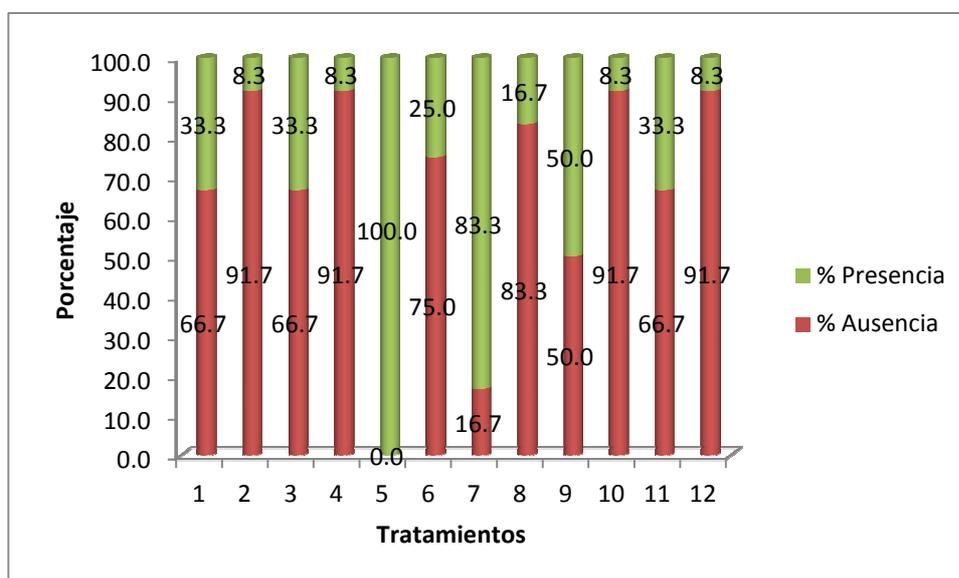


Figura 3.37 Porcentaje de formación de plántulas en cada tratamiento utilizando la prueba para parámetros de control en el SIT

La prueba chi – cuadrado referente a los parámetros de control (frecuencia y tiempo de inmersión) refleja un valor p de 0.098 por lo que se sugiere inexistencia de suficiente evidencia muestral para el rechazo de la independencia (Tabla 3.44); por ello la generación de plántulas, es independiente a los dos parámetros evaluados (frecuencia y tiempo de inmersión).

Tabla 3.44 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de plántulas en relación a la frecuencia y tiempo de inmersión ensayados en el SIT

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	9.29	5	0.0982
Chi Cuadrado MV-G2	8.92	5	0.1121

La figura del anexo C.1.2, muestra el porcentaje de la presencia/ausencia de plántulas, en donde para la frecuencia dos horas y dos

minutos de inmersión se exhibe el 50% de presencia y ausencia de plántulas, mientras que para las demás combinaciones el porcentaje de ausencia supera significativamente la formación de plántulas.

Por otro lado se realizó también una prueba chi – cuadrado para el análisis del efecto de la densidad del inóculo sobre la generación de plántulas por brote inoculado en el SIT, el cual presenta un valor $p < 0.0001$, por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis; indicando dependencia entre la generación de plántulas y este parámetro. (Tabla 3.45). Como se observa en la figura 3.38, las densidades de inóculo ensayadas (3 y 6) exhiben diferente generación de plántulas; obteniéndose en el caso de 3 explantes por unidad de SIT un porcentaje de 87.5% formación de nuevas plántulas.

Tabla 3.45 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de plántulas generadas en relación a la densidad del inóculo por unidad de SIT

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	22.65	1	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	21.95	1	<0.0001

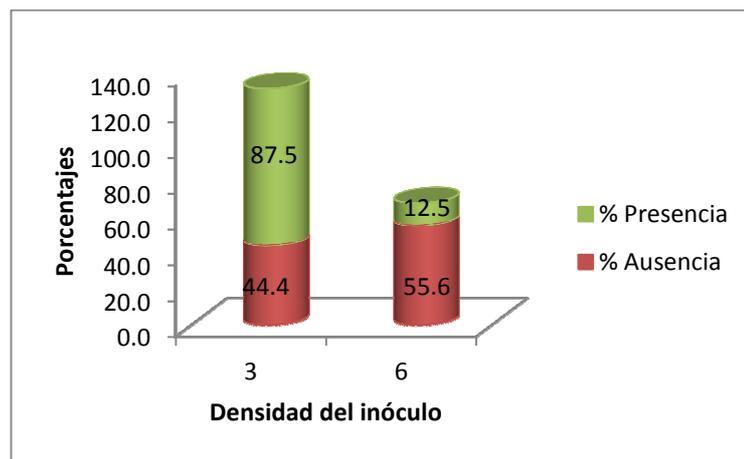


Figura 3.38 Porcentaje de formación de plántulas para los brotes inoculados en relación a la densidad del inóculo por unidad de SIT

3.3.2.1.2 Número de plántulas

Para la variable número de plántulas se efectuaron análisis de varianza ANOVA, para el efecto de los tratamientos empleados para la prueba de parámetros de control en la multiplicación en el SIT y para cada uno de sus factores. Al analizar todos los parámetros involucrados en la prueba de parámetros de control en el SIT, se obtuvo un valor de p de 0.0024 que indica que para el dominio estudiado se rechaza la hipótesis de igualdad de medias entre tratamientos (Tabla 3.46). En cuanto a la prueba de LSD Fisher, se encontraron cuatro grupos estadísticos diferentes, de los cuales los tratamientos 3, 11 y 1 pertenecen al grupo A; los tratamientos 10, 2 y 12 comparten el grupo estadístico C y únicamente el tratamiento 5 pertenece al grupo D. El tratamiento 9 se encuentra entre el grupo A y B, los tratamientos 7 y 4 pertenecen a B y C y los tratamientos 8 y 6 comparten los grupos estadísticos C y D.

Tabla 3.46 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para el número de plántulas generadas mediante la aplicación de tratamientos en el control del SIT

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Num Brotes	24	0.84	0.70	14.64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	48.83	11	4.44	5.92	0.0024
Tratamiento	48.83	11	4.44	5.92	0.0024
Error	9.00	12	0.75		
Total	57.83	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.88691

Error: 0.7500 gl: 12

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
3	4.00	2	0.61	A
11	4.00	2	0.61	A
1	4.00	2	0.61	A
9	4.50	2	0.61	A B
7	6.00	2	0.61	B C
4	6.00	2	0.61	B C
10	6.50	2	0.61	C
2	6.50	2	0.61	C
12	6.50	2	0.61	C
8	7.00	2	0.61	C D
6	7.50	2	0.61	C D
5	8.50	2	0.61	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

La figura 3.39 presenta el número de plántulas para cada tratamiento empleado a partir de la prueba de parámetros de control en el SIT, se exhibe una formación de plántulas variable entre 8 y 17 plántulas generadas; en donde el tratamiento 5 (2 minutos, 4 horas y 3 brotes por SIT), presenta la mayor formación de plántulas lo que significa que todos los brotes ensayados en ese tratamiento generaron más de una plántula nueva.

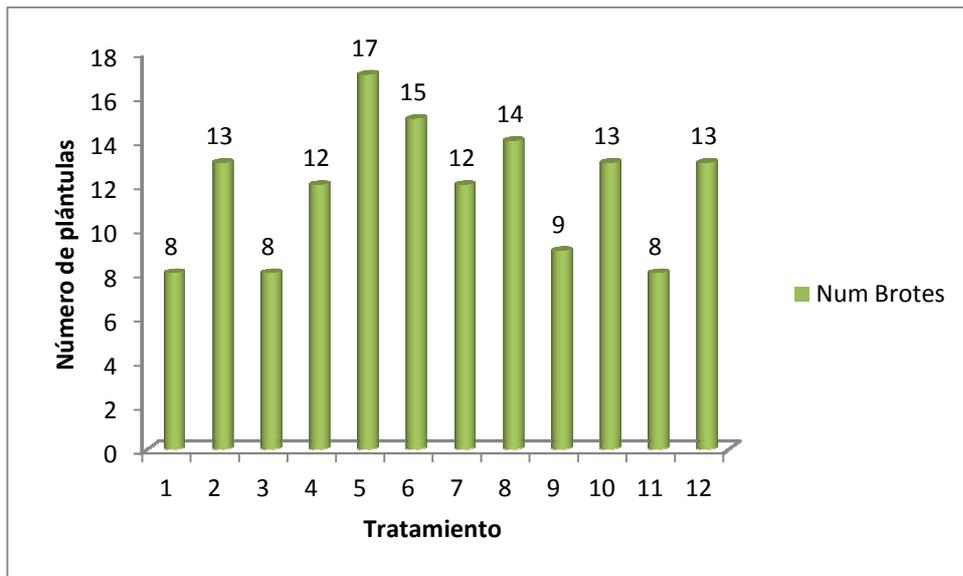


Figura 3.39 Número de plántulas formadas en la prueba de parámetros de control en el SIT

Para el análisis de la incidencia del tiempo de inmersión sobre el número de plántulas en el SIT, se realizó un análisis de varianza del que se obtuvo un valor de p de 0.0074 resultando también de alta significancia estadística. Respecto a la prueba de LSD Fisher se exhiben dos grupos estadísticos diferentes dentro de los cuales la inmersión de 1 y 3 minutos pertenecen al grupo A, mientras que 2 minutos de inmersión corresponde al grupo B (Tabla 3.47). Por otro lado, respecto a la frecuencia expresada en horas en el SIT, el ANOVA resultó con un valor de p de 0.313, por lo que no existe diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias empleadas y el número de plántulas generadas en el SIT (Anexo C.2.1).

Tabla 3.47 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para el número de plántulas generadas respecto al tiempo de inmersión en la prueba de parámetros de control en el SIT

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Num Brotes	24	0.37	0.31	22.21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21.58	2	10.79	6.25	0.0074
Tiempo Inmersión	21.58	2	10.79	6.25	0.0074
Error	36.25	21	1.73		
Total	57.83	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.36615

Error: 1.7262 gl: 21

Tiempo Inmersión	Medias	n	E.E.
1	5.13	8	0.46 A
3	5.38	8	0.46 A
2	7.25	8	0.46 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

Finalmente, en el ANOVA para el número de plántulas respecto a la densidad del inóculo ensayada se obtuvo un valor de p de 0.016 lo que indica el rechazo la hipótesis de igualdad de medias entre las densidades del inóculo (Tabla 3.48).

Tabla 3.48 Análisis de varianza para el número de plántulas respecto a la densidad del inóculo en la prueba de parámetros de control en el SIT

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Num Brotes	24	0.23	0.20	23.99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13.50	1	13.50	6.70	0.0168
Dens Inoculo	13.50	1	13.50	6.70	0.0168
Error	44.33	22	2.02		
Total	57.83	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.20188

Error: 2.0152 gl: 22

Dens Inoculo	Medias	n	E.E.
3	5.17	12	0.41 A
6	6.67	12	0.41 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

3.3.2.1.3 Longitud de plántulas

Para el análisis de longitud de plántulas en la prueba de parámetros en el SIT se categorizaron datos en cuatro niveles: plántulas de 0.1 a 2.05 cm corresponden al nivel 1, el nivel 2, brotes de 2.05 a 4.1 cm, nivel 3 plántulas de 4.1 a 6.15 cm y finalmente nivel 4 plántulas entre 6.15 y 8.2 cm (Tabla 3.50).

Se efectuaron análisis de varianza tanto para los tratamientos empleados en la prueba de parámetros de control en el SIT, como para cada uno de los factores por separado. En cuanto al ANOVA para la longitud las plántulas en el SIT y los tratamientos empleados, el valor de p encontrado corresponde al 0.102 (Tabla 3.49) por lo que no existe suficiente evidencia muestral y los tratamientos empleados son estadísticamente similares.

Tabla 3.49 Análisis de varianza para la longitud de las plántulas respecto a los tratamientos en el SIT

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Longitud plántulas	39	0.42	0.19	26.05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	50.58	11	4.60	1.81	0.1024
Tratamiento	50.58	11	4.60	1.81	0.1024
Error	68.65	27	2.54		
Total	119.22	38			

Para la variable longitud de las plántulas respecto a cada uno de los factores de la prueba de parámetros en el SIT se aplicaron análisis de varianza; para el caso de la incidencia del tiempo de inmersión se obtuvo un valor de ($p = 5.21\%$) (Anexo C.3.1) y para la densidad del inóculo se exhibe un valor de ($p = 4.52\%$) (Anexo C.3.3) mostrando así evidencia estadística significativa de los tiempos y densidades de inóculo ensayadas frente a la longitud obtenida de las plántulas en el SIT. Mientras que para la frecuencia en horas el valor de p encontrado corresponde a ($p = 20.71\%$) (Anexo C.3.2) lo que implica que el

valor obtenido no presenta suficiente evidencia muestral que permita rechazar la hipótesis de igualdad de medias por lo que la frecuencia de inmersión no influye directamente en la longitud alcanzada por las plántulas en el SIT.

Se generó un análisis de contingencia (Tabla 3.50) en el que se observa el porcentaje de ocurrencia para la longitud de plántulas categorizada en cuatro niveles para cada tratamiento ensayado en la prueba de parámetros de control en el SIT.

Tabla 3.50 Tabla de contingencia para longitud de plántulas generadas en la prueba de parámetros de control en el SIT

Tratamiento (Tiempo Frecuencia D. Inóculo)	% Longitud de brotes en el SIT				
	% Nivel 1	% Nivel 2	% Nivel 3	% Nivel 4	%Total
1 min 4 h 3 exp	0	50	0	50	5.1
1 min 4 h 6 exp	50	0	0	50	5.1
1 min 6 h 3 exp	0	0	0	100	5.1
1 min 6 h 6 exp	50	0	0	50	5.1
2 min 4 h 3 exp	0	0	18.2	81.8	28.2
2 min 4 h 6 exp	0	0	0	100	7.7
2 min 6 h 3 exp	0	0	50	50	15.4
2 min 6 h 6 exp	0	0	100	0	5.1
3 min 4 h 3 exp	0	0	100	0	7.7
3 min 4 h 6 exp	0	0	50	50	5.1
3 min 6 h 3 exp	0	0	50	50	5.1
3 min 6 h 6 exp	0	0	100	0	5.1
% Total	5.1	2.6	35.9	56.4	100.00

La figura 3.40 muestra un análisis que refleja de forma porcentual la longitud alcanzada por las plántulas en base a los diferentes niveles de categorización al aplicar los tratamientos de la prueba de control de parámetros en el SIT. Es así que el mayor porcentaje de de plántulas formadas, corresponde al 56.4% en el nivel 4 (4.1 y 8.2 cm).

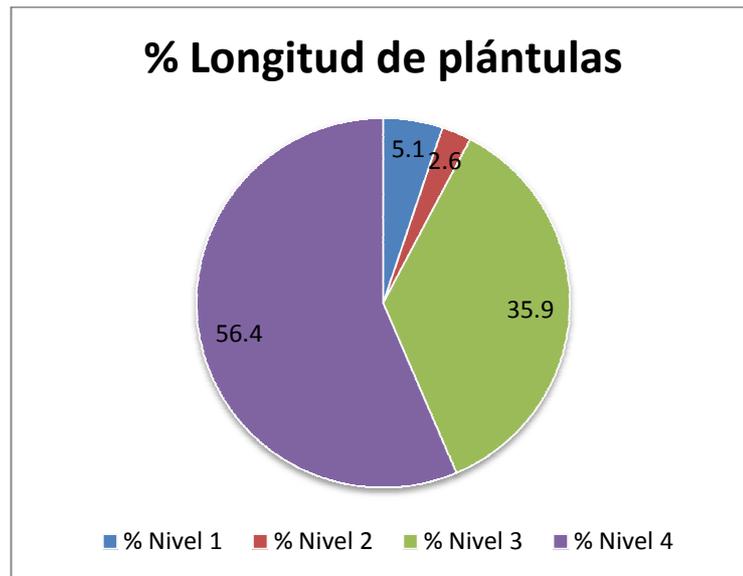


Figura 3.40 Porcentaje total por nivel para la longitud de plántulas en el SIT

3.3.2.1.4 Ancho de las hojas

Al aplicar la prueba de parámetros de control para el análisis del ancho de hojas se categorizaron los datos en cuatro niveles, en donde las hojas de 0.1 a 0.5 cm pertenecen al nivel 1, nivel 2, hojas de 0.5 a 1 cm, nivel 3 incluyen las hojas de 1 a 1.5 cm y al nivel 4 las hojas de 1.5 a 2 cm (Tabla 3.52). Se efectuó un ANOVA para los tratamientos empleados y reflejó un valor de p de 0.166, por lo que los tratamientos son estadísticamente similares.

Tabla 3.51 Análisis de varianza para el ancho de las hojas respecto a los tratamientos en el SIT

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ancho de hojas	39	0.39	0.14	41.49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.65	11	0.33	1.56	0.1669
Tratamiento	3.65	11	0.33	1.56	0.1669
Error	5.73	27	0.21		
Total	9.38	38			

Alternativamente, se realizaron ANOVA para el ancho respecto a los factores de la prueba de parámetros en el SIT. Respecto al tiempo de inmersión se obtuvo un valor de ($p = 23.32\%$) (Anexo C.4.1), mientras que para la frecuencia el valor de p encontrado corresponde a ($p = 57.81\%$) (Anexo C.4.2) y para la densidad del inóculo un valor de ($p = 2.49\%$). Para los dos primeros casos, los valores obtenidos no son estadísticamente diferentes al analizar la variable ancho de hojas por lo que el tiempo y frecuencia de inmersión no inciden sobre la variable. Por el contrario, el valor de p exhibido para la densidad del inóculo indica que el ancho de hojas está influenciado estadísticamente por este factor, encontrándose así dos grupos estadísticos en la prueba de LSD Fisher (Anexo C.4.3).

Tabla 3.52 Tabla de contingencia para el ancho de las hojas de plántulas generadas en la prueba de parámetros de control en el SIT

(Tiempo Frecuencia D. Inóculo)	Tratamiento	% Nivel 1	% Nivel 2	% Nivel 3	% Nivel 4	% Total
1 min 4 h 3 exp	1	0	50	50	0	100
1 min 4 h 6 exp	2	50	0	50	0	100
1 min 6 h 3 exp	3	0	0	0	100	100
1 min 6 h 6 exp	4	50	0	50	0	100
2 min 4 h 3 exp	5	0	0	54.5	45.5	100
2 min 4 h 6 exp	6	0	0	100	0	100
2 min 6 h 3 exp	7	0	50	16.7	33.3	100
2 min 6 h 6 exp	8	0	100	0	0	100
3 min 4 h 3 exp	9	0	33.3	66.7	0	100
3 min 4 h 6 exp	10	0	50	0	50	100
3 min 6 h 3 exp	11	0	50	0	50	100
3 min 6 h 6 exp	12	0	0	50	50	100
% Total		5.13	23.08	41.03	30.77	100

La figura 3.41 muestra los porcentajes generales del ancho de las hojas alcanzado para cada nivel categorizado al aplicar los tratamientos de la prueba de control de parámetros en el SIT. Es así que para el nivel de ancho de hojas 1, se encuentran el 5.13% de las plántulas, para el nivel 2 el 23.08% y el 41.03% y 30.77% para nivel 3 y 4 respectivamente; lo que indica un mayor porcentaje para el ancho de hojas entre 1 y 1.5 cm.

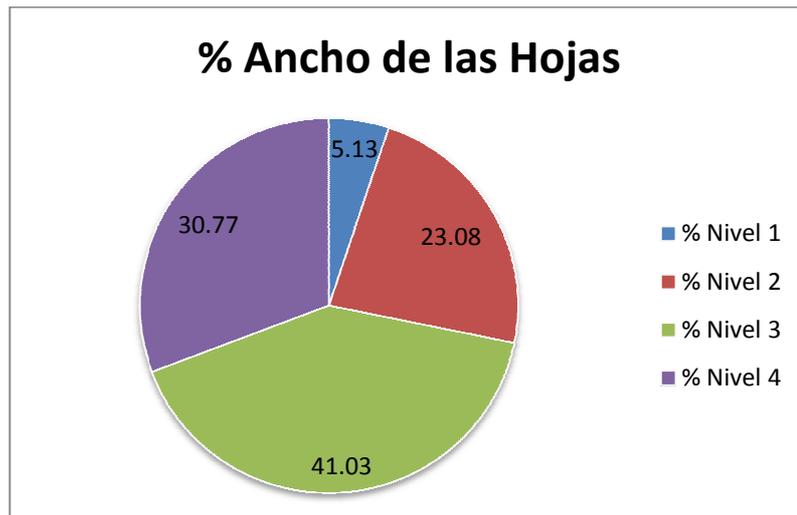


Figura 3.41 Porcentaje total por nivel para el ancho de las hojas de plántulas en el SIT

3.3.2.1.5 Índice de multiplicación

El índice o coeficiente de multiplicación corresponde a la razón entre la densidad del inóculo inicial y final, es decir las plántulas obtenidas tras el ciclo de multiplicación en el SIT. Se realizó un ANOVA para analizar la relación de los tratamientos en la prueba de parámetros de control en el SIT y el índice de multiplicación obteniéndose un valor p de 0.0015 (Tabla 3.53). En la prueba de LSD Fisher se encontraron dos grupos estadísticos, en el grupo A los tratamientos 4, 10, 12, 2, 6, 1, 8, 3, 11 y 9 y al grupo B los tratamientos 7 y 5.

Concluido el ciclo de inmersión en el SIT, a los 22 días de la inoculación, se observan coeficientes de multiplicación entre 1 y 3 (Figura 3.42), siendo el menor el obtenidos mediante la aplicación del tratamiento 4 (tiempo de inmersión= 1 min, frecuencia= 6 horas, densidad del inóculo= 6 explantes por unidad de SIT) y el mayor índice de multiplicación en el tratamiento 5 (tiempo de inmersión= 2 min, frecuencia= 4 horas, densidad del inóculo= 3 explantes por unidad de SIT).

Tabla 3.53 Análisis de varianza y LSD Fisher respecto al índice de multiplicación y los tratamientos de la prueba de parámetros de control

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Indice de multiplicación	24	0.86	0.73	15.10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2.98	11	0.27	6.55	0.0015
Tratamiento	2.98	11	0.27	6.55	0.0015
Error	0.50	12	0.04		
Total	3.48	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.44330

Error: 0.0414 gl: 12

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
4	1.09	2	0.14	A
10	1.09	2	0.14	A
12	1.09	2	0.14	A
2	1.09	2	0.14	A
6	1.17	2	0.14	A
1	1.17	2	0.14	A
8	1.17	2	0.14	A
3	1.33	2	0.14	A
11	1.33	2	0.14	A
9	1.50	2	0.14	A
7	2.00	2	0.14	B
5	2.17	2	0.14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

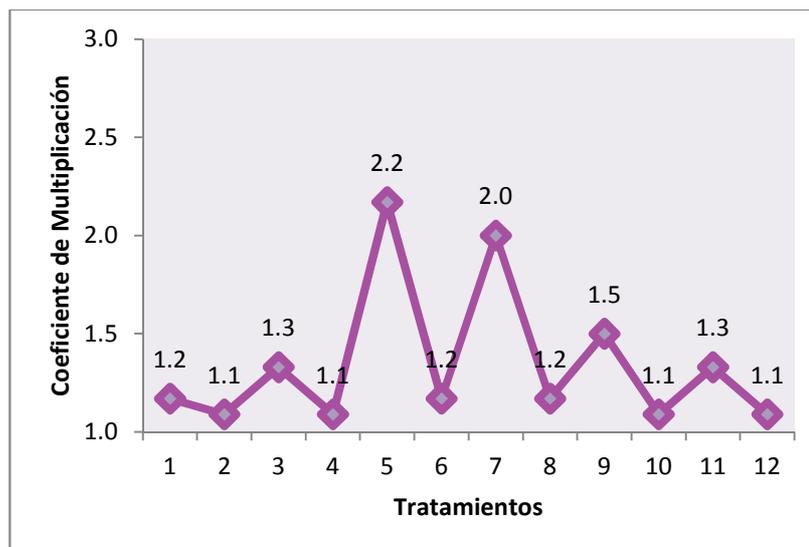


Figura 3.42 Coeficientes de multiplicación obtenidos en la prueba de parámetros de control en el SIT transcurridos 22 días de la inoculación

Al analizar individualmente cada uno de los factores implicados en la prueba de parámetros en el SIT, se encontraron diferentes valores de p en los ANOVA. Es así que para la frecuencia de inmersión, expresada en horas, el valor ($p = 0.867$) mayor al nivel de significancia implica la inexistente evidencia muestral suficiente para el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias (Anexo C.5.1). Adicionalmente, el ANOVA para las interacciones entre los factores frecuencia, tiempo de inmersión y densidad de inóculo, muestran que únicamente la interacción tiempo de inmersión vs densidad del inóculo exhibe un valor $p < 0.05$, por lo que estos dos factores inciden directamente sobre el coeficiente de multiplicación (Tabla 3.54). Así en el ANOVA por factores, los valores para tiempo de inmersión y densidad del inóculo corresponden a $p = 0.034$ (Anexo C.5.2) y $p = 0.001$ (Anexo C.5.3) respectivamente. Dichos valores al ser menores que el nivel de significancia, se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias entre los tiempos y densidades del inóculo ensayados lo que implica que dichos factores infieren en los coeficientes de multiplicación obtenidos. Es así que se encuentran grupos estadísticos diferentes entre los valores ensayados.

Tabla 3.54 Análisis de varianza para la interacción de los parámetros de control en el SIT sobre el índice de multiplicación

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Índice de multiplicación	24	0.86	0.73	15.10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2.98	11	0.27	6.55	0.0015
Frecuencia	4.5E-03	1	4.5E-03	0.11	0.7463
Tiempo inmersión	0.95	2	0.48	11.53	0.0016
Dens Inoculo	1.32	1	1.32	31.90	0.0001
Frecuencia*Tiempo inmersió..	0.04	2	0.02	0.44	0.6548
Frecuencia*Dens Inoculo	0.01	1	0.01	0.12	0.7316
Tiempo inmersión*Dens Inoc..	0.62	2	0.31	7.54	0.0076
Frecuencia*Tiempo inmersió..	0.04	2	0.02	0.45	0.6469
Error	0.50	12	0.04		
Total	3.48	23			

3.3.2.2 Prueba de medios de cultivo para multiplicación en el SIT

Una vez ensayados los parámetros de control en el SIT, se obtuvieron los siguientes resultados al ensayar diferentes medios de cultivo para la multiplicación en este sistema, evaluando las mismas variables descritas anteriormente.

3.3.2.2.1 Presencia o ausencia de plántulas

Se realizó una prueba de chi – cuadrado (Tabla 3.55) en la que se encuentra un valor p de 0.0056 correspondiente a significancia estadística alta que representa la dependencia de la presencia o ausencia de plántulas generadas ante la aplicación de los diferentes tratamientos de medios de multiplicación en el SIT.

Tabla 3.55 Prueba chi – cuadrado para la presencia/ausencia de plántulas aplicando los tratamientos de multiplicación en el SIT

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	14.59	4	0.0056
Chi Cuadrado MV-G2	17.39	4	0.0016

La prueba descrita, se realizó en base a la tabla de contingencia generada en donde se indica un porcentaje mayor de presencia de nuevas plántulas siendo este un 82.2% (Tabla 3.56). En la figura 3.43, se observa el 100% de apareamiento de nuevas plántulas para los tratamientos 3, 4 y 5 que contienen 2, 2.5 y 3 mgL⁻¹ de bencilaminopurina respectivamente.

Tabla 3.56 Porcentajes de ausencia y presencia de plántulas al ensayar los tratamientos de multiplicación en el SIT

Tratamientos mgL-1		% Ausencia	% Presencia	% Total
0 BAP, 0.1 ANA, 5 BR	1	44.4	55.6	100.0
1 BAP, 0.1 ANA, 5 BR	2	44.4	55.6	100.0
2 BAP, 0.1 ANA, 5 BR	3	0	100	100.0
2.5 BAP, 0.1 ANA, 5 BR	4	0	100	100.0
3 BAP, 0.1 ANA, 5 BR	5	0	100	100.0
% Total		17.8	82.2	100.0

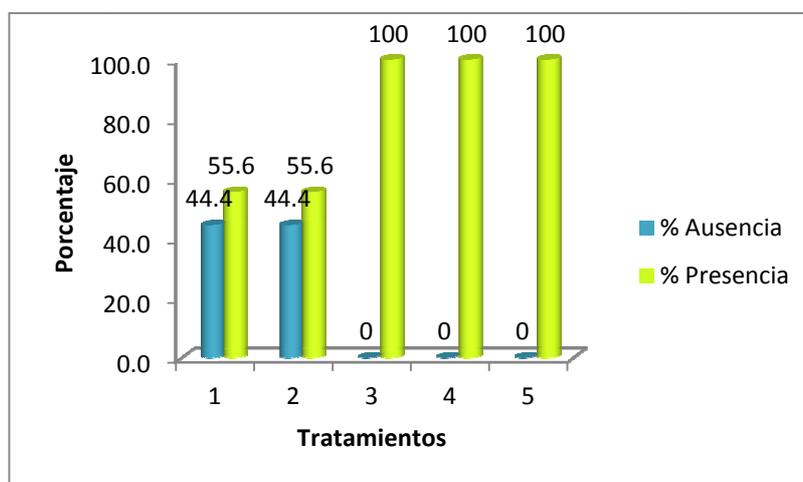


Figura 3.43 Porcentaje de formación de plántulas en la multiplicación en el SIT

3.3.2.2.2 Número de plántulas

Se efectuó un análisis de varianza ANOVA, para la relación de los tratamientos de multiplicación en el SIT y esta variable obteniéndose un valor ($p < 0.0001$), por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias entre los tratamientos aplicados (Tabla 3.57). Respecto a la prueba de LSD Fisher, se encontraron cuatro grupos estadísticamente diferentes, entre ellos se destaca el tratamiento 4 que presenta el más alto valor de la media entre los tratamientos ensayados.

Tabla 3.57 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para la relación de los tratamientos de multiplicación en el SIT y el número de plántulas.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Num Plántulas	45	0.80	0.78	29.11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	198.53	4	49.63	39.18	<0.0001
Tratamiento	198.53	4	49.63	39.18	<0.0001
Error	50.67	40	1.27		
Total	249.20	44			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=1.07228

Error: 1.2667 gl: 40

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	1.67	9	0.38	A
2	1.78	9	0.38	A
5	3.44	9	0.38	B
3	5.33	9	0.38	C
4	7.11	9	0.38	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

La figura 3.44 presenta el número de plántulas obtenidas tras la aplicación de los diferentes medios de cultivo en el SIT. Se encuentra una mayor generación de plántulas para el tratamiento 4 con 64 nuevas plantas generadas.

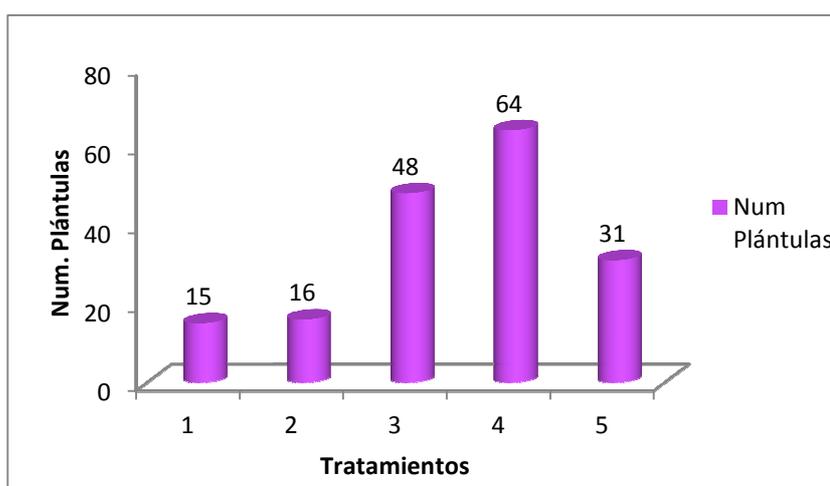


Figura 3.44 Número de plántulas desarrolladas en la multiplicación en el SIT

3.3.2.2.3 Longitud de las plántulas

Para el análisis de longitud de las plántulas generadas tras la aplicación de diferentes medios de multiplicación en el SIT, se realizó una categorización de los datos valorando la longitud de los brotes en cuatro niveles. Es así que se encuentran en el nivel 1 las plántulas de 4 a 5.37 cm, al nivel 2 plántulas entre 5.37 y 6.75 cm, de 6.75 a 8.12 cm corresponde el nivel 3 y el nivel 4 las plántulas de 8.12 a 9.5 cm de longitud.

Se efectuó un ANOVA para analizar la relación de los diferentes tratamientos de multiplicación en el SIT y la longitud de las plántulas generadas en los biorreactores. Se encontró un valor de ($p < 0.0001$) lo que indica la dependencia estadística entre los tratamientos aplicados y la variable longitud de plántulas (Tabla 3.58). En cuanto a la prueba de LSD Fisher, se exhiben dos grupos estadísticamente diferentes por lo que la diferencia de medias encontrada en esta prueba indica que los tratamientos aplicados inciden de forma diferente sobre la longitud alcanzada por las plántulas en la multiplicación en el SIT.

Tabla 3.58 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para los tratamientos de multiplicación en el SIT y la longitud de las plántulas generadas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Longitud plántulas	129	0.20	0.18	17.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	34.73	4	8.68	7.87	<0.0001
Tratamiento	34.73	4	8.68	7.87	<0.0001
Error	136.83	124	1.10		
Total	171.56	128			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.68976

Error: 1.1035 gl: 124

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
2	5.53	7	0.40	A
5	5.54	22	0.22	A
3	5.78	39	0.17	A
1	6.25	6	0.43	A B
4	6.73	55	0.14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

La figura 3.45 muestra los porcentajes por niveles alcanzados, es así que únicamente para el tratamiento 4 se encuentra un porcentaje de plántulas en el nivel 4 de longitud, correspondiente 10.9% del inóculo inicial.

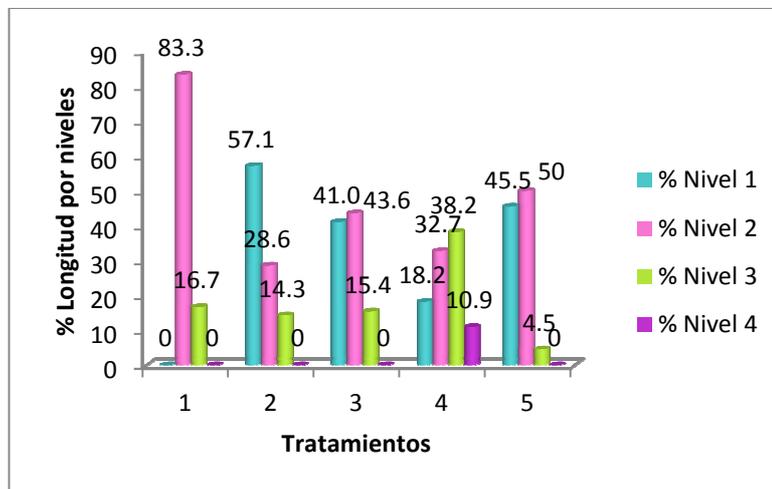


Figura 3.45 Porcentaje de longitud de plántulas en la multiplicación en el SIT

Por otro lado, la figura 3.46 muestra los porcentajes totales de longitud alcanzada por las plántulas en los diferentes niveles en la multiplicación en el SIT, en donde se destaca el 41.1% de las plántulas sembradas en los cinco tratamientos aplicados pertenecientes al nivel categorizado como 2.

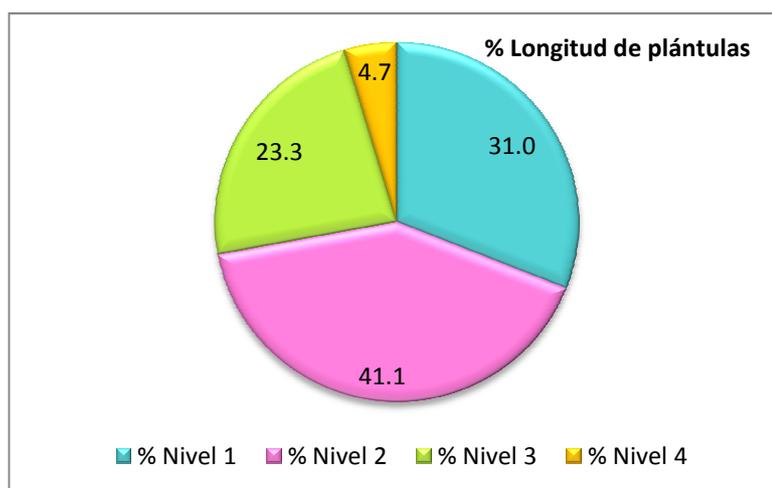


Figura 3.46 Porcentaje total por nivel de la longitud de plántulas en la multiplicación en el SIT

3.3.2.2.4 Ancho de las hojas de las plántulas

Al igual que para la variable longitud de las plántulas, se categorizaron los datos de ancho de las hojas de las plántulas generadas en los ensayos de multiplicación el SIT al emplear los diferentes tratamientos. De allí que para el nivel 1 corresponden hojas entre 0.5 y 0.87 cm de ancho, de 0.87 a 1.25 cm en el nivel 2, para el nivel 3 1.25 a 1.62 cm y para el nivel 4 hojas con un ancho de 1.62 a 2 cm.

Se realizó un análisis de varianza para los tratamientos empleados y la variable, obteniéndose un valor ($p < 0.0001$) siendo menor al nivel de significancia de la prueba nominal $\alpha=5\%$ lo que corresponde a una alta significancia estadística en la que la variable ancho de las hojas es dependiente a los diferentes tratamientos ensayados (Tabla 3.59). Respecto a la prueba de LSD Fisher se encuentran tres grupos estadísticos diferentes, en los cuales el tratamiento 5 y el 4 pertenecen a un solo grupo estadístico diferente A y C respectivamente, mientras que el tratamiento 3 comparte el grupo A y B y los tratamientos 2 y 1 a los grupos B y C.

Tabla 3.59 Análisis de varianza y prueba de LSD Fisher para el ancho de las hojas respecto a los tratamientos de multiplicación en el SIT

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ancho de hojas	129	0.19	0.17	30.69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.20	4	0.80	7.36	<0.0001
Tratamiento	3.20	4	0.80	7.36	<0.0001
Error	13.48	124	0.11		
Total	16.69	128			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.21653

Error: 0.1087 gl: 124

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
5	0.83	22	0.07	A
3	0.97	39	0.05	A B
2	1.06	7	0.12	A B C
1	1.17	6	0.13	B C
4	1.24	55	0.04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

La figura 3.47 presenta diferentes porcentajes de plántulas que alcanzaron un determinado ancho de sus hojas expresada en niveles respecto a los cinco diferentes tratamientos de multiplicación en el SIT. Únicamente el tratamiento 4 presenta plántulas con hojas de un ancho categorizado bajo el nivel 4 con un 12.7% del inóculo inicial ensayado.

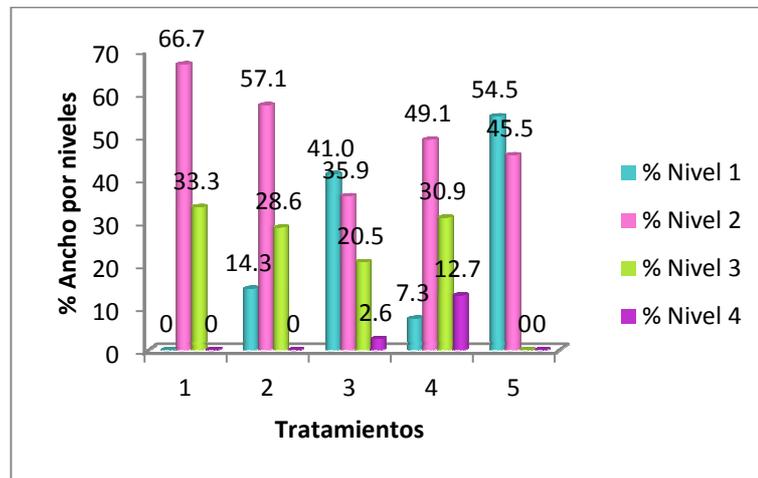


Figura 3.47 Porcentaje de ancho de hojas de las plántulas en la multiplicación en el SIT

Por otro lado, la figura 3.48 muestra los porcentajes totales de ancho de las hojas de las plántulas obtenidas en el SIT en los diferentes niveles categorizados para esta variable; en donde el nivel 2 se destaca con la mayoría de plántulas con un ancho de hojas en el nivel 2.

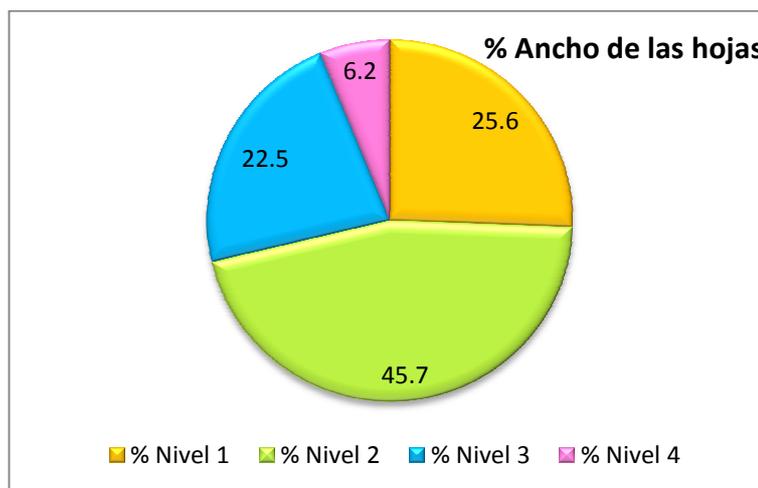


Figura 3.48 Porcentaje total por nivel para el ancho de las hojas de las plántulas en la multiplicación en el SIT

3.3.2.2.5 Índice de multiplicación

En relación al índice de multiplicación obtenido tras la utilización de diferentes medios de cultivo para la multiplicación en el SIT, se realizó un análisis de varianza para evaluar la relación de los tratamientos empleados y esta variable. Se obtuvo un valor de ($p < 0.0001$) lo que implica la existencia de diferencias estadísticas significativas (Tabla 3.60). En cuanto a la prueba de LSD Fisher, se encontraron cuatro grupos estadísticos, donde se observa que el tratamiento 1 y 2 pertenecen al grupo A, el tratamiento 5 al grupo B y el tratamiento 3 y 4 a los grupos C y D respectivamente; de allí que el índice de multiplicación evidencia dependencia a las diferentes concentraciones de BAP empleadas en los tratamientos.

Tabla 3.60 Análisis de varianza y prueba LSD Fisher para el índice de multiplicación en la aplicación de los tratamientos en el SIT

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Índice de multiplicación	15	0.98	0.97	9.55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	66.52	4	16.63	122.27	<0.0001
Tratamiento	66.52	4	16.63	122.27	<0.0001
Error	1.36	10	0.14		
Total	67.88	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.67091

Error: 0.1360 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	1.63	3	0.21	A
2	1.80	3	0.21	A
5	3.43	3	0.21	B
3	5.30	3	0.21	C
4	7.13	3	0.21	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

La figura 3.49 muestra la variación del coeficiente de multiplicación en los diferentes medios de cultivo empleados en el SIT transcurridos 22 días posteriores a la inoculación. El índice se encuentra alrededor de 1 y 7, siendo el tratamiento 1 el de índice 1.63 y el tratamiento 4 de 7.13.

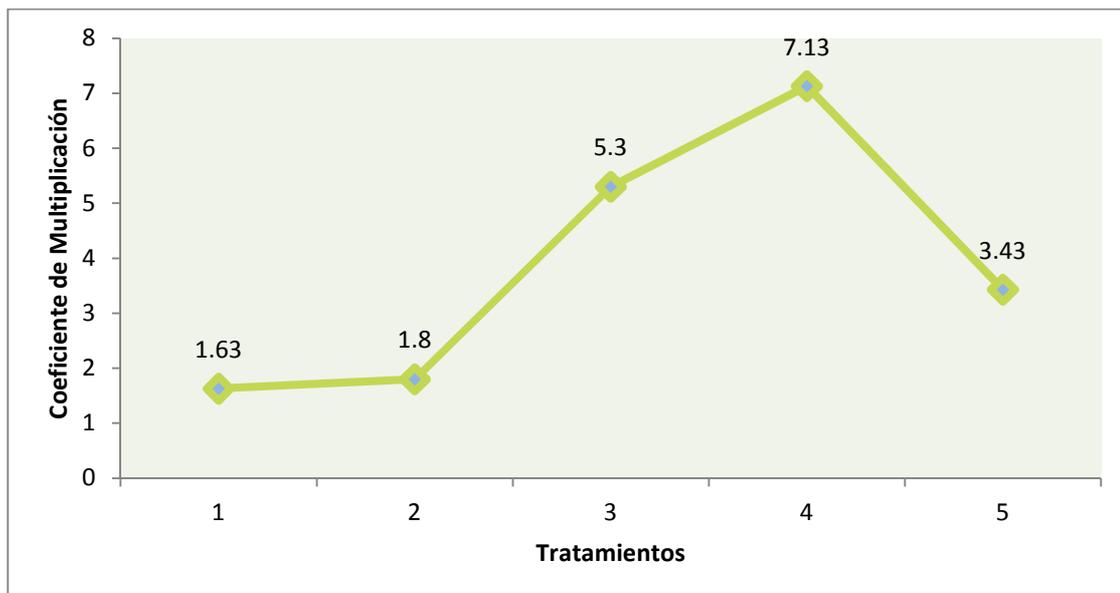


Figura 3.49 Coeficiente de multiplicación en el Sistema de Inmersión Temporal tras 22 días de la inoculación.

La figura 3.50 muestra los promedios de longitud de las plántulas y ancho de sus hojas incluido el coeficiente de multiplicación en cada tratamiento ensayado en el SIT, en donde se observa que el tratamiento 4 (2.5 mgL^{-1} de BAP) se destaca por un mayor promedio de longitud de las plántulas formadas, siendo éste de 6.73 cm, mientras que el menor promedio (3.75cm) de longitud se da en el tratamiento 2 (1 mgL^{-1} de BAP). De igual forma, para el ancho de las hojas el tratamiento en donde se obtuvo un mayor promedio es el que emplea 2.5 mgL^{-1} de BAP y el tratamiento 2 exhibe una disminución en el promedio alcanzando únicamente un 0.67 cm de ancho de sus hojas.

Por otro lado, se realizó un análisis que permitiera observar la relación del índice de multiplicación correspondiente a cada uno de los tratamientos en el SIT frente al promedio de longitud de plántulas y ancho de sus hojas, con la finalidad de determinar si este coeficiente es afectado por el crecimiento de las plántulas en el SIT. Como se observa en la figura 3.51, el crecimiento de las plántulas en longitud no implica un decrecimiento en el índice de multiplicación, es decir para esta investigación, se observa la misma tendencia ascendente

entre estas dos variables. Mientras que para el ancho de las hojas de las plántulas formadas, no se encuentra incidencia sobre el coeficiente de multiplicación.

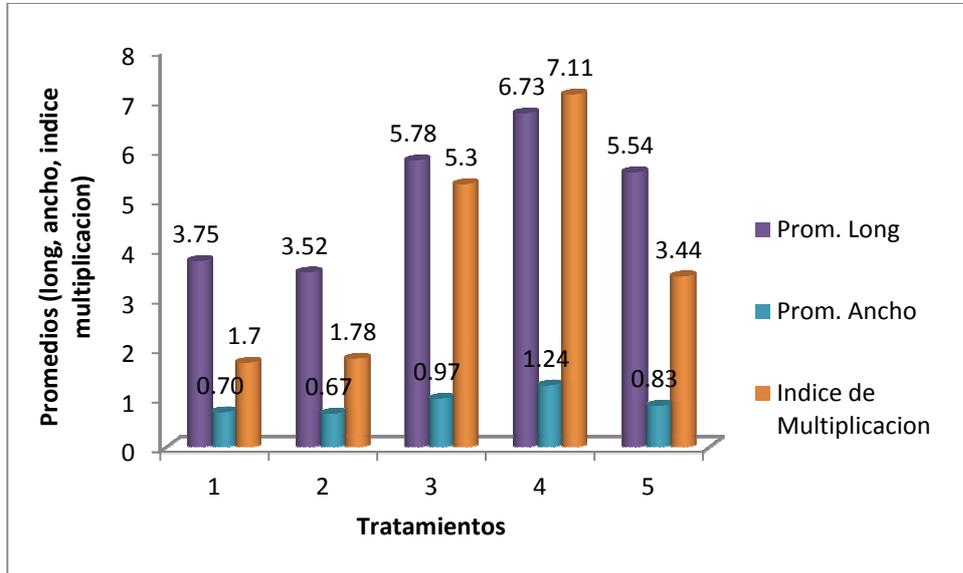


Figura 3.50 Índice de multiplicación y promedios de longitud de las plántulas y ancho de las hojas en el SIT

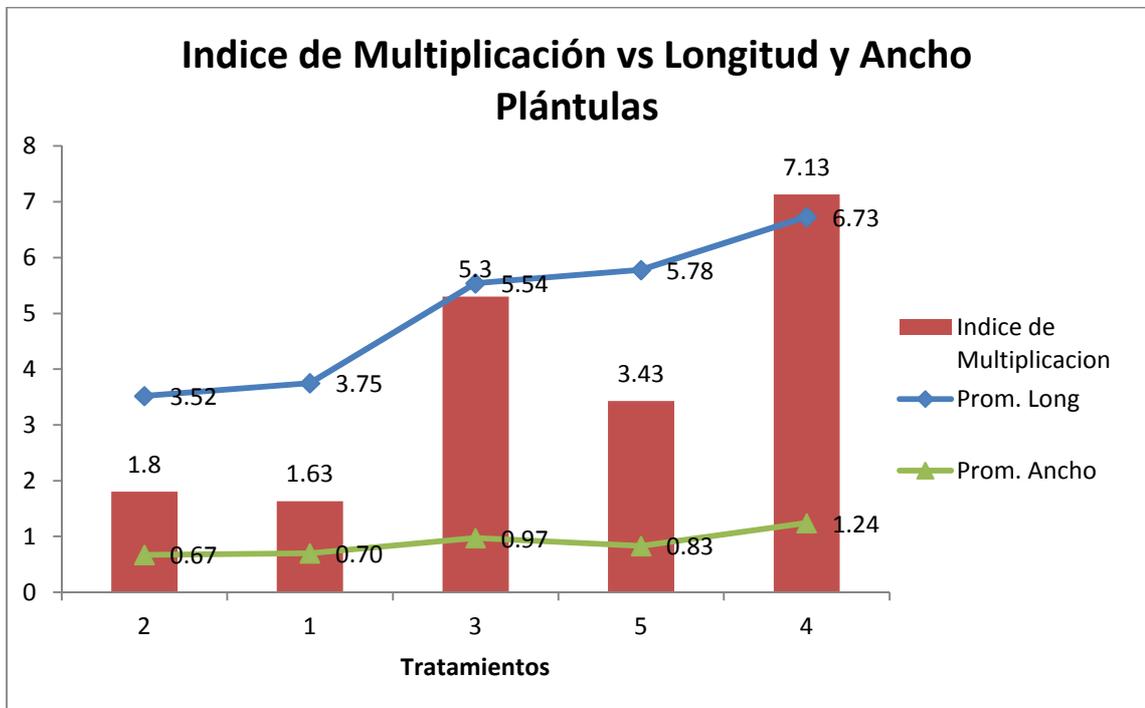


Figura 3.51 Contraste entre el índice de multiplicación frente al promedio de longitud de las plántulas y ancho de las hojas en el SIT.

Por otro lado, se efectuó el análisis presentado a continuación con la finalidad de observar el comportamiento del índice de multiplicación teórico frente a las concentraciones de bencilaminopurina ensayadas en la fase de inducción de la presente investigación; tal que, como lo muestra la tabla 3.61, se incluyen concentraciones de 0 a 1.5 mgL⁻¹ ensayadas en dicha fase y en la multiplicación convencional (1.5 mgL⁻¹), además de una concentración de 2 y 2.5 mgL⁻¹ de BAP ensayada en el las pruebas de medios en el SIT. La tendencia observada mediante regresión lineal indica los índices de multiplicación extrapolados para las dos concentraciones mediante la ecuación, como lo indica la figura 3.52. Con ello se muestra que el coeficiente de proliferación teórico resultante mediante multiplicación convencional no supera al obtenido en la prueba de medios empleando el SIT.

Tabla 3.61 Índices de multiplicación correspondientes a la fase de inducción al analizar las concentraciones de 0 – 1.5 mgL⁻¹ de BAP

[BAP] mgL⁻¹	Índice Multiplicación
0	0.67
1	0.88
1.5	1.07
2	1.18*
2.5	1.30*

*Datos obtenidos mediante ecuación

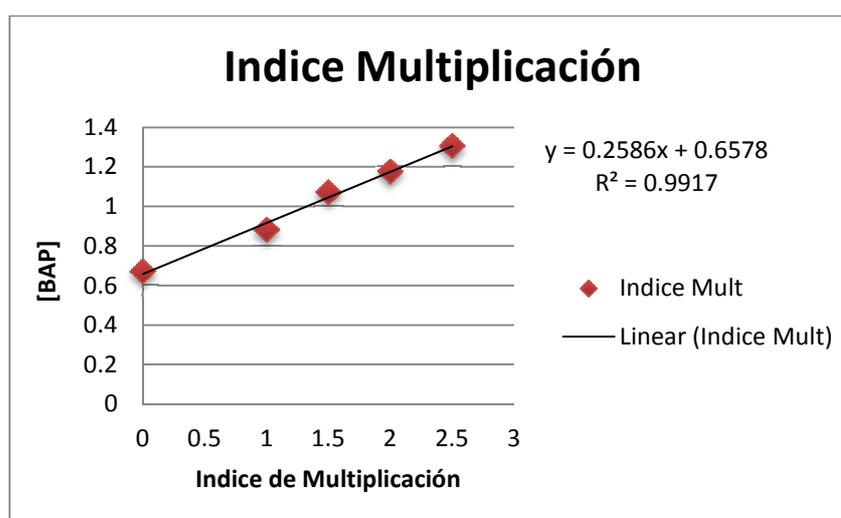


Figura 3.52 Regresión lineal del índice de multiplicación frente a las concentraciones de BAP ensayadas

3.3.2.3 Análisis de costos de producción

Se consideró necesario el realizar un análisis de costos de producción tomando en cuenta recursos económicos e inversión en tiempo, con la finalidad de contrastar la propagación de plántulas mediante el método convencional y la propagación empleando SIT, utilizando los datos obtenidos en la presente investigación. Para ello, se consideró dentro del rubro de costo por litro de medio (Costo usd/L) a todos los componentes del medio de Murashige&Skoog mas vitaminas y reguladores de crecimiento, que para el caso del SIT se descartó el valor de gasto del agente gelificante.

Tabla 3.62 Comparación del costo final por plántula obtenida mediante la propagación convencional versus el SIT.

Técnica	Periodos	Explantos	Vol (L) necesario	Costo (usd/L)	Total (usd/L)	Plántulas
Propagación convencional	Ciclo A	100	3	2.392	7.249	118
	Ciclo B	118	4	2.392	8.554	160
	Ciclo C	160	5	2.392	11.633	270
	Ciclos de 1 mes cada uno			TOTAL	27.436	270
	Tiempo total de multiplicación = 3 meses			Costo (usd /planta)	0.1018	270
Sistema de Inmersión Temporal	Ciclo A	100	17	0.376	6.269	711
	Ciclo B	711	119	0.376	44.575	5055
	Ciclo C	5055	843	0.376	316.931	35943
	Ciclos de 1 mes cada uno			TOTAL	367.776	35943
	Tiempo total de multiplicación = 3 meses			Costo (usd /planta)	0.0102	35943

Es así que como lo muestra la tabla 3.62, para la propagación convencional, una vez realizados tres subcultivos, o ciclos de multiplicación de un mes cada uno, se obtienen 270 plántulas con un coste individual de 0.10 usd; mientras que para el SIT, dentro de tres ciclos de cultivo en este sistema, se obtienen 35943 plántulas con un coste por plántula de 0.010 usd. Tal que se obtiene que la relación costo SIT/propagación convencional es de 10 a 1 obteniéndose aproximadamente 133 veces más plántulas en el SIT, que por el método convencional en el mismo tiempo empleado.

CAPITULO 4: DISCUSION

4.1 Fase de desinfección

4.1.1 Contaminación

La fase de desinfección de los explantes previo su ingreso al sistema *in vitro*, constituye un paso crítico para el establecimiento de un determinado cultivo. Es así que explantes no provenientes de invernadero tienden a presentar problemas de contaminación (Pierik, 1990). Por ello, es necesario establecer protocolos de desinfección que permitan lograr una descontaminación significativa del material vegetal previa su introducción al sistema *in vitro* (Roca y Mroginski, 1993).

Con la finalidad de contrarrestar los efectos de la contaminación de explantes previo su ingreso al sistema *in vitro*, se debe acudir a diferentes sustancias químicas que comúnmente corresponden a ciertos agentes desinfectantes cuya aplicación permite controlar la acción de microorganismos. Dichos agentes constituyen de forma típica el etanol, hipocloritos de sodio o calcio, cloruro de mercurio y fungicidas/bactericidas (Roca y Mroginski, 1993).

Por otro lado, se debe considerar que las sustancias desinfectantes escogidas para realizar la introducción dependerán directamente del tipo de explante y especie vegetal en estudio. De allí que los explantes desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio, se someterán a concentraciones que varíen de acuerdo a las características mencionadas en un determinado tiempo de inmersión, tal que, por ejemplo, las hojas requerirán un tiempo de inmersión menor al empleado para una desinfección típica de semillas (Wiley, 2008).

En base a lo mencionado, los dos tipos de protocolos de desinfección escogidos para hojas y segmentos nodales – yemas fueron determinantes a la hora de introducir los explantes al sistema *in vitro*. En cuanto a hojas, no se encontró diferencia estadística entre los tratamientos empleados sobre la contaminación, no obstante; el tratamiento 1 (0.4% NaClO – 6 minutos) permitió la descontaminación total de los explantes ensayados pese a que el mínimo porcentaje de descontaminación fue del 83.3% con lo que se explica la independencia estadística exhibida entre los tratamientos ensayados. Por otro lado, en cuanto a segmentos nodales, el mayor porcentaje de descontaminación (100% no contaminados) se encontró en los tratamientos 1 y 3 correspondientes a 0.7% NaClO - 8 minutos de inmersión y 0.8% NaClO – 8 minutos de inmersión respectivamente, sin embargo; la dependencia estadística es atribuida únicamente al tiempo siendo más eficaz una inmersión de 8 minutos, con lo que se confirma lo descrito anteriormente por Wiley (2008) quien enuncia que tiempos de inmersión menos prolongados resultan más eficientes sobre la contaminación frente a las concentraciones del agente desinfectante (NaClO). Finalmente, para yemas de cilantro cimarrón, no se evidenció estadísticamente la dependencia de las concentraciones de cloro y tiempos de inmersión como influencias directas sobre la contaminación, pese a ello, se obtuvo un 90.9% de explantes no contaminados al emplear el tratamiento 3 (0.8% NaClO – 8 minutos de inmersión), no obstante el menor porcentaje de descontaminación corresponde al 72.7% de los explantes introducidos por lo que se obtuvo un alto porcentaje de éxito en esta fase.

4.1.2 Oxidación

Ciertas plantas, especialmente especies tropicales, tienden a presentar problemas de oxidación debido a su alta concentración de sustancias fenólicas (George, *et al.*, 2008), de allí que es importante evaluar el comportamiento de los explantes una vez realizada la desinfección

En cuanto a hojas, no se encontró dependencia estadística de la variable frente a los tratamientos de desinfección empleados, se exhibe una similitud entre las medias de los tratamientos de desinfección (Figura 3.10), sin embargo, para este tipo de explantes, ninguno de los tratamientos resultó con en el nivel 0 de la escala de oxidación propuesta en la metodología, es decir, todas las hojas produjeron compuestos fenólicos en determinado nivel.

En cuanto a segmentos nodales y yemas existe independencia estadística entre la variable oxidación y los tratamientos empleados. En segmentos nodales, se encuentra únicamente un 8.3% de explantes no oxidados (nivel 0) al ensayar el tratamiento 5 (0.9% NaClO – 8 minutos), mientras que los demás tratamientos presentan porcentajes altos, entre 50% y 80% de explantes en el nivel 1 de oxidación, característica propia de este tipo de explante; ya que a partir de explantes peciolares es común el apareamiento de compuestos fenólicos sobre el explante y medio de cultivo (Yasseen, 2002). Por otro lado, las yemas presentan menores porcentajes de oxidación al compararlos con hojas y segmentos nodales; es así que el mayor porcentaje de explantes no oxidados (nivel 0) se produjo al emplear el tratamiento seis (0.9% NaClO – 10 minutos de inmersión).

De forma global para hojas se observa una tendencia de menor oxidación fenólica al emplear bajas concentraciones de NaClO, puesto a que esta sustancia química es un potente oxidante (Wiley, 2008), que utilizado en altas concentraciones puede dar lugar a la necrosis total de un determinado tipo de explante. Mientras que para segmentos nodales y yemas la concentración óptima de NaClO corresponde a 0.8% obteniéndose únicamente 8% y 9% de explantes oxidados respectivamente. Sin embargo, se debe hacer una precisión respecto al tiempo de inmersión, en el caso de segmentos nodales el tiempo óptimo corresponde a 8 minutos, mientras que para yemas es de 10 minutos de inmersión.

Cabe recalcar, que los porcentajes de oxidación obtenidos corresponden a los explantes ensayados durante la fase de desinfección, en donde, como lo sugiere Yasseen (2002) se empleó polivinilpirrolidona (PVP) como aditivo lo que permite reducir el necrosamiento del tejido contrarrestando la presencia de compuestos fenólicos sobre el explante y en el medio de cultivo; ya que como se señaló al inicio de este apartado, las plantas tropicales como *Eryngium foetidum* presentan problemas de oxidación por la presencia de abundantes sustancias de este tipo. El antioxidante fue aplicado, además, debido a que en ensayos preliminares, la oxidación de los explantes de cilantro cimarrón resultaba más abundante en el medio de cultivo (datos no mostrados) haciendo así necesaria la aplicación de PVP y ácido ascórbico para combatir esa característica. Adicionalmente, como es indicado por George y colaboradores (2008) las células producen exudados fenólicos debido a senescencia producida en forma natural, o a causa de heridas o cortes en el tejido.

4.1.3 Viabilidad

El empleo de agentes desinfectantes, particularmente el NaClO, puede causar estrés fisiológico al ser un compuesto altamente oxidante para las plantas (Pierik, 1990), por lo que la viabilidad corresponde a una variable determinante a la hora de establecer un protocolo de desinfección adecuado para un tipo de explante de una especie vegetal en estudio. Adicionalmente, una desinfección agresiva, pese a que logre eliminar la contaminación por completo, no permite la obtención de explantes viables que potencialmente desarrollen plántulas en lo posterior (Peña, 2009). Sin embargo, esta es una variable sujeta directamente al criterio del observador, puesto a que, como se detalló en la metodología, la escala de viabilidad propuesta entre 1 (explante viable) y 5 (explante necrosado) es subjetiva al investigador.

En cuanto a la viabilidad analizada para hojas mediante un ANOVA, no se encuentra evidencia estadística que indique dependencia de la variable frente a los tratamientos de desinfección empleados. Tanto para el ANOVA de los tratamientos (Tabla A.3.1) como para el análisis de varianza respecto al

tiempo de inmersión (Tabla A.3.2), se encontró que únicamente el tratamiento 5 y un tiempo de inmersión de 6 minutos se exhibe un porcentaje muy bajo de de explantes en el nivel 1 de viabilidad (8.3%), mientras que para el resto de tratamientos un 0% de explantes resultaron viables; por lo que la respuesta de este tipo de tejido fue nula.

En esta investigación, el empleo de hojas de cilantro cimarrón presenta un comportamiento contradictorio al citado en bibliografía frente a la respuesta a procesos de desinfección de este tipo de explantes; ya que de acuerdo a Gayatri y colaboradores (2005), las hojas de esta especie permiten la regeneración de plantas a través de callo tras la aplicación de protocolos de desinfección aún más agresivos que los empleados en la presente investigación. Es así que Gayatri y colaboradores (2005) indican un 38% de respuesta a la iniciación de brotación para hojas una vez transcurridos 15 días de la siembra, en contraste con esta investigación en donde no se obtuvo respuesta embriogénica u organogénica que diera lugar a la formación de brotes a partir de este tejido.

En cuanto a la viabilidad de segmentos nodales, no se encontró dependencia estadística en los ANOVA realizados para tratamientos y para concentración de NaClO y tiempo de inmersión. Al analizar la concentración de hipoclorito de sodio, se encontró que la mayoría de los explantes se ubicaron en el nivel 2 de la escala propuesta, es decir a un 75% de viabilidad al emplear concentraciones de 0.7% y 0.8% del desinfectante; mientras que a una concentración de 0.9%, existen diferentes porcentajes de explantes ubicados en la escalas de viabilidad 1 – 5, siendo predominante la necrosis del tejido (nivel 5) en un 33.3% de segmentos nodales. De la misma manera para el análisis del tiempo de inmersión, el 38.9% de los segmentos nodales empleados se ubicó en el nivel 2 de viabilidad; sin embargo, en el tiempo de inmersión de 10 minutos es predominante una viabilidad asignada en la escala como 5 (necrosis) del 38.9% de los explantes.

Para yemas de cilantro cimarrón, los análisis de varianza realizados, no declaran dependencia estadística de la viabilidad respecto a los tratamientos como para el análisis de cada factor (NaClO y tiempo de inmersión). La viabilidad de yemas frente a los protocolos de desinfección empleados exhibe porcentajes totales variables entre las diferentes escalas de viabilidad planteadas (Tabla A.3.3), sin embargo, se destaca un 31.8% de explantes que presentan viabilidad en el nivel 1, es decir 100% viables.

Adicionalmente, en el análisis porcentual de viabilidad respecto a la concentración de cloro, se obtiene que para la concentración de 0.7% se encuentra un 31.8% de explantes viables, mientras que para la concentración 0.8%, los explantes ensayados presentan viabilidad entre el nivel 1 y 5 en porcentaje de 31.8% para cada escala. Finalmente, la concentración 0.9% de NaClO, pese a diferenciarse únicamente en 0.1% a la anterior, presenta diferencia en cuanto a viabilidad, ya que el 22.7% de los explantes se ubica en viabilidad menor al 100% (Figura A.3.12). El tiempo de inmersión, en contraste con lo observado en hojas, permite una mayor supervivencia de las yemas al ser sometidas a una exposición al cloro por 10 minutos, obteniéndose un 39.4% de explantes 100% viables; lo que puede atribuirse a que la planta madre, provee de yemas vigorosas y jóvenes, que son adecuadas para el proceso *in vitro* y resisten las condiciones de desinfección, en contraste con las hojas, que al ser los primeros tejidos en proliferar en las plantas de campo, su edad fisiológica no permite un adecuado crecimiento y el tejido tiende a necrosarse (Olmos, Luciani y Galdeano, 2004).

Al relacionar los tratamientos de desinfección con la contaminación, oxidación y viabilidad de cada uno de los explantes ensayados, se obtuvo que para el caso de hojas, desinfecciones más agresivas dan como resultado menores porcentajes de contaminación pero no permiten la supervivencia del explante, es así que un 0% de contaminación, oxidación y muerte (Figura 3.18) se obtuvo para la aplicación del tratamiento 1 en hojas, es decir 0.4% de NaClO y 6 minutos de inmersión. Pese al éxito de este tratamiento, y como se

mencionó previamente, este tipo de explante no respondió de forma favorable en el medio de cultivo, por lo que se descartó su utilización en fases posteriores, característica que puede ser atribuida a que como lo menciona Gayatri y colaboradores (2005) la regeneración de plántulas de *E. foetidum* a partir de hojas maduras se ha obtenido particularmente a partir de callo, objetivo que no se persigue en la presente investigación.

En cuanto a segmentos nodales y yemas, se seleccionaron como tratamientos de desinfección óptimos una concentración de 0.8% NaClO – 8 minutos y 0.8% NaClO – 10 minutos respectivamente. Para el caso de segmentos nodales como explante, la contaminación en este tratamiento fue de 0% y un 8% de oxidación y muerte; mientras que para yemas, pese a existir 18% de explantes contaminados, el porcentaje de supervivencia es alto al compararlo con los demás tratamientos, por lo que se escogió como protocolo para futuras introducciones de ese tipo de tejido, justificándose en lo citado por Jaramillo (2008) que indica que el conseguir un 0% de de contaminación no es indicador necesario de un tratamiento óptimo, puesto que se debe considerar también factores como supervivencia, capacidad de generación de estructuras foliares, oxidación, entre otros.

4.2 Fase de inducción

En la fase de inducción se evaluaron las concentraciones de los diferentes reguladores de crecimiento como tratamientos, además de evaluar las hormonas (BAP, AIA, ANA) por separado frente a cada variable con la finalidad de determinar su inferencia sobre los explantes.

4.2.1 Inducción a brote

En cuanto a segmentos nodales, no se encontró dependencia estadística de la formación de brotes respecto a los tratamientos de inducción,

ni tampoco en relación a cada factor. Al analizar los tratamientos se obtuvo un porcentaje global de únicamente 25% de formación de brotes a partir de este tipo de explante. El mayor porcentaje de formación de brotes fue encontrado en el tratamiento 7 con el 58.3%, mientras que el tratamiento control (0 mgL⁻¹ BAP, 0 mgL⁻¹ AIA, 0 mgL⁻¹ ANA) exhibió el menor porcentaje de presencia de brotes (8.3%).

Al analizar la concentración de los reguladores de crecimiento por separado, se obtuvo que la concentración de 1.5 mgL⁻¹ de BAP permite la formación de un 30% de brotes, sin embargo las concentraciones aplicadas no son determinantes para la presencia o ausencia de brotes de *E. foetidum*. Por otro lado, el ácido indolacético (AIA) permitió la formación de brotes en un 33.3% en concentraciones de 0.2 mgL⁻¹ al contrario del ácido naftalenacético (ANA) que indujo a la formación de un 37.5% de brotes en concentración de 0.1 mgL⁻¹ de la hormona. A pesar de que el AIA y ANA son dos auxinas, el ácido naftalenacético presenta, para el caso de segmentos nodales, un mayor apareamiento de brotes al contrario del AIA lo que puede ser atribuido a que esta hormona es más fácilmente degradada por enzimas de ciertas especies vegetales disminuyendo así su efecto en los medios de cultivo (Roca y Mroginski, 1993).

Respecto a yemas, el análisis chi – cuadrado resulta altamente significativo, lo que denota dependencia estadística entre los tratamientos aplicados y la formación de brote a partir de este tipo de explantes. Es así que de forma global, se encontró una formación de brotes del 69.1%. El tratamiento que exhibe el mayor porcentaje de brotación corresponde al tratamiento 7 (1.5 mgL⁻¹ BAP, 0 mgL⁻¹ AIA, 0.1 mgL⁻¹ ANA) con un 100% de explantes que dieron lugar a al menos un brote organogénico tras la evaluación efectuada; mientras que el mínimo porcentaje de presencia de brotes fue para el tratamiento 3 (1.5 mgL⁻¹ BAP, 0.2 mgL⁻¹ AIA, 0 mgL⁻¹ ANA) con el 41.7%.

Además, se presenta un porcentaje alto (81.8%) de brotación en el tratamiento 2 en el que, al igual que el tratamiento 7, fue aplicada una concentración de 1.5mgL^{-1} de BAP y 0.1 mgL^{-1} de la auxina, en este caso el AIA. Dichos resultados se asemejan a los realizados por Gayatri y colaboradores (2005) en donde se selecciona 1.5 mgL^{-1} de bencilaminopurina (BAP) como concentración óptima para la iniciación de la formación de brotes. Aunque el apareamiento de brotes no es estadísticamente dependiente de las concentraciones de BAP aplicadas, para la concentración de 1.5 mgL^{-1} , se formaron brotes a partir de un 72.7% de yemas ensayadas.

Por otro lado, en cuanto a la incidencia de las concentraciones de auxinas sobre la formación de brotes, se encuentra dependencia estadística de la variable frente a las hormonas ANA y AIA, siendo el porcentaje de brotación de 75.7% para 0.1 mgL^{-1} de AIA y 90.5% al emplear igualmente 0.1 mgL^{-1} de ANA. Como se puede notar, la formación de brotes resultó en mayor porcentaje al usar ácido naftalenacético, similares resultados se obtuvieron en la regeneración *in vitro* de cilantro cimarrón realizado por Yasseen (2002).

4.2.2 Formación de callo

Tal como lo señala Pierik (1990), la concentración de los reguladores del crecimiento es un factor que puede establecer la regeneración de plantas o la formación de callo al aplicar técnicas de cultivo *in vitro*. En vista de que uno de los objetivos de la presente investigación consiste en la obtención de brotes organogénicos a partir de los explantes utilizados, la formación de estructuras como callo no resulta el mejor escenario; sin embargo, su formación no puede ser controlada. Es importante evaluar esta variable ya que la formación callosa impide la generación de clones de la especie en estudio, debido a que la organogénesis indirecta constituye una base para obtener variación genética e inestabilidad (Roca y Mroginski, 1993).

Es así que al analizar segmentos nodales, tanto en relación a los tratamientos de inducción como a cada uno de los reguladores de crecimiento por separado, no se encontró dependencia estadística de la formación de callo en dicho tipo de explante ante dichos factores.

Pese a ello, se encontró una presencia de callo del 31.1% de segmentos nodales ensayados, siendo el tratamiento 6 (1 mgL⁻¹ de BAP y 0.2 mgL⁻¹ AIA y 0 mgL⁻¹ de ANA) el que tendió a desarrollar un mayor porcentaje de este tipo de estructura (50% de callo). En lo referente a la formación de callo frente a las concentraciones de BAP, se obtuvo que la ausencia de esta hormona (0 mgL⁻¹) provoca una mayor formación de este tipo de estructura, obteniéndose un 41.7% de callo con lo que se confirma que para *E. foetidum*, al igual que para diversas especies, el empleo de una mayor concentración de auxinas frente a citoquininas induce este tipo de desarrollo (Roca y Mroginski, 1993). De lo enunciado, se confirma con el porcentaje de presencia de callo de un 37.5% para las concentraciones 0.1 mgL⁻¹ y 0.2 mgL⁻¹ de AIA, y del mismo porcentaje (37.5%) en una concentración de 0.1 mgL⁻¹ de ANA.

En contraste, respecto a las yemas de cilantro cimarrón se encontró dependencia estadística de la formación de callo respecto a los tratamientos de inducción, concentración de AIA y ANA; exceptuando la dependencia a la concentración de BAP. Se obtuvo únicamente un 18.8% de formación de callo al analizar los tratamientos empleados, siendo la combinación de hormonas (1 mgL⁻¹ de BAP, 0.2 mgL⁻¹ AIA y 0 mgL⁻¹ de ANA) la que indica un mayor porcentaje de formación de callo respecto a los demás ensayos (50%). Las concentraciones de BAP no exhiben significancia estadística que denote la dependencia de la variable al factor, sin embargo si existió formación de callo en el 21.8% de las yemas ensayadas en la concentración 1 mgL⁻¹ de BAP. Por otro lado, las concentraciones de auxinas inciden directamente en la formación de callo, en donde el porcentaje de explantes que presentaron este tipo de estructura es de un 30.8% para una concentración de 0.2 mgL⁻¹ AIA y un 33.3% para 0.1mgL⁻¹ de ANA. Si bien los porcentajes totales de formación de callo no

superan el 20%, la acción de las auxinas en el medio de cultivo provoca la presencia de dicha formación puesto que estas hormonas promueven la división celular; además de que contenido auxínico propio de la plantas, desencadena aún más la formación de callo en vista de que órganos como hojas y yemas son productores de auxinas (Hartmann y Kester, 1997)

4.2.3 Número de brotes

Respecto al análisis realizado para la variable número de brotes, se determinó que para segmentos nodales, no existe dependencia estadística significativa de la variable frente a los tratamientos aplicados.

Por otro lado, en cuanto a las yemas existe dependencia estadística mostrada mediante el análisis de varianza para los tratamientos de inducción sobre el número de brotes y sobre la concentración ANA, excepto para las concentraciones de la hormona BAP y para la auxina AIA. La concentración de reguladores de crecimiento que mejores resultados reflejó constituye: 1.5 mgL^{-1} de BAP, 0.1 mgL^{-1} de ANA y 0 mgL^{-1} AIA de obteniéndose 27 brotes a partir de 12 explantes ensayados, lo cual supera al número de brotes reportado por Gayatri y colaboradores (2005), en donde al emplear la misma concentración de citoquinina (1.5 mgL^{-1} BAP) se obtuvo un promedio de 17.8 brotes por 10 repeticiones realizadas. En contraste a la presente investigación, Arockiasamy y colaboradores (2002) obtuvieron un promedio de 1.72 brotes en base a 60 repeticiones realizadas al emplear la concentración de 1.5 mgL^{-1} de BAP, lo que corresponde a un promedio menor al indicado previamente para este proyecto.

Respecto a los reguladores de crecimiento auxínicos, éstos al ser hormonas que se encuentran en partes de las plantas en fase de crecimiento activo, regulan diversos aspectos del desarrollo vegetal; afectan al crecimiento del tallo, las hojas y las raíces y al desarrollo de ramas laterales y frutos

estimulando la elongación de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal (Pierik, 1990). Es así que en la investigación realizada y en el efecto de las auxinas sobre el número de brotes, se destaca el ácido naftalenacético (ANA) aplicado en contraste con el AIA, debido a que se encontró dependencia estadística únicamente frente a las concentraciones de ANA, tal que la concentración que describe un mayor número de brotes corresponde al 0.1 mgL^{-1} de hormona.

La mejor interacción de los reguladores de crecimiento (BAP y ANA) consiste en 1.5 mgL^{-1} en combinación con 0.1 mgL^{-1} respectivamente lo que corresponde al tratamiento 7 (27 nuevos brotes). Al colocar una mayor concentración de citoquinina como el BAP, cuya principal función es estimular la división celular, en combinación con una auxina como ANA, se obtiene una proliferación de brotes con raíces. (Zeiger y Lincoln, 2007).

4.2.4 Longitud de brotes

En lo referente a la longitud de los brotes se encontró que para segmentos nodales no existe dependencia estadística de la variable frente a los tratamientos de inducción propuestos en la metodología, así como frente a cada uno de los reguladores de crecimiento analizados por separado; ello debido a la similitud de los valores de medias encontradas en cada caso. En la tabla de contingencia realizada para la incidencia de los tratamientos, se exhibe como el más alto porcentaje al 76.5% de brotes que se ubicaron dentro del rango de longitud correspondiente al nivel 1 (entre $0.1 - 0.25 \text{ cm}$), mientras que para el resto de niveles el porcentaje es menor al 10% de los brotes ensayados. Los resultados encontrados contrastan con el trabajo realizado empleando la vía de organogénesis directa de peciolo en donde se encuentra un promedio de longitud de brotes de 0.79 cm al ensayar una concentración de 1.5 mgL^{-1} de BAP (Arockiasamy, *et al.*, 2002).

De la misma manera, las yemas de cilantro cimarrón mostraron independencia de la longitud de los brotes formados frente a la interacción de reguladores de crecimiento y a su incidencia por individual. El mayor porcentaje de longitud alcanzado corresponde al nivel 1, es decir entre 0.1 y 2 cm de longitud, con un 66.9% de los explantes ensayados; mientras que un porcentaje de únicamente 7.7% de brotes se desarrolló hasta alcanzar una longitud entre 6 y 8 cm. Se destaca el tratamiento 7 en donde se encuentra un 55.6% de brotes entre 0.1 y 2 cm, y el 25.9% en el nivel 2 además de presentar un 18.5% de brotes en el nivel 4 es decir de longitudes hasta 8 cm; lo que indica un mayor crecimiento en la proliferación de brotes ensayados bajo dicho tratamiento.

Como se puede notar, el crecimiento longitudinal de los brotes originados a partir de yemas es mayor al compararlo con el obtenido para segmentos nodales logrando brotes de hasta 8 cm de longitud. Dichos resultados pueden ser atribuidos a lo enunciado en la investigación realizada por Pérez (1998), en donde se indica que las yemas jóvenes son una rica fuente de producción de hormonas, lo que facilita su producción de brotes.

4.2.5 Ancho de las hojas

La variable ancho de las hojas fue evaluada tanto para segmentos nodales como para yemas de *E. foetidum*. Para el caso del primer tipo de explante, los ANOVA efectuados no establecieron dependencia estadística del ancho de las hojas frente a los tratamientos de inducción, comportándose de la misma forma para cada uno de los factores analizados. Al igual que para la longitud, se categorizaron los datos obteniendo niveles de ancho de hojas, de tal forma que se exhibe un 78.8% de los explantes dentro del nivel 1 de ancho, es decir de 0.1 a 0.25 cm de los cuales el 91.7% de segmentos nodales inoculados en los de los tratamientos 2 y 10 se ubican en dicho nivel. Al analizar las concentraciones de BAP, el 100% de los brotes se ubican en el nivel 1 de longitud al no aplicar esta hormona en el medio de cultivo; y en el

nivel 3 (0.5 – 0.75 cm) se ubican el 15% de los brotes en concentraciones 1.5 mgL⁻¹ de citoquinina. Mientras que para las auxinas AIA y ANA el 25% y 20.8% de los brotes se ubican en el nivel 3 de ancho de sus hojas respectivamente.

En cuanto a yemas, no se encontró significancia estadística que denote dependencia del ancho de hojas, de los brotes originados a partir de este tipo de explantes, respecto a los tratamientos aplicados o a los reguladores de crecimiento (BAP, AIA, ANA). Se obtuvo sin embargo, una distribución del porcentaje de los brotes sobre los cuatro niveles categorizados ubicándose en el nivel 1 (0.1 – 0.625cm) el 57.5% de los brotes. Si bien, para *E. foetidum* no existen investigaciones en donde se evalúe esta variable, se ha reportado que en sí las técnicas de cultivo *in vitro* permiten la proliferación de estructuras más vigorosas al compararlas con las plantas propagadas por vía sexual mediante técnicas agrícolas (García y Rafael, 1989).

4.3 Fase de multiplicación

4.3.1 Multiplicación convencional

La etapa de multiplicación convencional consiste en una fase fundamental de esta investigación puesto que tras su realización y análisis de resultados se logró comparar lo obtenido en cada variable con la propagación mediante el sistema de inmersión temporal. Además la multiplicación convencional permite obtener un gran número de vitroplantas y asegurar su inocuidad mediante la replicación por subcultivos, en los que pese a que no se evaluó la acción de tratamientos o medios de cultivo, se obtuvo la evaluación de cada variable a ser comparada con el SIT posteriormente.

Dicho procedimiento fue realizado utilizando los brotes inducidos en la etapa anterior, a más de nuevas introducciones de material vegetal cultivándolo en el mejor medio de cultivo de la inducción, para de esta manera aumentar el

coeficiente de multiplicación y poder contar con suficiente cantidad de plántulas que ingresarían posteriormente al Sistema de Inmersión Temporal (SIT). Es así que se evaluaron las mismas variables del SIT, permitiendo comparar los dos métodos de micropropagación y evaluar su eficiencia.

4.3.1.1 Presencia o ausencia de brotes

Para la variable presencia/ausencia de brotes se obtuvieron diferentes porcentajes de formación de brotes en los tres subcultivos efectuados. Es así que para el primer subcultivo se obtuvo el 18.2% de presencia de brotes, obteniendo poco material vegetal propagado; de igual forma, para el subcultivo B, la presencia de brotes aumentó encontrándose un 36.4% de formación de brotes. Sin embargo, el porcentaje de apareamiento de al menos un brote por cada plántula replicada ascendió en el tercer subcultivo, obteniéndose una presencia de brotes del 67.9% con más de un brote nuevo por plántula, lo cual se observará en el índice de multiplicación señalado posteriormente. Dichos resultados pueden justificarse con lo citado por (Jambhale, *et al.*, 2000), quien enuncia que a medida que un determinado material *in vitro* es subcultivado, su capacidad de absorción de hormonas exógenas aumenta, por lo que en la presente investigación el último subcultivo efectuado aumenta su producción de brotes nuevos. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la proporción de reguladores de crecimiento empleados debe ser escogida de forma correcta considerando la síntesis propia de las plantas de este tipo de compuestos ya que como lo cita Kalimuthu y colaboradores (2007), concentraciones muy altas de auxinas pueden inhibir la morfogénesis.

4.3.1.2 Longitud y ancho de los brotes

Los diferentes subcultivos a los que fueron sometidas las plántulas, permitieron diferenciar un incremento de la longitud de brotes. A pesar que el realizar replicados sucesivos no influye directamente con la longitud de las plántulas, se puede mencionar que, en la presente investigación, a medida que

las plántulas fueron subcultivadas, su promedio de longitud ascendió atribuyéndose dicha característica a una mayor absorción de los reguladores de crecimiento en el cambio de medios de cultivo (Jambhale, *et al.*, 2000). Es así que para el subcultivo A, el promedio de altura de los brotes fue de 2.94 cm, incrementándose hasta 3.35 cm en el subcultivo C.

Por otro lado, en lo referente al ancho de las hojas de los brotes originados en esta fase, se obtuvo una uniformidad de los datos, tal que en el primer subcultivo (Subcultivo A) el promedio de ancho de las hojas fue de 0.86 cm, característica típica de las hojas de *E. foetifum* en campo. Mientras que un ligero aumento fue detectado para los subcultivos B y C, en donde el promedio de ancho fue de 1.07cm y 1.05 cm respectivamente.

4.3.1.3 Índice de multiplicación

El índice o coeficiente de multiplicación constituye una variable muy importante por evaluar, ya que permite diferenciar la producción de nuevas plantas en sistemas *in vitro* con la reproducción vegetativa por vía hortícola (García y Rafael, 1989); además es una herramienta muy importante para realizar comparaciones entre las diferentes formas de cultivo de tejidos (sólido y líquido en el SIT) tal como es en el caso de la presente investigación.

Para el análisis de esta variable se tomó en cuenta el número de brotes resultantes tras el ensayo respecto a los explantes inoculados inicialmente. Es así que se exhibe un aumento a medida que se realizaron los tres subcultivos. Cabe mencionar que con los resultados obtenidos se consiguió el objetivo más importante de la etapa de multiplicación convencional que es lograr la multiplicación de brotes sin perder la estabilidad genética, ya que se realizaron únicamente tres subcultivos. Aunque esta característica no está definida para *E. foetidum* específicamente, se tiene como referencia la multiplicación de otras especies vegetales como *Mussa sp.* para la que se sugieren hasta 5

subcultivos (Colmenares, 2000), o en el caso de *Rubus sp.* en el que se realizarían hasta 10 subcultivos sin obtener variabilidad genética (Castro, 2007). Además de otras especies herbáceas como *Valeriana jatamansi* en donde se permite obtener mayor número de brotes a medida que se realizan subcultivos sucesivos del material (Kaur, *et al.*, 2000).

El ANOVA para esta variable indica dependencia, puesto que el índice de multiplicación obtenido es dependiente de los subcultivos efectuados mostrándose tres grupos estadísticos. Tal que para la multiplicación convencional, es decir en medio sólido, se obtuvieron índices de proliferación bajos, encontrándose una tasa de 1.18 para el subcultivo A, hasta 1.68 en el subcultivo C (Figura 3.61). Dichos coeficientes, al no superar el valor de 1, implican que al subcultivar plántulas de *E. foetidum* éstas se reprodujeron únicamente una vez por plántula. Dichos resultados concuerdan con la investigación realizada por Arockiasamy y colaboradores (2000) en donde al emplear la concentración de 1.5 mgL^{-1} de BAP se obtuvo un índice de multiplicación de 1.72.

4.3.2 Multiplicación en el Sistema de Inmersión Temporal

Los resultados obtenidos respecto a la multiplicación en el SIT se refieren a dos tipos de ensayos efectuados para dicha fase. Como se mencionó en el capítulo anterior, la prueba de parámetros de control del SIT generó un número de plántulas, y coeficientes de multiplicación muy bajos, no correspondientes a la técnica empleada en medio líquido al utilizar este tipo de sistemas (Preil y Hvoslef-Eide, 2005). Por ello se efectuó el segundo ensayo modificando las concentraciones de citoquinina para obtener un mayor número de plántulas que corresponda al objetivo de propagación masiva del SIT. Es así que tanto para la prueba de parámetros como para la prueba de medios de cultivo en el SIT se evaluaron las mismas variables obteniéndose en el primer caso el mejor tratamiento en cuanto a frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo que son denominados como aspectos críticos y

determinantes en este tipo de sistemas (Berthouly & Etienne, 2005). Mientras que por otro lado, al efectuar la prueba de medios de cultivo para el SIT, se pudo obtener una concentración diferente de reguladores de crecimiento que permita la obtención de una mayor cantidad de plántulas y por ende registre índices de multiplicación mayores que vayan acorde a lo citado por varios autores al ensayar diversas especies vegetales en sistemas de inmersión temporal.

4.3.2.1 Presencia o ausencia de plántulas

Para esta variable se obtuvo en la prueba de parámetros del sistema, un 73.1% de presencia de brotes en los tratamientos ensayados expresando que la mayoría de plántulas dieron al menos dos brotes (un brote más de lo inoculado inicialmente). Además, se encontró diferencia estadística significativa que evidencia que existe al menos un tratamiento diferente; es así que el 100% de los explantes inoculados al realizar esta prueba en el tratamiento 5 (frecuencia =4 horas, inmersión = 2 minutos, densidad del inóculo = 3 explantes por SIT) formaron nuevas plántulas en el ciclo (22 días de cultivo).

Sin embargo, al analizar esta variable respecto a la densidad del inóculo se estableció que únicamente éste parámetro es determinante en la presencia o ausencia de nuevas plántulas debido al valor de chi – cuadrado (Tabla 3.44) exhibido en la estadística, obteniéndose un porcentaje de 87.5% de presencia de plántulas al ensayar una densidad de inóculo de tres explantes por unidad de SIT siendo claramente mayor al de seis explantes por SIT.

Alternativamente, para la prueba de medios de cultivo en el SIT, el estadístico efectuado indica una dependencia de la formación de plántulas a la aplicación de los tratamientos. Tal que un 82.2% de presencia de nuevas plántulas fue determinada, siendo a partir de la concentración de 2 mgL^{-1} BAP en donde se encontró una presencia de plántulas del 100% de los ensayos en

el SIT. Al ser la concentración de citoquinina mayor que al de auxina, la división celular fue estimulada, actuando sinérgicamente con la brasinolida que representa un potenciador a la multiplicación de plántulas *in vitro* (Clouse & Sasse, 1998).

4.3.2.2 Número de plántulas

En la prueba de parámetros del SIT al evaluar el número de plántulas, se encontró que diferencia estadística entre los tratamientos ensayados obteniéndose cuatro diferentes grupos estadísticos siendo el tratamiento 5 (frecuencia =4 horas, inmersión = 2 minutos, densidad del inóculo = 3 explantes por SIT) el que refleja una media mayor de 8.5 comparada con el resto de tratamientos. La incidencia de la frecuencia de inmersión en el número de plántulas resultantes no es significativa por lo que esta no es determinante; por el contrario, el tiempo de inmersión incide directamente en el número de plántulas obtenidas siendo una inmersión de dos minutos determinante para un mejor resultado. Además la densidad del inóculo también resulta un factor de relación con la variable evaluada, puesto que al emplear densidades de inóculo menores (3 explantes por unidad de SIT), se da lugar a un mayor número de plántulas. Tal que la combinación de un tiempo de inmersión de dos minutos más una densidad de inóculo de 3 explantes resultan en los más altos porcentajes de brotación por ende mayor número de plántulas.

Dichos resultados son comparables a la propagación de especies ornamentales como begonias, linium, y ciertas orquídeas en donde prolongadas frecuencias y cortos tiempos de inmersión resultan en mayor número de propágulos por ende mejores coeficientes de multiplicación (Berthouly & Etienne, 2005).

Por otro lado, en la prueba de medios de cultivo para el SIT, se logró la obtención de un mayor número de plántulas resultantes de dichos ensayos, ello

debido a la adición de mayores concentraciones de citoquinina en combinación con un brasinoesteroide. Los grupos estadísticos encontrados mediante la prueba de LSD Fisher denotan la diferencia significativa entre los tratamientos probados, presentando cada uno de ellos un valor diferente de medias. En el tratamiento que mejor resultados exhibió (2.5 mgL^{-1}) se obtuvieron 64 plántulas partiendo de un inóculo inicial de seis explantes; por lo que al el incremento generado al comparar con la prueba anterior (parámetros del SIT) es de al menos tres veces mayor.

4.3.2.3 Longitud de las plántulas

Respecto a la respuesta de la variable longitud de plántulas en la prueba de parámetros en el SIT, los estadísticos de ANOVA realizados para los tratamientos y para cada uno de los factores ensayados, no reflejaron significancia lo que corresponde a la inexistencia de diferencias entre tratamientos y su incidencia sobre la longitud de las plántulas resultantes de dicho ensayo. Sin embargo, al analizar el porcentaje de ocurrencia para la longitud de plántulas en los diferentes niveles categorizados, se encontró que el 56.4% de los resultantes exhibió longitudes entre 6.15 y 8 cm. De acuerdo a Calviño y colaboradores (2007) *E. foetifum* corresponde a una hierba perenne muy similar a *E. echinatum* y aunque una altura no ha sido reportada aún para *E. foetidum*, al ser también una hierba perenne análoga a *E. echinatum*, se puede decir que la longitud de esta especie en campo es desde 10 hasta 30 cm de altura (Martínez & Galotti, 2007). Por lo cual, se puede mencionar que al obtener plántulas de cilantro cimarrón de un promedio de altura entre 6 y 8 cm en el SIT siendo este un procedimiento *in vitro*, éstas se considerarían como adaptables para su traslado a campo hasta obtener alturas esperadas o incluso mayores a éstas.

Por otro lado, y al contrario de la prueba anterior, en la prueba de medios de cultivo en el SIT el estadístico ANOVA realizado reflejó alta incidencia estadística de los tratamientos ensayados frente a la variable

longitud de plántulas diferenciándose dos grupos estadísticos que indican que la mayoría de las plántulas formadas se encuentran en el nivel 2 de longitud siendo éste el 41.6% de 5.37cm a 6.75 cm; mientras que el resto se encuentran distribuidas en los demás niveles de longitud. Si bien, la acción de una mayor concentración de citoquinina en sinergia con la brasinolida resultó en una mayor proliferación de brotes, la altura de las plántulas no se incrementó con la interacción de los dos reguladores de crecimiento, lo que puede estar atribuido a que uno de los efectos principales de los brasinoesteroides es estimular la división celular y pueden aumentar hasta en un 50% la tasa de división celular (Clouse & Sasse, 1998). Asimismo, la citoquinina BAP, a pesar de ser necesaria para el crecimiento de tejidos escindidos puede presentar un efecto débil o incluso ser inhibidor en algunos clones (Roca & Mroginsky, 1993).

4.3.2.4 Ancho de las hojas

En relación al comportamiento de la variable ancho de las hojas en la prueba de parámetros en el SIT el estadístico ensayado resultó en la inexistencia de una dependencia entre la frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo frente a la variable analizada. Es así que se observan porcentajes diversos en la categorización por niveles del ancho de las hojas (Figura 3.69) destacándose el nivel 3 con un mayor porcentaje (41.03%) de plántulas con un ancho de hojas entre 1 cm a 1.5 cm; mientras que el 30.77% presentaron hojas entre 1.5 cm a 2 cm de ancho.

Por otro lado, en la prueba de medios en el SIT, el estadístico efectuado refleja alta dependencia de la variable respecto a los tratamientos ensayados, siendo el tratamiento 4 (2.5 mgL^{-1} BAP, 0.1 mgL^{-1} ANA, 5 mgL^{-1} BR) el que presenta mayor media (2.49). Dicho tratamiento es el único de los ensayados que presenta un porcentaje de ancho de las plántulas en nivel 4 mayor al 10% lo que corresponde a hojas con 1.62cm a 2 cm de ancho. En el porcentaje global de los tratamientos, el mayor porcentaje observado es para el nivel 2 (0.87 cm a 1.25 cm) mostrando un 45.7% de las plántulas de dicho ancho.

4.3.2.5 Índice de multiplicación

Como ya se mencionó en el apartado 4.3.1.4 el índice o tasa de multiplicación es una variable crucial al comparar el sistema convencional de propagación *in vitro* versus el sistema de inmersión temporal (SIT) en donde se usa medios de cultivo líquidos para la propagación de plántulas. De allí que al realizar la medición de esta variable en la prueba de parámetros del SIT, se obtuvo una clara dependencia de la tasa de multiplicación frente a todos los factores analizados. Sin embargo al realizar la prueba ANOVA para los factores de forma individual, se comprobó que la frecuencia de inmersión no incide directamente con esta variable, mientras que el tiempo y la densidad del inóculo sí corresponderían a factores determinantes a la hora de obtener una determinada tasa de proliferación. Con el tratamiento cinco (frecuencia = 4 h, tiempo de inmersión = 2 min y densidad del inóculo = 3 explantes por unidad de SIT), se obtuvo el mayor tasa de multiplicación correspondiente a 2.8, lo que quiere decir que en este tratamiento con un inóculo inicial de seis plántulas ensayadas se obtuvieron 17 plántulas como inóculo final en las dos repeticiones efectuadas.

La tasa de multiplicación obtenida en la prueba de parámetros en el SIT corresponde a un índice bajo para propagación de plántulas en este tipo de sistemas. Por ello, se realizó la prueba de medios de cultivo en donde el máximo coeficiente de proliferación se encontró al ensayar el tratamiento 4 (2.5 mgL⁻¹ BAP, 0.1 mgL⁻¹ ANA, 5 mgL⁻¹ BRA) y fue de 7.11; lo que implica que de 9 plántulas de inóculo inicial en el SIT, dio como resultado 64 plántulas en las tres repeticiones efectuadas.

Como se puede observar en la figura 3.49, el índice de multiplicación varía significativamente dentro de los tratamientos efectuados, es así como para el caso del tratamiento uno y dos (0 y 1 mgL⁻¹ de BAP respectivamente) se observa una baja interacción de las hormonas bencilaminopurina y brasinolida, debido a que presentan tasas de 1.63 y 1.8, lo que en el primer

caso puede ser atribuido a la ausencia de citoquinina en el medio de cultivo, y en el segundo caso a una insuficiente concentración de hormona necesaria para la proliferación de brotes, objetando que los brasinoesteroides pueden actuar de modo similar a las citoquininas, pueden sustituirlas en un medio de cultivo o pueden ser un complemento de las mismas (Citado por Aydin, Talas-Ogras, Ipekçi-Altas & Gözükirmizi, 2006).

Por el contrario, a concentraciones de 2 y 2.5 mgL⁻¹ de BAP en combinación con 5 mgL⁻¹ de brasinolida se exhibieron tasas de multiplicación mayores. Esta proliferación de plántulas se logró con la adición de una mayor cantidad de citoquinina (BAP) al medio de cultivo lo que permite suponer que la concentración de este regulador permite la ruptura de la dominancia apical y estimula la brotación, como lo cita Alemán (2000); tal que el balance hormonal empleando mayor concentración de citoquininas y menor de auxinas es determinante en el coeficiente de multiplicación. Mientras que al adicionar 3 mgL⁻¹ de BAP, se observa un descenso en la tasa de proliferación atribuyéndose esta característica a que a una adición excesiva de hormonas en el medio de cultivo, puede ser causante de efectos inhibidores de la morfogénesis de tejidos, por ende la reducción en el número de plántulas finales (Pérez, 2008).

Por otro lado, al analizar el promedio de longitud de plántulas, ancho de sus hojas e índice de multiplicación en la prueba de medios en el SIT, se obtuvo que el tratamiento con un mayor promedio en las tres variables corresponde al que contiene 2.5 mgL⁻¹ de BAP (Figura 3.51), permitiendo la obtención de una tasa de proliferación de 7.11. Alternativamente, se analizó la probabilidad de efectos no deseados sobre el índice de multiplicación en relación con la longitud de las plántulas o ancho de sus hojas; puesto a que como se ha reportado en bibliografía al micropropagar sábila en medios de cultivo líquido, un excesivo crecimiento de hojas puede traducirse en una disminución significativa de dicho índice (Bermúdez, *et al.*, 2000). La tendencia de disminución del índice de multiplicación a causa de un crecimiento excesivo

del follaje o acumulación de biomasa ha sido reportada para diversas especies cultivadas mediante medios líquidos tales como ñame, piña, gladiolo e incluso banano (Meneses, *et. al.*, 2000) haciendo necesaria la aplicación de diferentes herramientas que contrarresten dicho efecto sin afectar el número de plántulas formadas en el cultivo. Entre dichas herramientas se encuentra el uso de retardantes de crecimiento como paclobutrazol (PBZ), cuyo efecto es el inhibir el crecimiento en longitud de nudos y estimular la producción de nuevos brotes. Sin embargo, contrario a lo reportado, para la presente investigación no se encontró incidencia de la longitud o ancho de las hojas de las plántulas formadas en el SIT sobre la tasa de proliferación (Figura 3.51). Al contrario, se observa un aumento progresivo del promedio medido en centímetros de las dos variables, al igual que una independencia del coeficiente de proliferación en relación a dichos factores, siendo así innecesario el uso de retardantes de crecimiento como el paclobutrazol en el cultivo de *E. foetidum* en el SIT.

Adicionalmente, como lo indica la tabla 3.61, se efectuó un análisis de tendencia que permitiera observar el comportamiento teórico de la tasa de proliferación utilizando las mismas concentraciones de BAP empleadas en la multiplicación en el SIT, con la finalidad de comparar dicho índice con lo obtenido en las fases de inducción y multiplicación convencional. Es así que mediante la ecuación (Figura 3.52) se obtuvieron índices de 1.18 y 1.30 al utilizar 2 y 2.5 mgL⁻¹ de BAP respectivamente que corresponden a tasas de proliferación teóricas que se hubieran podido alcanzar en la multiplicación convencional al emplear dichas concentraciones en medio de cultivo sólido. De allí que, si se los compara con los coeficientes de multiplicación obtenidos en las pruebas en el sistema de inmersión temporal, no superan dichos resultados, confirmando la eficiencia de este sistema en la multiplicación de plántulas de *E. foetidum* en el SIT. Sin embargo, cabe recalcar que los valores resultantes de la ecuación corresponden a índices de multiplicación teóricos sujetos a comprobación, por lo que ensayos experimentales permitirían obtener datos más precisos.

Finalmente, de forma global la propagación de plántulas en sistemas de inmersión temporal presenta diversas ventajas al compararlo con métodos convencionales, especialmente al pretender multiplicar especies vegetales a grandes escalas y comercializarlas (Hosokawa, K., Oikawa, Y., Yamamura, S., 1998). Como lo cita la literatura, los mayores problemas de la propagación convencional incluyen la necesidad de mano de obra, alto consumo de tiempo en la multiplicación del material vegetal y el costo que implica los dos factores mencionados adicional al costo del agente gelificante (Takayama & Misawa, 1991); por lo que al evaluar la eficiencia del SIT comparándola con el sistema convencional de propagación *in vitro* se puede confirmar que lo enunciado es aplicable también para la presente investigación. Ello responde a que si bien el costo de la mano de obra en este caso es equitativa para las dos técnicas de propagación de *E. foetidum*, el tiempo de multiplicación de las plántulas se reduce significativamente en el SIT. Es por ello, que en las etapas iniciales del cultivo *in vitro* de esta especie refiérase a desinfección, inducción y, especialmente en la multiplicación en medio sólido, se invirtieron alrededor de seis meses mientras que para los ensayos efectuados en el SIT se invirtieron únicamente 3 meses de investigación. Además en cuanto al costo del agente gelificante generado por la multiplicación convencional, éste rubro fue excluido al emplear el SIT, ya que como fue mencionado anteriormente, la inmersión temporal utiliza medios de cultivo líquido. Es así que éstos presentan menor dificultad en la multiplicación de plántulas ya que permiten una reducción en el costo de la mano de obra y la disminución del costo del rubro referente al agar.

Además, la propagación de plántulas en biorreactores empleando medios líquidos permite que el explante se encuentre en contacto con el medio de forma intermitente y no permanente, por lo que los nutrientes se encuentran más disponibles siendo más fácil su absorción. Al estar los recipientes interconectados, el traslado del medio líquido al otro recipiente se produce mediante el aumento de la presión de aire interno, por lo que la solución nutritiva mantiene en inmersión el material vegetal y permite la proliferación de una gran cantidad de plántulas en un mismo volumen; adicionalmente, el contacto intermitente del medio con los explantes reduce el nivel de toxinas

presentes ya que las plántulas permanecen en sus propios exudados (Cruzat, R. G., Aquavita Consultores, 2009).

4.3.2.6 Análisis de costo propagación convencional versus SIT

De acuerdo con Cruzat y colaboradores (2009) el uso de las técnicas de propagación actuales se ha fundamentado en optimizar las herramientas de micropropagación *in vitro* con la finalidad de obtener mejoría tanto en los procesos como en la inversión económica enfocándose principalmente en la reducción de costos y mejoramiento de la rentabilidad de los sistemas de micropropagación.

Si bien, la micropropagación convencional representa un sistema adecuado para la masificación de la producción de plantas en períodos cortos de tiempo, presenta también un limitante que corresponde al alto costo de la planta (Paredes, 2005). Este costo se atribuye principalmente a dos factores tales como: agente gelificante y alto coste por mano de obra.

Por ello, se determinó necesario, el realizar un análisis de costo para la presente investigación, que corresponde a la multiplicación de plantas de *E. foetidum* tanto mediante el método convencional como mediante el SIT. El enfoque realizado para el análisis abarca la inversión correspondiente para cada método de multiplicación en cuanto a costo de medio de cultivo. Tal como lo indica Pucchoa (1990), el agente gelificante o agar es ampliamente utilizado para cultivo *in vitro* y representa aproximadamente un 70% del costo total del medio de cultivo lo que incrementa significativamente los costos de producción en la multiplicación convencional. Al efectuar el análisis de costos para la multiplicación de cilantro cimarrón, se obtuvo que el porcentaje correspondiente a costo por agar asciende a un 84.28% del medio de cultivo; es decir, este compuesto utilizado en el medio sólido para la multiplicación convencional, representa más de lo reportado por Pucchoa (1990) respecto al medio de cultivo líquido empleado en el SIT, en el que se prescinde de agar.

Así también, como lo señala la Tabla 3.61, el costo por planta multiplicada en medio sólido es de 0.10 centavos mientras que al emplear sistemas de inmersión temporal el costo se reduce a 0.01 centavos y, si bien, la inversión inicial de implementación de SITs es alta, el costo – beneficio de su uso aumenta significativamente en cuanto al costo de producción. Ello debido a que, a más de prescindir del uso de agar en este tipo de sistemas, el número de plántulas multiplicadas mediante el SIT es incrementado en índices que oscilan entre seis y nueve, según la especie de interés. Para el caso de *E. foetidum*, en vista de que la tasa de proliferación corresponde a 7 el número final de plantas obtenidas en un ciclo de duración de tres meses corresponde a 35943 plantas mientras que para la multiplicación convencional es de 270 plántulas transcurrido el mismo tiempo, existiendo una diferencia significativa entre los dos sistemas. Tal que el número de plantas multiplicadas por el método convencional en tres meses (270) corresponde a un porcentaje incluso menor al 1% respecto a las plantas resultantes de la multiplicación en el SIT (35943) en el mismo tiempo.

Sin embargo, como se mencionó previamente el costo de inversión inicial de implementación del SIT es elevado, debido a los materiales empleados y a la automatización del proceso (Cruzat, R. G., Aquavita Consultores, 2009), por lo que para fines de producción de plantas a gran escala empleando medios líquidos, se establece la utilización de recipientes de mayores volúmenes, de hasta 20 litros, que permitan una producción masiva. La utilización de este tipo de recipientes implica la consideración del “escalado” como parámetro fundamental en el empleo de los biorreactores del tipo de inmersión temporal. Es así como en referencia a cultivos celulares, Dorán (1998) menciona que una vez conocidas las condiciones óptimas del cultivo se pueden iniciar consideraciones de escalado si la producción deseada es mayor. Sin embargo, en la misma referencia, se señala que las pérdidas de productividad al efectuar cambios de escala podrían o no recuperarse, por lo que necesariamente las proyecciones económicas iniciales para la escala piloto necesitan reajustarse para escalas mayores (Dorán, 1998).

Los cambios de escala deben realizarse tomando en cuenta que las condiciones en los procesos de producción masiva sean lo más parecidas posible a aquellas en donde se obtenían mejores resultados en los recipientes pequeños. Por ello, así como para los biorreactores utilizados en bioprocesos de células, en donde su correcto funcionamiento depende del mezclado (Dorán, 1998); en los biorreactores de inmersión temporal, el mezclado, cuyo análogo corresponde al tiempo de inmersión, debe ser ampliamente considerado.

Dicho factor, idealmente, debería mantenerse constante durante el cambio de escala; sin embargo, resulta difícil de conseguir en la práctica ya que el tiempo de mezcla y consumo de potencia están íntimamente relacionados (Dorán, 1998). Por ello, aunque para el caso de SITs no existe una fórmula que permita establecer si los parámetros obtenidos a escala piloto funcionarán correctamente a escala masiva, se debe considerar que conforme se aumenta el volumen del recipiente se aumenta también el volumen de fluido que debe ingresar para que se pueda efectuar cada ciclo de inmersión, incrementando así el requerimiento de potencia del compresor para con una presión mayor permita el ingreso de un mayor flujo de aire hacia los recipientes.

CAPITULO 5: CONCLUSIONES

Los tratamientos de desinfección con la variación de tiempo y cloro empleados para hojas de *Eryngium foetidum* presentaron altos porcentajes de descontaminación de este tipo de explantes siendo una concentración de 0.4% de NaClO y 6 minutos de inmersión el que permitió la obtención de todos los explantes sin contaminación fúngica o bacteriana.

El mejor método de desinfección de hojas es el tratamiento 1 en vista del porcentaje nulo de explantes contaminados; además permite la obtención del 41.7% de explantes en escala 1 de oxidación; sin embargo, la viabilidad de este tipo de explantes no es representativa puesto a que no se observó respuesta organogénica en el medio de establecimiento del cultivo *in vitro*.

Para segmentos nodales el mejor tratamiento de desinfección corresponde a una concentración de 0.8% de NaClO durante 8 minutos de inmersión, puesto a que se encuentran el menor porcentaje de explantes contaminados, que presentaron menor nivel de oxidación y un mayor porcentaje de viabilidad en escala 1 correspondiente al explantes 100% viables.

El tiempo de inmersión resultó ser un parámetro determinante en el porcentaje de contaminación de segmentos nodales, puesto que se obtuvo un menor porcentaje de explantes contaminados al mantenerlos en inmersión por ocho minutos; además que al desinfectar los explantes en tiempos cortos de inmersión evita que éstos sufran grandes porcentajes de oxidación debido al cloro; sin embargo, este factor no tuvo ninguna incidencia sobre la viabilidad de segmentos nodales.

Por otro lado, para yemas de cilantro cimarrón, el tratamiento con mejores resultados fue al aplicar 0.8% NaClO en un tiempo de 10 minutos, ya que concentraciones muy altas de cloro resultan en mayor oxidación fenólica, y por ende necrosis del tejido. De esta manera, al aplicar 0.8% de cloro, se

obtiene un 45.5% de explantes entre los niveles de oxidación 0 y 1 de la escala, permitiendo de esta manera una buena viabilidad de las yemas al aplicar el tratamiento indicado.

Como fue reportado en la sección anterior, cilantro cimarrón posee diversos compuestos fenólicos, por lo que tiende a oxidarse; para controlar este factor sobre los explantes se adicionó al medio de cultivo de establecimiento los antioxidantes polivinilpirrolidona (PVP) y ácido ascórbico en concentraciones 250 mgL^{-1} y 35 mgL^{-1} respectivamente, reduciendo así este tipo de exudados.

En la fase de inducción, no se obtuvo diferencia estadística al evaluar la variable presencia/ausencia de brotes a partir de segmentos nodales; sin embargo, al emplear una mayor concentración de BAP (1.5 mgL^{-1}) en combinación con 0.1 mgL^{-1} de ANA se obtuvo una mayor brotación de este tipo de explantes. La formación de brotes a partir de yemas exhibió diferencias estadísticas significativas respecto al uso de tratamientos de inducción destacándose así la misma combinación de BAP y ANA (1.5 mgL^{-1} BAP - 0.1 mgL^{-1} ANA) con el 100% de brotes formados a partir de yemas después de 30 días de la siembra, por lo que se concluye que la concentración de los reguladores de crecimiento mencionadas permite la formación de una mayor cantidad de brotes.

Una concentración mínima de auxinas (0.1 mgL^{-1}) permite un mayor porcentaje de brotación a partir de yemas de cilantro cimarrón en un menor tiempo. Además coadyuva al apareamiento de raíces que permiten mayor crecimiento de la planta.

La combinación de las concentraciones de citoquinina (1 mgL^{-1} BAP) y auxina (0.2 mgL^{-1} AIA) da lugar a la formación del mayor porcentaje de callo tanto a partir de yemas y segmentos nodales, por lo que si se pretende obtener este tipo de estructura, se puede emplear dicha combinación. De allí que, en vista que en la presente investigación se pretende obtener brotes organogénicos sin fase de callo, el empleo de los tratamientos de inducción

generaron porcentajes bajos de callogénesis siendo para yemas de tan solo el 18.8% de los explantes ensayados.

La concentración más favorable respecto al número de brotes formados a partir de segmentos nodales y yemas resulta del tratamiento 7 de inducción (1.5 mgL⁻¹BAP - 0.1 mgL⁻¹ANA) que para el caso de yemas es estadísticamente representativo. Además se concluye que el empleo de la concentración de 0.1mgL⁻¹ de auxina, ya sea AIA o ANA, determina un mayor número de brotes organogénicos a partir de yemas siendo este el explante con mejores resultados para los fines de esta investigación.

Los reguladores de crecimiento empleados en combinaciones diferentes para los tratamientos de inducción no influyen estadísticamente en la longitud de los brotes generados ni el ancho de las hojas a partir de los dos tipos de explantes empleados. Además, para segmentos nodales y yemas, se da una mayor frecuencia de explantes de longitud entre 0.1 y 2 cm (nivel 1). Sin embargo, las yemas de cilantro cimarrón presentan un ligero mayor porcentaje de brotes en el nivel 4. Se concluye que la misma tendencia se aplica para el ancho de las hojas de los brotes generados a partir de los dos tipos de explantes ensayados.

En base al número de brotes y porcentaje de inducción se concluye que las yemas de cilantro cimarrón permiten la obtención de brotes organogénicos más fácilmente que segmentos nodales, por lo que para la fase de multiplicación convencional, previo a los ensayos del SIT, se sembraron únicamente yemas de *E. foetidum*.

En el subcultivo C se mantiene una mayor absorción de los reguladores de crecimiento empleados, puesto a que en este subcultivo, se encuentra a diferencia de los dos realizados previamente, un mayor porcentaje de presencia de nuevas plántulas (67.9%) de cilantro cimarrón. Asimismo, el número de brotes es mayor en este subcultivo respecto a los subcultivos A y B, mientras que, tanto la longitud de los brotes como el ancho de sus hojas, no se

ve mayormente influenciada por este factor y su valor es muy cercano en los subcultivos B y C de la multiplicación convencional.

La tasa de proliferación correspondiente a la fase de multiplicación convencional, corresponde a un índice poco significativo respecto a la multiplicación de otras especies herbáceas como el cilantro cimarrón, sin embargo se considera el 1.68 como adecuado principalmente en vista de la necesidad de subcultivar las plántulas para el aseguramiento de la asepsia del cultivo.

En cuanto a la presencia/ausencia de nuevas plántulas en la prueba de parámetros en el Sistema de Inmersión Temporal, se observa un mayor porcentaje de formación para el tratamiento 5 (frecuencia = 4 horas, tiempo de inmersión = 2 minutos y densidad del inóculo = 3 explantes por SIT), por lo que allí se originó al menos un nuevo brote por cada inóculo inicial sembrado. Un porcentaje considerable de plántulas se obtuvo del tratamiento 7 (frecuencia = 6 horas, tiempo de inmersión = 2 minutos y densidad del inóculo = 3 explantes por SIT) para el que se ensayan también tres explantes como densidad del inóculo (d_i), por lo que tal como lo indica el estadístico, este factor es determinante en la proliferación de nuevas plántulas de *E. foetidum*, dando mejores resultados al emplear una $d_i = 3$ al compararlo con una $d_i = 6$.

El tiempo de inmersión y densidad del inóculo ensayados en el SIT son concluyentes para el número de plántulas obtenidas tras el ciclo en el sistema, ya que al mantener los explantes en inmersión durante dos minutos permitió la formación del doble de plántulas que en uno y tres minutos. Además la combinación de los tratamientos dos minutos y tres explantes como densidad de inóculo inicial permiten una mayor cantidad de plántulas al finalizar en ensayo.

La frecuencia de inmersión no constituye un parámetro determinante en la obtención de mayor cantidad de plántulas en el SIT; sin embargo al ensayar una frecuencia de cuatro horas entre ciclos en combinación con dos minutos de

inmersión y tres brotes iniciales por unidad de SIT, se obtuvo un total de 17 plántulas al final del ensayo.

Pese a no existir diferencias estadísticas significativas tanto de los tratamientos ensayados como de cada uno de los parámetros analizados individualmente frente a la longitud de las plántulas y ancho de sus hojas, el crecimiento longitudinal de los brotes resultantes pertenece a una mayoría de plántulas (56.4%) entre 6.15 y 8.2 cm de largo (nivel 4); mientras que para el ancho, las hojas alcanzaron de 1 a 1.5 cm (nivel 3) en un porcentaje de 41.03%.

Tras la prueba de parámetros en el SIT, el mayor índice de proliferación obtenido es de 2.2 en el tratamiento 5 (frecuencia = 4 horas, tiempo de inmersión = 2 minutos y densidad del inóculo = 3 explantes por SIT); sin embargo este coeficiente no representa una diferencia significativa con la propagación convencional, por lo que una vez obtenidos los parámetros de funcionamiento del sistema, fue necesario el ensayo de nuevos medios de cultivo que optimicen la propagación masiva de cilantro cimarrón aumentando así la tasa de multiplicación de *E. foetidum*.

El empleo de una mayor concentración de citoquinina y la presencia de brasinolida en el medio de cultivo ensayado, para el aumento de la eficiencia del SIT, permitió una mayor formación de plántulas en los tratamientos tres, cuatro y cinco; siendo las concentraciones 2, 2.5 y 3 mgL⁻¹ de BAP en combinación con 5 mgL⁻¹ de BRA en donde los brotes inoculados inicialmente en el sistema dieron lugar a al menos una nueva plántula.

La concentración de 2.5 mgL⁻¹ de BAP en combinación con 5 mgL⁻¹ de BRA (tratamiento 4) permitió la formación de 64 nuevas plántulas tras los ciclos ensayados en el SIT a los 20 días de la siembra del inóculo inicial.

En contraste con la prueba de parámetros en el SIT, los medios de cultivo ensayados resultaron estadísticamente significativos respecto a la longitud de las plántulas y ancho de las hojas resultando en 5.37 y 6.75 cm

(nivel 2) el mayor porcentaje de plántulas en dicha longitud, mientras que para el ancho de las hojas el mayor porcentaje se ubicó en el nivel 2 (0.87 a 1.25 cm).

Con el empleo de la combinación de bencilaminopurina y brasinolida del tratamiento 4, se incrementó el índice de multiplicación hasta 7.13 siendo este un coeficiente aceptable para la propagación masiva de plántulas mediante sistemas de inmersión temporal.

Los índices de multiplicación obtenidos experimentalmente para la multiplicación en el sistema de inmersión temporal son mayores que los obtenidos en la multiplicación convencional para las concentraciones de 0 a 1.5 mgL⁻¹ de BAP; mientras que para las concentraciones 2 y 2.5 únicamente se determinó el índice de proliferación en el SIT de forma experimental, mientras que el índice de la multiplicación convencional con estas concentraciones fue determinado teóricamente, y al compararlos entre sí, el SIT presenta mayor eficiencia para esa variable.

Se concluye finalmente, en la comprobación de la hipótesis planteada, en la que se propuso una mayor eficiencia en la propagación masiva de cilantro cimarrón mediante el Sistema de Inmersión Temporal en comparación con la propagación convencional, lo que se evidencia con la obtención de una mayor cantidad de plántulas en el SIT las cuales presentan mejores características fenotípicas como mayor longitud de los nuevos propágulos y mayor ancho de sus hojas; además de una tasa de proliferación de 7 a 1 (SIT/propagación convencional).

Adicionalmente, pese a no haberse evaluado estadísticamente el desarrollo de las plántulas propagadas en el SIT en la fase de aclimatación se observó una mayor vigorosidad y resistencia tras el cambio de condiciones físicas de las plántulas *in vitro* hacia condiciones de invernadero.

El SIT presenta un amplio número de ventajas al propagar plantas de interés mediante este tipo de técnica, ya que los nutrientes del medio de cultivo

están más fácilmente disponibles en medios de cultivo líquido y las plántulas adquieren una mayor capacidad de absorción.

El contacto intermitente con el medio de cultivo en la superficie del explante permite un máximo crecimiento de las plántulas tras los ciclos de inmersión; considerándose así, la frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo, los tres parámetros principales y determinantes para el empleo de SITs en la propagación masiva de plantas.

Así también, una ventaja adicional del SIT consiste en el espacio que brinda el emplear envases de grandes capacidades. En esta investigación se utilizaron frascos herméticos de 1000 ml, utilizándose un mayor número de explantes en cada contenedor. Mientras que en los frascos empleados para micropropagación convencional se reduce la densidad del inóculo por envase empleado, aumentando así el espacio físico necesario para el crecimiento de plántulas en la sala de incubación.

CAPITULO 6: RECOMENDACIONES

Conocer la procedencia de las plantas objeto de estudio previa su introducción al sistema *in vitro* resulta indispensable con la finalidad de asegurar sus características fenotípicas y ausencia de enfermedades del material vegetal a emplearse.

De preferencia se debe contar con plantas de invernadero para realizar investigaciones de cultivo de tejidos vegetales puesto que así se puede mantener bajo condiciones de humedad, temperatura y control fitosanitario el material vegetal objeto de la investigación; facilitando la etapa de desinfección significativamente.

El protocolo de desinfección del material vegetal de *Eryngium foetidum* empleado debe incluir concentraciones bajas de NaClO puesto que éste al ser un potente agente oxidante tiende a necrosar el explante previa su introducción al sistema *in vitro* dificultando la morfogénesis de la planta.

Si se pretende regenerar plántulas a partir de hojas de cilantro cimarrón en investigaciones futuras, se recomienda ensayar la vía embriogénica puesto que mediante organogénesis directa no se obtuvo respuesta mediante ningún tipo de combinación de reguladores de crecimiento; habiéndose únicamente superado la fase de desinfección pero con un alto porcentaje de oxidación, por lo que se obtuvieron altos porcentajes de necrosis a pesar de la utilización de concentraciones mínimas de NaClO.

Para prevenir la exudación de compuestos fenólicos por parte del explante tras la realización del corte, se recomienda realizar un lavado en polivinilpirrolidona (PVP) previo su inoculación en los recipientes. Además el uso de este tipo de antioxidantes (PVP) y de ácido ascórbico en el medio de cultivo, reduce significativamente la oxidación causada por fenoles.

De los tres tipos de explantes empleados para la micropropagación de cilantro cimarrón se recomienda el empleo de yemas apicales y axilares puesto a que genera una mejor respuesta a inducción organogénica, en menor tiempo que para segmentos nodales.

La aplicación de una concentración mayor de citoquinina (BAP) frente a las auxinas ensayadas (AIA y ANA) permite una mayor proliferación de brotes adventicios a partir de yemas por lo que se recomienda mantener esta relación en este tipo de explantes al requerir regeneración de plántulas vía organogénica.

Se recomienda emplear brasinólida en concentraciones de hasta 5 mgL^{-1} para la obtención de un mayor número de brotes en la etapa de multiplicación convencional de *E. foetidum*, debido a que para la realización de los ensayos en el SIT se requiere de un gran número de plantas para cumplir con los diseños estadísticos propuestos.

Para el caso de cilantro cimarrón, la densidad de inóculo inicial con mejores resultados en la prueba de parámetros en el SIT resultó ser de tres explantes por unidad de SIT, por lo que para este tipo de especies que presentan un amplio crecimiento longitudinal, se recomienda ensayar menores densidades de inóculo que faciliten tanto la generación de nuevas plántulas y su crecimiento longitudinal.

Pese a que en la presente investigación, el tiempo de inmersión y densidad del inóculo resultaron los dos únicos parámetros determinantes para la proliferación de plántulas en el SIT y de un incremento en la tasa de multiplicación, se recomienda, también, tomar en cuenta la frecuencia de inmersión puesto a que diferentes especies pueden requerir mayores o menores períodos de tiempo entre ciclos para su multiplicación masiva.

En la prueba de medios en el SIT la mejor concentración de citoquinina resultó ser 2.5 mgL^{-1} de BAP en el medio de cultivo, obteniéndose la mayor tasa de proliferación y número de plántulas; sin embargo, para prescindir de

este ensayo como una fase adicional, se recomienda el empleo de concentraciones altas de citoquinina para el aumento significativo del índice de multiplicación desde los ensayos de parámetros en este tipo de sistemas.

Los índices de multiplicación para la propagación de plantas mediante multiplicación convencional y sistemas de inmersión temporal comparados en esta investigación corresponden a valores experimentales para las concentraciones 0, 1 y 1.5 mgL⁻¹ de BAP ensayados en los dos tipos de sistemas de forma común; para lo que se determinó un mayor coeficiente para el SIT. Mientras que para las concentraciones 2 y 2.5 mgL⁻¹ de BAP, los índices obtenidos corresponden a valores extrapolados obtenidos teóricamente que de igual manera resultó ser mayor para el SIT indicando mayor eficiencia para este sistema; sin embargo, se recomienda obtener el coeficiente de multiplicación para las dos concentraciones de BAP de forma experimental y así obtener un dato más preciso de la variable.

La temática de propagación masiva de plántulas mediante sistemas de inmersión temporal es muy amplia, y permite realizar múltiples variaciones sujetas a valoración, por lo que para futuras investigaciones en este tipo de sistemas se recomienda tomar en cuenta otros parámetros de evaluación que permitan aprovechar las ventajas del SIT mediante la optimización de los protocolos empleados para dicho fin.

Como parámetros importantes se recomienda desde: evaluar el volumen del medio de cultivo a ser empleado por cada unidad de SIT, la producción de biomasa acumulada tras los ensayos a realizarse, la disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo transcurrido un determinado tiempo y hasta la caracterización de gradientes de oxígeno o el empleo de un suministro de CO₂ en lugar de oxígeno con la finalidad de suprimir la adición de azúcar al medio de cultivo; lo cual pudiera aportar significativamente a la profundidad y resultados de una determinada investigación en la producción de plántulas de interés comercial.

La producción masiva de plantas de interés comercial mediante SIT, debe considerar los parámetros de escalado entre los cuales se incluyen los costos de producción que puedan generar pérdidas o ganancias al reajustar el proceso a la nueva escala.

Así también, al ser la densidad del inóculo un parámetro ampliamente influyente sobre los índices de multiplicación, éste debe ser considerado también en el escalado para SITs, y si bien podría considerarse como referencia a los ensayos realizados a escala piloto, se deben realizar evaluaciones experimentales que permitan determinar la densidad del inóculo inicial correcta para recipientes de mayor capacidad para producción masiva de plantas tomando en cuenta que para cada especie vegetal el comportamiento es distinto.

Pese a que para el rejuvenecimiento de las plántulas y la proliferación de nuevos brotes se deben realizar replicados, un factor que se debe tomar en cuenta en la multiplicación o clonación masiva de plantas es la variación somaclonal que es causada por el excesivo subcultivo de brotes adventicios por lo que se debe procurar la mantención de la estabilidad genética de la especie en estudio.

Finalmente, se recomienda continuar con investigaciones de multiplicación masiva de plantas de interés productivo y comercial tanto mediante organogénesis como de embriogénesis somática mediante sistemas de inmersión temporal que permitan aumentar la eficiencia de este tipo de sistemas en el laboratorio de cultivo de tejidos y brinden un aporte a la agricultura del país mediante la investigación científica.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFIA

Abdelnour, A. Escalant, J. 1994. Conceptos Básicos del Cultivo e Tejidos Vegetales. Biblioteca Orton IICA/CATIE. s/e. 1 – 15pp.

Adams, G. (1998). Recent progress in chemistry, biochemistry and application of brassinosteroids. Institute of Plant Biochemistry. Halle, Alemania. York meeting: brassinoesteroids and gibberellins. Extraído el 30 de octubre de 2011 de http://192.129.24.144/licensed_materials/00898/free/meeting/york98/p08.pdf

Alemán, S. (2000a). Propagación vegetativa (cap. 4). Extraído el 10 de Septiembre, 2006, del sitio Web de la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, Cuba:

<http://agroweb.umcc.cu/PaginasProfesores/Silvia%20PAG%20WEB%20BIOTE>
[CNOLOGÍA/silvia2/Páginas%20de%20la%20portada/Pagina%20tema%20IV.htm](http://agroweb.umcc.cu/PaginasProfesores/Silvia%20PAG%20WEB%20BIOTE).

Alvard, D. Teisson, C. (1993). Comparation of methods of liquid medium for banana micropropagation . Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 55-56.

Applied Research Systems, (2003). After the Green Revolution: Sustainable and pequitable agriculture development. Futures. Agrotechnology Journal. Vol.5, 8-10.

Arockiasamy, S. Prakash, S. Ignacimuthu, S. (2002). Direct organogenesis from mature leaf and petiole explants of *Eryngium foetidum* L. *Biología Plantarum* 45(1): 129-132.

Aydin, Y., Talas-Ogras, T., Ipekçi-Altas, Z., & Gözükirmizi, N. (2006). Effects of brassinosteroid on cotton regeneration via somatic embryogenesis. *Biology - Cellular and Molecular Biology*, 61(3), 289 – 293.

Berthouly, M., Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid médium in mass propagation. Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement – Amis (CIRAD – AMIS). France.

Blair, S. (2005). Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica colombiana. Universidad de Antioquia. 347 páginas.

Calviño, C. Martínez, S. (2007). Nuevas citas para Argentina y Uruguay, y notas sobre *Eryngium* sect. *Panniculata* (Apiaceae). *Darwiniana*. 45(1): 68-76

Calviño, C. Martínez, S. Downie, S. (2008). The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 1129–1150

Cárdenas, D. Marín, C. Suárez, L. Guerrero, A. Nofuya, P. (2002). Plantas útiles de lagarto cocha. Departamento de Putumayo.

Castillo A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA. Las Brujas. Extraído el 20 de octubre de 2011. http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad_382.pdf

Castro, F. Flores, D. (2007, Diciembre/Marzo). Establecimiento *in vitro* y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.).

Chagas, J., & Soares, M. (2003), Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais. Brasil: Embrapa

Clouse, S., & Sasse, J. (1998). Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49, 427 – 451.

Colmenares, M. Giménez, C. (2000, Enero). Nuevas estrategias para la inducción de brotes en Musáceas. Laboratorio de Biotecnología Vegetal de La Universidad del Zulia. Venezuela.

Cubero, J. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. Mundi-Prensa Libros. Segunda edición. España. 353 – 364pp.

De Fera Silva, M. Milián, M. Quiala, E. Jiménez, E. (2003). Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación *in vitro* de

Psidium guajava cv. Enana roja en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal* Vol. 3, No 3: 149 – 154.

Denton, E. Mitchell, S. Ahmad, Mohammed. (2008). Challenges encountered while initiating medicinal plants into tissue culture conditions: case study of cerasee (*Momordica charantia*) and spirit weed (*Eryngium foetidum*). Presentado en: Eighth Conference of Faculty of Pure and Applied Sciences. The University of the West Indies, Mona. Febrero 26-28.

Dorán, P. (1998). Principios de Ingeniería de los Bioprocesos. Universidad de New South Wales. Sydney. Australia.

Downie, S. Ramanath, S. Katz-Downie, D. Llanas, E. (1998). Molecular systematics of Apiaceae subfamily Apioideae: phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid RPOC1 intron sequences. *American Journal of Botany* 85(4): 563-591.

Escalona, M. (2005). Scaling-up plant production by temporary immersion and quality of regenerants. Centro de Bioplantitas. Universidad de Ciego de Ávila. Cuba.

Escalona, M González, J. Cejas, I., Aragón, C. Capote, I., Rodríguez, R, Cañal, M, Sandoval, J. Roels, S, Debergh, P. (2005). Propagación de plátano (AAB) clon CEMSA ¾ en biorreactores de inmersión temporal. Centro de Bioplantitas. Universidad de Ciego de Ávila. Cuba.

Evans, D. Coleman J. Kearns, A. (2003). Plant cell culture. Basics. BIOS Scientific Publishers. Primera edición. Londres y New York: Taylor & Francis group

Fiallo, V. Rodríguez, N. Rodríguez, C. (1996). La germinación del culantro (*Eryngium foetidum* L.). Plant Med 1(2):31-33.

García, F. J. (2004). Fitorreguladores (cap. 14). Extraído el 22 de Agosto, 2007, del sitio Web de la Universidad Politécnica de Valencia:

http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_14.htm

García, A. (2005). Metodología para la Evaluación de Sistemas de Manejo incorporando Indicadores de Sustentabilidad. Revista CEPAL, Valparaíso-Chile, 15-16.

García, E. Rafael, M. Propagación clonal de plantas de café (*Coffea arabica* L. 'Catimor') a partir de microesquejes cultivados *in vitro* (1989). Universidad Central de Venezuela Facultad de Ciencias. Centro de Botánica. Caracas. Venezuela.

Gayatri, M. Madhu, M. Kavyashree, R. Dhananjaya, S. (2006). A protocol for *in vitro* regeneration of *Eryngium foetidum* L. Indian Journal of Biotechnology 5(1): 249-251.

George, E., Hall, M., De Klerk, G. (Eds). (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. Dordrecht. The Netherlands.

Gómez, J. (2007). Efecto de tratamientos antioxidantes en el establecimiento *in vitro* de dos genotipos de caña de azúcar del Ingenio La Grecia, Honduras. Zamorano, Ciencia y producción agropecuaria p 25.

Harisha, S. (2007). Biotechnology procedures and experiments handbook. Infinity Science Press LLC. Laxmi Publications. Canada. 691 páginas.

Hosokawa, K., Oikawa, Y., Yamamura, S. (1998). Mass propagation of ornamental gentian in liquid medium. Plant Cell Reports 17: 747–751

Jambhale, N., Patil, S., Jadhav, A., Pawary, S., Waghmode, B. (2000). Efecto de la cantidad de subcultivos en la multiplicación *in vitro* de cuatro clones de banano. INFOMUSA — Vol 10, N° 1.

Jaramillo, A. (2008). Establecimiento del cultivo *in vitro* de *Polylepis microphylla* como futura estrategia de conservación de la especie en la provincia de Chimborazo. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.

Jiménez, E. De Feria Silva, M. (1998). Empleo de biorreactores para la propagación masiva. Pérez Ponce, J. N. (Eds.), Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología (pp207-224). Villa Clara. Cuba.

Jordán. M, C. J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocinas. In C. Saqueo. F.A., *Fisiología Vegetal* (p. 28). La Serena: Ediciones universidad de la Serena

Kalimuthu, K., Paulsamy, S., Senthikumar, R., Sathya, M. (2007). *In vitro* propagation of the Biodiesel plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*. [Electronic version], 17 (2), 137 – 147. Extraído en noviembre de 2011. <http://www.banlajol.info/index.php/PTCB/article/view/3234/2721>

Kurina, M. (2009). *Reguladores de Crecimiento y Cultivo Vegetal*. Universidad Nacional de San Luis. Argentina. [Electronic version]. Extraído en noviembre de 2011. <http://bd.unsl.edu.ar/download.php?id+745>

Kyte.L, Kleyn.J. (2003). *Plants from test tubes* (Third ed.). Oregon, Portland: Timber press.

Maldonado, E. Rodríguez, L. Gómez, O. Cárdenas, M. (2003, Enero/Marzo). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal. *Centro Agrícola*. 30:(1) 69-72.

Martínez, S. Galotti, L. (2001). Las especies de *Eryngium* Sect *Foetida* (APIACEAE) en la Argentina. *Darwiniana* 39: (1&2), 155-169.

Marks, T., Simpson, S. (1990). Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grow stockplants to darkness or levels of irradiance. J. Hort. Sci. 65(2): 103-111.

Orellana, P. (1998). Introducción a la propagación masiva. Pérez Ponce, J. N. (Eds.), Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología (pp125-133). Villa Clara. Cuba.

Palomares, M., Vidales-Fernández, I., Guillén, H., Salgado, R. (2003). Influencia de espacios de crecimiento, temperaturas e intensidades de luz en la conservación *in vitro* de germoplasma de aguacate. 1Facultad de Agrobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan. Campo Experimental Uruapan- INIFAP, Uruapan. Instituto de investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás. Michoacán. México

Peña, C. (2009). Establecimiento y evaluación de protocolos de desinfección, introducción, y multiplicación *in vitro* de piñón (*Jatropha curcas*) a partir de semilla y yemas apicales obtenidas de plantas adultas con miras a una propagación masiva de plantas élite. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.

Pérez, J. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Volumen 1. Villa Clara. Cuba.

Pérez, M. & Martínez, F. (1994). Cultivo de tejidos vegetales aplicado a la producción agrícola. Revista Iberoamericana. Vol. I, 49.

Pérez Ponce J. Orellana, P. Suárez, M. Valdés, C. (1998). Propagación masiva en Biofábricas. Pérez Ponce, J. N. (Eds.), Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología (pp241-258). Villa Clara. Cuba.

Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores (L. M. S, Ayerbe, Trad.). Mundi-Prensa. España.

Prasanna L., Chintapalli, J., Moss, P., Kiran K., Sharma, J. K. (1997) *In vitro* Culture Provides Additional Variation for Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] Crop Improvement. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, Vol. 33, No. 1 (Jan. - Mar., 1997), pp.30-37

Preil., W., Hvoslef-Eide, A. (Eds). (2005). Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Dordrecht. The Netherlands.

Pucchoa, D., Purseramen, P., Rujbally, B. (1999). Effects of medium support and gelling agent in the tissue culture of tobacco (*Nicotiana tabacum*). Department of Agriculture and Food Science, Faculty of Agriculture, University of Mauritius, Réduit, Mauritius.

Ramcharan, C. (1999). Culantro: A Much Utilized, Little Understood Herb. Perspectives on New Crops and New Uses. ASHS Press. 506-509.

Cruzat, R. G., Aquavita Consultores. (2009). Resultados y Lecciones en Sistema de Inmersión Temporal en Especies Anuales, Frutales y Vides.

Regiones Metropolitana, del Maule, del Biobío y de Los Ríos Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura.

Roca, W. Mroginski, L. 1991. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (eds.). Cali, Colombia. 2 – 13, 20 – 32, 113 – 115, 495 – 512.

Rossi, L. (2005). Hormonas vegetales: desarrollo y crecimiento brasinoesteroides (63p). Curso de Fisiología Vegetal, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía. Extraído el 30 de octubre de 2010 de <http://www.upch.edu.pe/facien/fc/dcbf/fisiovegetal/Hormonas%20vegetales%201y2+Otros.ppt>

SAN MARTÍN, S. 1996. Propagación *in vitro* de portainjertos de palto (*Persea americana* Mill.) cvs. Lula y Velvick, resistentes a la salinidad: enraizamiento y aclimatación. Taller de Licenciatura Ing. Agr. Quillota, Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 111p.

Sistema Integrado de Información Taxonómica (2009). SIIT * América del Norte (Datos o Información como en 30-Enero -2009)

Standley, P. Williams, L. (1975). Trópicos. Flora de Guatemala. Biodiversity Heritage Library. Fieldiana Botany. V24: (11) 1-3.

Smith, R. (2000). Plant tissue culture: techniques and experiments. Second edition. Academic Press.

Stewart, C. (2008). Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications. University of Tennessee. 371 páginas.

Takayama, S., Akita, M. (2005). Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. Department of Biological Science and Technology. Tokai University. Japan.

Terry, E., Núñez, M., Pino, M., Medina, N. (2001). Efectividad de la combinación biofertilizantes – análogo de brasinoesteroides en la nutrición del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Revista Agricultura Técnica. Vol. 30.

Vidal, G. (2008). Desafíos ambientales en nuestros tiempos. Revista Avances y perspectivas. Vol. 20. pp. 5-6.

Winkelmann, T. Geier, T. Preil, W. (2006). Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985–2004. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 86:319–327

Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation plants. Department of Agricultural Botany. The Hebrew University of Jerusalem. Israel.

Zeiger, E., Lincoln, T. (2007). Fisiología vegetal. Universitat Jaume I. Tercera edición. Volumen 2, p 967.