

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO* DE
Polylepis microphylla COMO FUTURA ESTRATEGIA DE
CONSERVACIÓN DE LA ESPECIE EN LA PROVINCIA
DEL CHIMBORAZO”

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

PABLO ALFONSO JARAMILLO PALACIOS

SANGOLQUÍ, 19 de agosto de 2008.

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

PABLO ALFONSO JARAMILLO PALACIOS

COORDINADOR DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Dra. Marbel Torres Arias

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Vinicio Zabala

Sangolquí, 19 de agosto de 2008.

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. PABLO ALFONSO JARAMILLO PALACIOS como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

19 de agosto de 2008

M. Sc. Mónica Jadán

Ing. MarcoTaipe

REVISADO POR

Ab. Vinicio Zabala

Agradecimiento

Agradezco a mis Padres y hermanos por todo su apoyo, el cariño y amor que me brindan constantemente, que es y será el pilar principal de mi vida.

A la Máster Mónica Jadán, investigadora y directora del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, por la dirección técnica y científica, su apoyo constante y por la confianza que deposito en mi para la realización de este proyecto.

A la Doctora Karina Proaño y a la Máster Claudia Segovia, por su colaboración en el proyecto y sus consejos.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio por los consejos y el apoyo que me brindaron.

Y gracias a Dios por ser la luz en mi camino.

Alfonso Jaramillo Palacios

DEDICATORIA

A mis padres, por su apoyo, amor y comprensión.

Alfonso Jaramillo Palacios

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
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 Descripción Botánica.....	4
1.4.1.2 Distribución Geográfica de la especie	5
1.4.1.3 Estado actual de la especie y factores Antropogénicos	6
1.4.1.4 Importancia de la especie.....	7
1.4.2 Cultivo in vitro	7
1.4.3 Tipos de cultivo in vitro.....	8
1.4.3.1 Cultivo de tejido desorganizado	10

1.4.3.2	Cultivo de estructuras organizadas	10
1.4.3.3	Rutas morfogénicas.....	14
1.4.4	Medios de cultivo y composición.....	16
1.4.4.1	Agua.....	17
1.4.4.2	Nutrientes minerales.....	17
1.4.4.3	Fuentes de carbono.....	20
1.4.4.4	Vitaminas.....	20
1.4.4.5	Agente gelificante	21
1.4.4.6	Reguladores de crecimiento	21
1.4.4.7	Otros compuestos	29
1.4.5	Preparación del medio de cultivo	30
1.4.6	Factores que influyen en el cultivo in vitro	33
1.4.6.1	Material vegetal	33
1.4.6.2	Factores Físicos	38
1.4.7	Cultivo in vitro en Leñosas	42
1.4.7.1	Micropropagación	43
1.4.7.2	Etapas de la micropropagación	44
1.4.7.3	Control de la Oxidación fenólica en especies leñosas.....	51
1.5	Hipótesis.....	52
CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS		53
2.1	Fase de campo.....	53
2.1.1	Localización geográfica.....	53
2.1.2	Plantas donadoras	53
2.1.3	Identificación de la especie	55
2.2	Fase de Laboratorio	55
2.2.1	Localización del ensayo	55
2.2.2	Período de Investigación.....	55

2.2.3	Fase de establecimiento	55
2.2.3.1	Manejo del material vegetal.....	55
2.2.3.2	Medios de cultivo.....	56
2.2.3.3	Desinfección del material vegetal	58
2.2.3.4	Control de oxidación.....	60
2.2.3.5	Condiciones del cultivo.....	62
2.2.4	Fase de multiplicación.....	62
2.2.5	Iniciación de la fase de enraizamiento	64
2.2.6	Análisis estadístico.....	64
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES		66
3.1	Fase de establecimiento.....	66
3.1.1	Desinfección del material vegetal	66
3.1.2	Control de Oxidación.....	85
3.2	Fase de multiplicación	91
3.3	Iniciación de la fase de enraizamiento.....	93
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES		95
CAPÍTULO 5. RECOMENDACIONES.....		98
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA.....		98
ANEXOS	103	

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. Resultados de contaminación, oxidación, sobrevivencia y brotes obtenidos de los 9 tratamientos en la fase de desinfección.	103
Anexo B. Comparaciones múltiples para la variable oxidación en las diferentes concentraciones de cloro.....	104
Anexo C. Comparaciones múltiples para la variable oxidación en los diferentes tiempos de inmersión.	105
Anexo D. Comparaciones múltiples para la variable oxidación en los diferentes tratamientos de desinfección.....	105
Anexo E. Comparaciones múltiples para la variable número de brotes.....	107
Anexo D. Análisis de Homogeneidad en base a frecuencias marginales y cuantificaciones de categorías.....	108

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.1** Conjunto de sustancias que se añaden a los medios de cultivo para inducir el crecimiento y desarrollo; como el agua, compuestos orgánicos, inorgánicos y sustancias de composición poco definidas (Pierik, 1990). 16
- Figura 2.1** Planta donadora de explantes del bosque de *Polylepis microphylla* localizado al este de la Provincia del Chimborazo, Coordenadas 75° 56` 98 E, 97° 49` 56,1N. 53
- Figura 2.2** Yemas apicales y laterales de un arbusto de *Polylepis microphylla*, empleadas como explantes. 54
- Figura 2.3** Yemas apicales y laterales que fueron cortadas para iniciar la fase de desinfección. 56
- Figura 2.4** Esterilización de los componentes termolábiles de los medios de cultivo. 58
- Figura 2.5** Aislamiento e inoculación de los explantes de *Polylepis microphylla*. 59
- Figura 3.1** Contaminación de los explantes por cada nivel de concentración de cloro, evaluado a los 30 días. 67
- Figura 3.2** Frecuencia de contaminación de los explantes por cada tiempo de inmersión en cloro, a los 30 días. 69
- Figura 3.3** Frecuencia de contaminación de los explantes por cada tiempo de inmersión en cloro, evaluado a los 30 días. 71
- Figura 3.4** Oxidación de los explantes por cada nivel de concentración de cloro, evaluado a los 30 días. 73
- Figura 3.5** Frecuencia de oxidación de los explantes según el tiempo de inmersión, se muestran los grupos de significancia. 74

Figura 3.6 Diferentes niveles de oxidación presente en los medios de cultivos.	75
Figura 3.7 Frecuencia de oxidación de los explantes en cada tratamiento de desinfección, evaluado a los 30 días.....	77
Figura 3.8 Promedios de oxidación en los 9 tratamientos de desinfección, se muestra los grupos de significancia, (a) muestran menores promedios de oxidación, (b) presenta mayores promedios de oxidación.....	77
Figura 3.9 Frecuencia de sobrevivencia de los explantes en cada tratamiento de desinfección, a los 30 días.	79
Figura 3.10 Porcentajes de contaminación y sobrevivencia de los 9 tratamientos de desinfección a los 30 días de iniciado el experimento.	80
Figura 3.11 Sobrevivencia de los explantes según el nivel de oxidación.	81
Figura 3.12 (a y b) Explantes establecidos del tratamiento (10-20): 10 minutos de tiempo de inmersión a una concentración del 20% de cloro comercial (5,25%); (c) explantes que no establecidos por el efecto tóxico de la oxidación.	82
Figura 3.13 Barras de error, con intervalos de confianza, para la variables número de brotes.	83
Figura 3.14 Porcentajes de contaminación, promedios de oxidación, porcentaje de sobrevivencia y número de brotes para cada tratamientos de desinfección.	83
Figura 3.15 Porcentajes de contaminación, sobrevivencia, oxidación y número de brotes para el grupo a de los rangos de significancia.....	84
Figura 3.16 Mapa perceptual de los tratamientos de desinfección (interacción entre factores).	85

Figura 3.17 Promedios de oxidación y porcentaje de sobrevivencia en los 4 tratamientos de lavado en la fase de establecimiento.....	86
Figura 3.18 Resultados del lavado con Cisteína HCl 4g/L.....	87
Figura 3.19 Promedios de oxidación al utilizar un medio modificado y un control. Hay diferencias significativas entre a y b.....	87
Figura 3.20 Resultados del control de oxidación mediante modificación de nutrientes del medio de cultivo (izquierda) versus un control (derecha).....	89
Figura 3.21 Promedios de oxidación y porcentajes de sobrevivencia en los tratamientos de manipulación del explante.	90
Figura 3.22 Resultados del control de oxidación mediante manipulación de los explantes, tratamiento con la eliminación de primordios (izquierda) versus tratamiento sin eliminación de primordios (derecha).	90
Figura 3.23 Promedios de número de brotes por explante en la fase de multiplicación a los 40 días.....	92
Figura 3.24 Brotes en la fase de multiplicación a los 40 días.	92
Figura 3.25 Presencia de callos en los brotes de <i>P. microphylla</i>	93
Figura 3.26 (a y b) Presencia de callos en la parte basal de los brotes, (c) tratamiento 2, (d) tratamiento 3	94

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Macro y micronutrientes, soluciones Stock 100x del medio (MS) Murashige y Skoog (1962).	16
Tabla 2.1 Componentes del medio de Chu et al., 1975 (N6) modificado, con las vitaminas de Kao y Michayluk (1975), usado en la fase de establecimiento. ...	57
Tabla 2.2 Tratamientos de desinfección de los explantes en la fase de establecimiento, empleando tres concentraciones de cloro comercial 5,25% y tres tiempos de inmersión.	59
Tabla 2.3 Escala de los niveles de oxidación, valores y equivalencia en porcentaje de oxidación en el medios de cultivo.	60
Tabla 2.4 Tratamientos para el control de la oxidación mediante soluciones de lavado usadas en la fase de establecimiento.	61
Tabla 2.5 Tratamientos para el control de la oxidación mediante modificación del medio de Chu et al., 1975 (N6) usado en la fase de establecimiento.	61
Tabla 2.6 Tratamientos para el control de la oxidación mediante la eliminación de primordios de las yemas de <i>P. microphylla</i>	62
Tabla 2.7 Tratamientos para la fase de multiplicación de brotes <i>P. microphylla</i>	62
Tabla 2.8 Componentes del medio de Chu et al., 1975 (N6) modificado, con las vitaminas de Kao y Michayluk (1975), usado en la fase de multiplicación de <i>P. microphylla</i>	63
Tabla 2.9 Tratamientos la iniciación del enraizamiento de brotes de <i>P. microphylla</i>	64
Tabla 3.1 Frecuencia de contaminación de los explantes por cada nivel de concentración de cloro, evaluado a los 30 días.	66

Tabla 3.2 Pruebas de chi-cuadrado en base a la frecuencia de contaminación de los explantes por cada nivel de concentración de cloro.	67
Tabla 3.3 Correlación entre la concentración de cloro, la contaminación y la oxidación.	68
Tabla 3.4 Frecuencia de contaminación de los explantes por cada tiempo de inmersión en cloro.	68
Tabla 3.5 Pruebas de chi-cuadrado en base a la frecuencia de contaminación de los explantes por cada tiempo de inmersión en cloro.	69
Tabla 3.6 Frecuencia de contaminación de los explantes en cada tratamiento de desinfección, evaluado a los 30 días.	70
Tabla 3.7 Pruebas de chi-cuadrado en base a la frecuencia de contaminación de los explantes en cada tratamiento de desinfección.	70
Tabla 3.8 Correlación entre la concentración de cloro, el tiempo de inmersión, la contaminación y la oxidación.	71
Tabla 3.9 Anova un factor para las variables oxidación y concentración de cloro.	73
Tabla 3.10 Subconjuntos homogéneos para las tres concentraciones de cloro evaluando la variable dependiente oxidación.	73
Tabla 3.11 Anova un factor para las variables oxidación y tiempo de inmersión.	74
Tabla 3.12 Subconjuntos homogéneos para los tres tiempos de inmersión evaluando la variable dependiente oxidación.	75
Tabla 3.13 Correlación entre el tiempo de inmersión y la oxidación.	75
Tabla 3.14 Anova un factor para las variables oxidación, tiempo de inmersión y concentración de cloro.	76

Tabla 3.15 Subconjuntos homogéneos para los 9 tratamientos de desinfección evaluando la variable dependiente oxidación.....	76
Tabla 3.16 Pruebas de chi-cuadrado en base a la frecuencia de sobrevivencia de los explantes en cada tratamiento de desinfección.	78
Tabla 3.17 Frecuencia de sobrevivencia de los explantes en cada tratamiento de desinfección.	78
Tabla 3.18 Pruebas de chi-cuadrado en base a la frecuencia de sobrevivencia según el nivel de oxidación, a los 30 días de iniciado el experimento.....	80
Tabla 3.19 Prueba de chi-cuadrado, para sobrevivencia, nivel de oxidación y los 9 tratamientos de desinfección (tiempo-cloro).	81
Tabla 3.20 Anova un factor para la variable número de brotes entre los tratamientos de desinfección.....	82
Tabla 3.21 Rangos de significancia para la variable número de brotes.	82
Tabla 3.22 Anova un factor para los cuatro tratamientos de lavado.	86
Tabla 3.23 Anova para los tratamientos de modificación del ambiente.	88
Tabla 3.24 Anova para los tratamientos de manipulación del explante.	89
Tabla 3.25 Anova para los tratamientos en la fase de multiplicación.....	91

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

Polylepis microphylla es una especie leñosa del páramo andino del Ecuador, cuya presencia ha sido reportada únicamente al este de la Provincia del Chimborazo con una distribución geográfica y hábitat restringido. En los últimos años ha sufrido una alarmante disminución poblacional debido a distintos factores antropogénicos como la tala del bosque, la extracción de leña, la introducción de otras especies y el incremento de las áreas de pastoreo y sembríos en la zona, lo cual está llevando a la especie a un proceso de extinción (Jameson, & Ramsay, 2007; Kessler, 2006; Renison & Cingolani, 2002)

En el Ecuador, los bosques de *Polylepis* se distribuyen en el páramo hasta los 4000 msnm, siendo uno de los géneros más importantes en la formación de bosques en los ecosistemas altoandinos. En Ecuador encontramos 8 especies, una de ellas es *Polylepis microphylla* cuya distribución actual al igual que la de otras especies como lo indica la Asociación de Ecosistemas Andinos (ECOAN) ha sido disminuida de manera alarmante por procesos antropogénicos.

Los bosques de *Polylepis* cumplen importantes funciones ecológicas, contienen una parte importante de la biodiversidad de Sudamérica, además albergan especies endémicas y diferentes formas de vida vegetal, numerosas especies herbáceas que incrementan la diversidad de mamíferos e insectos (Yensen & Tarifa 2001 en Vega *et al.*, 2007) por lo que es uno de los ecosistemas priorizados para la conservación (Vega *et al.*, 2007).

Para la recuperación de las especies de este género en Bolivia se ha optado por realizar técnicas de cultivo *in vitro* para su multiplicación, y es una alternativa que se puede desarrollar en el Ecuador con los mismos fines de conservación, llevando a cabo programas de reforestación y restauración de

poblaciones disminuidas o mantenimiento de poblaciones viables (Vega *et al.*, 2007).

Bajo condiciones naturales la recuperación de esta especie es complicado ya que la semillas presentan bajo poder germinativo, una dispersión pobre y las plántulas son consumidas por el ganado presente en el terreno, lo que hace que la reproducción natural se efectúe a largo plazo (Vega, 2000 en Quezada & Rocabado, 2005).

1.2 Justificación del Problema

Los bosques de *Polylepis* cumplen un rol central en la ecología altoandina, como hábitat de muchas especies de plantas y animales, regulan la escorrentía, controlan los procesos erosivos, aumentan el aporte hídrico mediante la condensación de neblina en sus hojas, protege las cuencas, la calidad de los suelos y del agua (Renison & Cingolani, 2002; Boza *et al.*, 2005; Kessler, 2006), por lo que la pérdida de estos bosques generaría un gran impacto al ambiente y a la biodiversidad.

El género *Polylepis* representan uno de los ecosistemas más amenazados del mundo y en el Ecuador, *Polylepis microphylla* es la única especie de este género con una distribución tan restringida, las visitas a este bosque han demostrado una notable disminución poblacional debido al incremento de las áreas de pastoreo, de sembríos, quema de los bosques, extracción leña y la introducción de otras especies como *Polylepis racemosa* y de los géneros *Eucalyptus spp* y *Pinus spp* que producen una alteración y desequilibrio del ecosistema, (Jameson, & Ramsay, 2007; Boza *et al.*, 2005; Kessler, 2006; Renison & Cingolani, 2002).

En los andes ecuatorianos la gente opta por las plantaciones de *Eucalyptus spp* y *Pinus spp* debido a su rápido crecimiento y se limitan los sembríos de especies nativas porque la experiencia forestal es limitada y no obtiene los mismo beneficios económicos que al usar las otras especies exóticas o introducidas (Hofstede *et al.*, 2002).

En muchas regiones del mundo las plantaciones de árboles exóticos están sujetas a muchas críticas debido a que genera impactos negativos en el balance del agua, la fertilización de los suelos y la biodiversidad nativa. Un posible impacto de los pinos, aunque no se puede generalizar para todas las zonas, es su capacidad de absorber una gran cantidad de agua, secando los suelos, alterando las propiedades hidrológicas y la distribución de compuestos minerales y orgánicos (Hofstede et al., 2002).

Por lo mencionado, se deben desarrollar estrategias para la conservación y restauración de estos bosques, siendo el cultivo *in vitro* una de las alternativas para la propagación de esta especie ya que en condiciones naturales y bajo diversos factores antropogénicos la recuperación de estos bosques es muy complicada (Vega et al., 2007).

La estandarización de la técnica de cultivo *in vitro* contribuirá para el establecimiento de un programa de conservación de esta especie localizada en la Provincia del Chimborazo, la información y resultados obtenidos serán fundamentales para el establecimiento de planes de manejo, rehabilitación y conservación de los páramos. Además, será un gran aporte para los investigadores del área biológica, agronómica, forestal y biotecnológica, así como para la población de las ciudades interandinas que dependen del agua de los páramos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo principal

- Estandarizar las fases del cultivo *in vitro* para *Polylepis microphylla* como estudio base en la conservación de la especie.

1.3.2 Objetivos específicos

- Estandarizar el método de desinfección en *Polylepis microphylla* para el control y eliminación de la contaminación externa.

- Estandarizar el método de control de oxidación para minimizar la biosíntesis de polifenoles.
- Determinar los mejores medios de establecimiento y multiplicación de brotes para *Polylepis microphylla*.
- Establecer los medios de cultivo para la iniciación de la fase de enraizamiento en *Polylepis microphylla*.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Características generales de la especie

1.4.1.1 Descripción Botánica

El género *Polylepis* pertenece a la familia Rosaceae, subfamilia Rosoidea, tribu Sanguisorbeae (Simpson, 1979). En el Ecuador han sido identificadas siete especies: *Polylepis lanuginosa*, *P. sericea*, *P. pauta*, *P. reticulata*, *P. weberbaueri*, *P. microphylla*, y *P. incana* (Romoleroux, 1996). Dos de ellas (*P. lanuginosa*, *P. reticulata*) son endémicas y seis son consideradas vulnerables debido a su estado actual de aislamiento y tamaño poblacional (Simpson, 1979; Romoleroux, 1996).

Las especies de este género son principalmente árboles o arbustos, con troncos torcidos, corteza delgada y exfoliante (ritidoma); hojas alternas, imparipinnadas, inflorescencia simple, raramente ramificada. Flores generalmente con 4 brácteas simples; hipantio más o menos urceolado con espinas o alas; episépalo ausente; sépalos más o menos valvados persistentes; pétalos ausentes; estambres 6-36, anteras pubescentes; un carpelo; un óvulo pendular; estilo viloso o hispido en la base, estigma fimbriado. Fruto aquenio, con 1 semilla dentro del hipantio. Semillas más o menos fusiformes, con testa delgada o subcoreacea (Simpson, 1979; Romoleroux, 1996).

La especie de *Polylepis microphylla* comprende árboles o arbustos hasta de 4 m. Hojas imparipinnadas, con 3-5 pares de folíolos; vaina estipular vilosa o glabrescente, pelos blanquecinos o cremas, proyecciones obtusas; pecíolo de 1-5 mm, viloso; lámina de 20-27 x 6-12 mm; raquis con una capa

panosa resinosa de pelos anaranjado, bajo la cubierta de pelos lanosos crema, punto de incisión de los folíolos con un anillo panoso-resino anaranjado bajo la cubierta lanosa; folíolos 3-6 x 2,5-5 mm, oblóngos, obovados, ápice emarginado, margen revoluto y entero, haz esparcidamente viloso o glabro, envés densamente lanoso pelos blancos cremosos a grisáceos (Romoleroux, 1989).

Las inflorescencia son de 2,5 a 3,6 mm, racimo simple; pedúnculo viloso; 4 a 5 flores; brácteas 6 x 4.5 mm, glabrescentes o esparcidamente vilosas, pedicelo de 0,5 mm. Flor de 6,5-7 mm; hipantio de 2,5-4,5 mm, con espinas cortas, una capa panosa resinosa anaranjada, bajo una cubierta lanosa blanquecina, 4 sépalos, de 15-20 estambres, filamentos 1- 2 mm; anteras 1-1,5 x 0,8-1 mm; estilo 1-1,5 mm, hispido hacia la base. Aquenio de 3-5 x 2,5-3,5 mm, espinoso y esparcidamente lanoso; semilla de 2-4 mm, testa café amarillenta (Romoleroux, 1989).

1.4.1.2 Distribución Geográfica de la especie

El género *Polylepsis* comprende un grupo de especies leñosas que crecen a mayor altura en Sudamérica, incluye 28 especies de árboles y arbustos que se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo de la Cordillera de los Andes, desde el norte de Venezuela en el estado de Lara hasta Tarapacá en Chile y Córdoba en la Argentina (Kessler, & Shmidt-Lebuhn, 2006; Boza et al., 2005).

Polylepsis microphylla se localiza al este de la Provincia del Chimborazo, cantón Alausí, parroquia Achupallas, Vía Achupallas–Lagunas de Osogoche Km 15, las coordenadas del bosque son 75° 56` 98 E, 97° 49` 56,1N, a una altura de 3650 msnm hasta alrededor de los 4000 msnm, (Romoleroux, 1989).

1.4.1.3 Estado actual de la especie y factores antropogénicos

Polylepis representan uno de los ecosistemas más amenazados del mundo y en el Ecuador, *Polylepis microphylla* es la única especie de este género con una distribución tan restringida, las visitas a este bosque han demostrado una notable disminución poblacional debido al incremento de las áreas de pastoreo, de sembríos, quema de los bosques, extracción leña y la introducción de otras especies como *Polylepis racemosa* y de los géneros *Eucalyptus* y *Pinus*, estos factores antropogénicos producen una alteración y desequilibrio del ecosistema. Como consecuencia de ello la biodiversidad se ha visto gravemente afectada debido a la reducción de las funciones del bosque montañoso, limitando y alterando el ciclo de los recursos como el agua y nutrientes (Renison et al., 2004, Renison et al., 2005).

Las áreas deforestadas se siembran con especies no nativas que a menudo son más exitosas y presentan ventajas como: rápido crecimiento en un mayor rango de sitios, facilidad en su manejo, semillas genéticamente superiores; frente a las que se encontraban naturalmente (Richardson, 1998). Sin embargo, estas especies introducidas a menudo no logran proporcionar al ecosistema las características provistas por las plantas endémicas y pueden afectar negativamente al ambiente y a la biodiversidad o pueden también invadir otras áreas que no han sido plantadas. (Renison et al., 2005).

Los bosques de *Polylepis* comúnmente son restringidos a laderas rocosas o quebradas, los estudios recientes son los que han demostrado que la distribución de este género es resultado de miles de años de actividades humanas en los Andes, como es la frecuente quema de pastizales que la efectúan para mejorar los pastizales y antiguamente como parte de las prácticas de cacería (Kessler, 2006).

Los árboles maduros de *Polylepis* comúnmente sobreviven a la quema de los pastos, pero las plántulas y árboles juveniles de *Polylepis* mueren por el fuego. Por lo tanto la regeneración de estos bosques es restringida y en el transcurso del tiempo los bosques desaparecen (Kessler, 2006).

La influencia del fuego es intensificada por el pastoreo, que en muchas partes de los Andes es efectuada con densidades de ganado muy superiores a la capacidad sostenible del ecosistema, además la extracción de leña para consumo local o para la producción de carbón así como la destrucción directa del bosque para incrementar áreas de cultivo fueron y siguen siendo otros factores antropogénicos que han llevado a la destrucción de los bosques de *Polylepis*. Esto ha llevado a la degradación de los ecosistemas, incluyendo mayor erosión y menor captación de agua durante la época de lluvias. Este último efecto es particularmente importante para las áreas agrícolas en los valles o altitudes menores que dependen del agua proveniente de las montañas altas (Kessler, 2006).

1.4.1.4 Importancia de la especie

Los bosques de *Polylepis microphylla* cumplen un rol central en la ecología altoandina, como hábitat de una gran variedad de mamíferos, aves e insectos incluyendo a algunas de las especies de aves más raras del mundo, muchas de estas especies tienen una distribución geográfica muy restringida y pueden ser endémicas de estos bosques (Renison & Cingolani, 2002; Boza et al., 2005; Kessler 2006).

Además estos bosques regulan la escorrentía, controlan los procesos erosivos, aumentan el aporte hídrico mediante la condensación de neblina en sus hojas, protegen las cuencas, la calidad de los suelos y del agua (Renison & Cingolani, 2002; Boza et al., 2005; Kessler 2006). Las áreas agrícolas en los valles o poblaciones a altitudes menores dependen del agua proveniente de las montañas altas que albergan a los bosques *Polylepis* (Kessler, 2006).

1.4.2 Cultivo in vitro

El cultivo *in vitro* de plantas o tejidos vegetales se define como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles de partes de una planta, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos (Pierik, 1990). Se les proporciona artificialmente condiciones físicas y químicas

apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca & Mroginski, 1993).

Esta técnica se caracteriza porque ocurre a una micro escala sobre una superficie pequeña; se optimizan las condiciones ambientales refiriéndose a los factores físicos, nutricionales y hormonales; además se elimina por completo la presencia de microorganismos y organismos patógenos o plagas; generalmente no se reproduce el patrón normal de desarrollo de una planta, ya que de un tejido aislado puede originarse un callo u otro órgano o embriones somáticos (Pierik, 1990).

La micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro* permitiendo reproducir cientos de clones de una misma especie, o de plantas con genotipos selectos, además esta técnica permite obtener otras ventajas versus los métodos convencionales como son: reducir los tiempos de multiplicación; tener mayor control de sanidad, facilita el transporte de material *in vitro* de un país a otro y permite multiplicar grandes cantidades de plantas en espacios reducidos (Roca & Mroginski, 1993).

Si bien la micropropagación representa una inversión adicional en la infraestructura y equipamiento del laboratorio, el beneficio que presenta a mediano y largo plazo es mucho mayor que el obtenido mediante el cultivo convencional, además las condiciones de laboratorio en la que se realiza la micropropagación permiten obtener nuevas plántulas todo el año, independientemente del factor climático (temperatura, luz, humedad, etc.) y gracias a esto se pueden abastecer los viveros durante todo el año (Hatmann & Kester 1997).

1.4.3 Tipos de cultivo *in vitro*

Las plantas son organismos fotoautotróficos capaces de utilizar la energía luminosa para asimilar y convertir el CO₂, el agua y los nutrientes inorgánicos en compuestos orgánicos necesarios para el crecimiento celular. Las plantas son organismos multicelulares, son el resultado de las divisiones

mitóticas sucesivas del cigoto, por lo tanto poseen la misma información genética, pero al examinar a la planta a diferentes niveles de organización podemos observar una gran diversidad de formas celulares que se estructuran en tejidos y órganos para desarrollar funciones específicas en el individuo completo (Alemán, 2000b).

La especialización origina un sistema complejo e interdependiente en sus unidades constitutivas, así las células radicales se especializan en la absorción y transporte de nutrientes, mientras que las células de las hojas, transforman la energía lumínica en energía química. Por esta razón es muy probable que al separar un segmento de tejido o una célula de la planta, no sea capaz de crecer y desarrollarse cuando se le coloca en un medio simple químicamente. Siendo necesario la adición de todos los nutrientes, vitaminas y reguladores de crecimiento al medio sintético para el desarrollo del material vegetal separado de la planta, que pueden ser células, tejidos u órganos (Alemán, 2000b).

Los cultivos "*in vitro*" pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta. Sin embargo, la fuente inicial del material vegetal puede ser determinante para el éxito en el establecimiento de los cultivos. Para establecer los cultivos se utilizan pequeños segmentos de tejidos empleándose generalmente medios semisólidos o líquidos. A partir de los segmentos y con el uso de reguladores de crecimiento se puede inducir la formación de callos (masa de células indiferenciadas) o de órganos (raíces, brotes o embriones) (Alemán, 2000b).

Existen varios tipos de cultivo *in vitro* y estrategias de propagación clonal debido a la diversidad de material vegetal que encontramos en la constitución de la planta. Dentro del cultivo de tejido desorganizado está el cultivo de callos y células en suspensión; y en el cultivo de estructuras organizadas está el cultivo de órganos y para propósitos de micropropagación los más importantes son: cultivo de meristemas, cultivo de ápices caulinares, cultivo de segmentos nodales y cultivo de embriones (Guerra & Nodari, 2004).

1.4.3.1 Cultivo de tejido desorganizado

1.4.3.1.1 Cultivo de callos

Se denomina al cultivo en el cual una porción de tejido se desdiferencia *in vitro*, originando un callo (Pierik, 1990). El callo se define como una masa de células desdiferenciadas las cuales presentan un crecimiento continuo y acelerado, sin una organización aparente que da el aspecto de una masa amorfa de tejido (Alemán, 2000b).

La proliferación de callos se puede obtener de una gran variedad de tejidos vegetales, frecuentemente se usan ápices caulinares o meristemas, hojas, raíces, anteras, entrenudos y cotiledones. En general los callos derivados de plántulas o embriones tienen un mayor potencial morfológico (Alemán, 2000b).

El cultivo de callos se puede emplear para la regeneración de plantas a través de la organogénesis o la embriogénesis, lo cual permite su utilización para propagación masiva y la mejora de plantas, también para la obtención de metabolitos secundarios, investigaciones en fisiología vegetal, fitotoxicología y estudios de estructura celular (Alemán, 2000b).

1.4.3.1.2 Cultivo de células aisladas

Se denomina así al crecimiento de células individuales, obtenidas de un tejido, callo o cultivo en suspensión con la ayuda de enzimas o mecánicamente (Pierik, 1990). Las suspensiones celulares tienen ventajas sobre los cultivos de callos, ya que las células al estar disgregadas tienen más acceso nutritivo al medio de cultivo y se evitan algunos de los gradientes y variaciones fisiológicas de los cultivos de callos (Hatmann & Kester 1997).

1.4.3.2 Cultivo de estructuras organizadas

Se pueden distinguir varios tipos, entre ellos: el cultivo de meristemas, cultivo de ápices del vástago, cultivo de raíces, cultivo de anteras, etc. Por lo

general se denomina explante a una porción de tejido u órgano aislada de una planta (Pierik, 1990) y para propósitos de micropropagación los más importantes son: cultivo de meristemas, cultivo de ápices caulinares, cultivo de segmentos nodales y cultivo de embriones (Guerra & Nodari, 2004).

1.4.3.2.1 Cultivo de meristemas

El meristemo, es una estructura dinámica en la que continuamente se está produciendo crecimiento y división celular (Afanador, 2005).

Los meristemas pueden clasificarse por su origen, posición y la estructura que originan. Los meristemas apicales (primarios) del tallo y de la raíz conducen al desarrollo del cuerpo primario (raíz, tallos y hojas) de la planta y se forman durante la embriogénesis. Los meristemas secundarios como los axilares son similares a los primarios en estructura y desarrollo, aunque dan origen a raíces o tallos secundarios (Randall & Hake, 1997).

El uso de meristemas ha permitido la micropropagación de diferentes especies vegetales; constituyen el explante ideal para liberar de patógenos *in vitro* a plantas infectadas por virus, hongos o bacterias y además son ampliamente utilizados como explantes para la criopreservación y conservación de germoplasma (Alemán, 2000a).

El cultivo aséptico de ápices y meristemas permite la formación de una plántula y posteriormente la inducción de brotes axilares, este procedimiento constituye la base de la mayoría de los métodos de propagación *in vitro* vía organogénesis. El término "cultivo de meristemas" ha sido utilizado para designar a fragmentos de tejidos en un rango de 0,1 mm hasta 1 cm o más. Sin embargo, para el cultivo aséptico y el saneamiento este término implica el aislamiento del domo meristemático mas el primer primordio foliar en un rango de 0,1-0,5 mm. A partir de este tamaño se considera cultivo de ápice (Alemán, 2000a).

1.4.3.2.2 Cultivo de ápices caulinares

Este tipo de cultivo se inicia a partir de ápices caulinares o yemas laterales. Este tipo de multiplicación se ha venido usando para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos; en algunos casos se genera una planta o se estimula la formación de múltiples brotes, en general se espera lograr la formación de ramas axilares que pueden separarse y enraizarse; teóricamente los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se subcultiva cada brote recién formado. Este método se ha aplicado a una gran variedad de especies herbáceas y leñosas permitiendo obtener una rápida multiplicación clonal de plantas seleccionadas (Roca & Mroginski, 1991).

1.4.3.2.3 Cultivo de segmentos nodales

En los nudos o segmentos caulinares hay puntos de crecimiento laterales que se pueden estimular para desarrollar nuevos vástagos, es decir al realizar este tipo de cultivo se aísla una yema junto con una porción de tallo, una de las alternativas cuando se hace este tipo de cultivo es obtener un vástago a partir de la yema o permitir que la yema se desarrolle, posteriormente se añaden citocininas para frenar la dominancia apical e inducir formación de vástagos o yemas axilares, cuando se produce un número suficiente de vástagos, pueden ser enraizados, y las plántulas obtenidas trasladadas al suelo (Hatmann & Kester 1997; Pierik, 1990).

Este método es el más utilizado en la propagación comercial, debido a la estabilidad genética de las plantas obtenidas y a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies. Su principal desventaja radica en la laboriosidad del proceso, lo cual implica altos costos por mano de obra, bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas de regeneración y escasa posibilidad de automatización del proceso productivo. (Aleman, 2000a).

1.4.3.2.4 Formación de yemas adventicias

La inducción de la producción de tallos o ramas adventicias directamente de raíces, hojas, escamas de bulbos y de otros órganos de plantas es un método común de propagación. Los brotes adventicios pueden desarrollarse ya sea directamente en el mismo explante o indirectamente en masa no organizada de tejidos de callos (Hartmann & Kester 1997).

La proliferación de yemas adventicias se logra empleando altas concentraciones de citokininas en el medio de cultivo. Con esta técnica es posible producir un elevado número de plantas en corto tiempo, pero tiene el inconveniente de que es una fuente de variabilidad genética, ya que al formarse de una célula o de pequeños grupos de células puede existir el caso de ser mutadas y extenderse dicha mutación. Sin embargo al igual que el método de yemas axilares tiene la limitante de que el proceso productivo es realizado en dos etapas: producción de brotes y crecimiento-enraizamiento. Este método ha tenido su mayor aplicación en la propagación de plantas ornamentales donde la ocurrencia de plantas fuera de tipo no es un problema (Aleján, 2000a).

1.4.3.2.5 Cultivo de embriones

Consiste en cultivar embriones aislados después de retirar los tejidos externos de las semillas (Pierik, 1990). Los embriones se pueden separar en varias etapas de su desarrollo y ser puestos a germinar asépticamente en un medio estéril. Esta técnica puede emplearse para el rescate de embriones que habrían abortado en su secuencia normal en la planta (Hartmann & Kester 1997).

El cultivo de embriones en estado inmaduro requiere condiciones adecuadas que estimulen una embriogénesis en vez de germinación precoz, pero cuando el embrión está en una etapa más avanzada del desarrollo, puede ser adecuado un medio simple que contenga solo sucrosa y minerales. El cultivo de embriones también es útil para inducir germinación de semillas

maduras en letargo y poder acortar los ciclos de crianza (Hartmann & Kester 1997).

1.4.3.3 Rutas morfogénicas

1.4.3.3.1 Organogénesis directa

La organogénesis es un evento morfogenético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, es en sí la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final. (Alemán, 2000a; Hartmann & Kester 1997).

Los estudios realizados por Skoog en 1957 demostraron la importancia de las proporciones de auxinas-citoquininas en la determinación de la respuesta morfogénica "*in vitro*". Una proporción alta de auxinas favorece el desarrollo de raíces, mientras una proporción baja favorece la formación de brotes. Algunas sustancias además como la caseína hidrolizada modificaban la actividad reguladora de las proporciones auxinas-citoquininas. Esto sugirió que el balance de ciertos factores afectaría el proceso de diferenciación y se consideraba la base para el desarrollo de un medio definido de organogénesis "*in vitro*". Una función primaria de la mitosis en la organogénesis es la formación de un número crítico de células en división activa; las cuales son capaces de responder a las señales de desarrollo (Alemán, 2000a).

Los meristemoides o regiones localizadas de células en división activa, se componen de células isodiamétricas, pequeñas, con un citoplasma denso, y núcleo prominentes que usualmente contienen varios orgánulos y grandes cantidades de almidón, del cual requiere en cantidades considerables durante su diferenciación. La mayoría de los meristemoides se asemejan a meristemas verdaderos y poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido originario; los cuales bajo condiciones apropiadas pueden formar yemas

o raíces. La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias (Alemán, 2000a).

En este tipo de propagación la formación de brotes adventicios o de raíz ocurre en el explante de un órgano o en alguna parte escindida de la planta. La formación de los brotes se da directamente sin la formación de callo (Roca & Mroginski, 1991).

1.4.3.3.2 Organogénesis Indirecta

En este caso la formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en el callo, sabiendo que el callo se deriva inicialmente de un órgano, tejido o una parte escindida de la planta (Roca & Mroginski, 1991).

1.4.3.3.3 Embriogénesis somática

En la embriogénesis somática los embriones pueden formarse directamente en el explante primario o indirectamente de las células cultivadas en suspensiones o en un medio sólido (Roca & Mroginski, 1991).

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos. Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales. Sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies en los cuales se reporta una embriogénesis somática eficiente que permita un uso aplicado del método (Alemán, 2000a).

1.4.4 Medios de cultivo y composición

Los medios de cultivo son combinaciones de minerales (macro y micro), agua, hidratos de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento y ocasionalmente otras sustancias variadas (figura 1.1). Pueden ser sólidos, semisólidos o líquidos según el protocolo del sistema de cultivo. Estos medios de cultivo proporcionan las sustancias esenciales para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales (Guerra & Nodari, 2004; Sabit, 2006).

Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales		
Agua		
Sustancias orgánicas	Macro	Micro
	elementos	
Azúcares	N	Fe Co
Aminoácidos	P	Zn Ni
Auxinas	K	B Al
Citoquininas	Ca	Mn Mo
Reguladores Giberelinas	Mg	Cu I
Acido abcísico	S	
Etileno		
Mezclas de sustancias poco definidas:		
Extracto de levadura		
Leche de coco		
Extractos vegetales		
Hidrolizados de caseína		
Peptona y triptona		

Figura 1.1 Conjunto de sustancias que se añaden a los medios de cultivo para inducir el crecimiento y desarrollo; como el agua, compuestos orgánicos, inorgánicos (a la derecha), y sustancias de composición poco definidas (Pierik, 1990).

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento óptimo *in vitro* varía con la especie y pueden ser específicos de acuerdo a la parte de la planta o tipo de tejido que se cultiva y a la respuesta que se desea obtener (Sabit, 2006). Esto se debe a que el crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por diversos factores como: la constitución genética de la planta, los nutrientes presentes en el medio de cultivo, los factores físicos (luz

temperatura, pH, etc.) y las sustancias orgánicas como reguladores, vitaminas, etc. (Pierik, 1990).

La composición de los medios de cultivo incluye múltiples componentes nutricionales esenciales y opcionales, en la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 a 35 compuestos químicos que suministran carbono, nutrientes minerales, vitaminas, agente gelificante, sustancias reguladoras del crecimiento y otros compuestos (Guerra & Nodari, 2004; Roca & Mroginski, 1993).

Los principales componentes de los medios de cultivo son los siguientes:

1.4.4.1 Agua

Es el componente con mayor cantidad en el medio de cultivo, constituye el 95% del medio, se recomienda usar agua destilada, bidestilada y desionizada. La utilización de agua de grifo o agua corriente puede poner en peligro el desarrollo del cultivo, debido a que además de contener contaminantes orgánicos y microorganismos posee una alta concentración de iones de calcio y puede afectar precipitando ciertos componentes del medio de cultivo. El mejor lugar para almacenar el agua son recipientes de polietileno, ya que el vidrio contiene trazas de plomo, sodio y arsénico que pueden pasar al agua. Si se utiliza vidrio debe ser tipo Pyrex y además los recipientes usados deben ser limpiados de forma especialmente escrupulosa (Guerra & Nodari, 2004; Pierik, 1990).

1.4.4.2 Nutrientes minerales

Los nutrientes utilizados en los medios de cultivo son los mismos establecidos para la nutrición mineral de las plantas en el campo. Entre estos tenemos el nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio, hierro, boro, molibdeno, cobre, zinc, manganeso y cobalto (Guerra & Nodari, 2004; Pierik, 1990).

Nitrógeno: Este se pueden añadir a los medios de cultivo en forma orgánica o en forma mineral. Puede estar disponible como amonio (cationes) o nitratos (aniones), o en forma de compuestos orgánicos, dependiendo del tipo de cultivo. El nitrógeno forma parte de los aminoácidos, nucleótidos y coenzimas, además de ser muy importante en la síntesis de proteínas. La glutamina (precursor de varios aminoácidos) es la más utilizada como fuente de nitrógeno orgánico (Guerra & Nodari, 2004).

Otras fuentes de nitrógeno son el ácido cítrico, succínico o málico, la urea y la caseína hidrolizada. Las necesidades totales de N, varían entre 12-60nmol/L, de los cuales al NH^{4+} le corresponden 6-20 y al NO^{3-} 6-40 mmol/L. La mayor parte de las plantas prefieren el NO^{3-} al NH^{4+} , aunque en algunos casos puede ocurrir lo contrario. Los medios enriquecidos con nitrógeno son esenciales para la embriogénesis somática y la diferenciación de las partes aéreas de la planta (Guerra & Nodari, 2004; Pierik, 1990).

Fósforo: Este elemento se añade al medio en forma de fosfato de potasio monobásico, es la forma en que es absorbida. Funciona en el metabolismo energético, en la regulación de los procesos enzimáticos y la activación de enzimas. Necesario para la síntesis de ATP, en la organogénesis está involucrado en la diferenciación de las partes aéreas de la planta, puede revertir el efecto de las auxinas (Guerra & Nodari, 2004).

Potasio: Se utiliza en forma de nitrato, fosfato o cloruro. Es activador de varias enzimas del metabolismo de los hidratos de carbono y proteínas. Una de las más importantes es el piruvato kinasa, enzima implicada en los procesos de respiración y glicolisis. Es necesario en la embriogénesis somática. La deficiencia de potasio puede disminuir la tasa de absorción de fosfatos (Guerra & Nodari, 2004).

Azufre: Se utiliza como sulfato o en forma de aminoácidos (cisteína, metionina y cisteína). Participa en el metabolismo energético de formación de la fosfosulfato de adenosina, además es un elemento que forma parte

constitutiva de la tiamina, biotina y la coenzima A. Su absorción se relaciona con la asimilación del nitrógeno independientemente del pH (Guerra & Nodari, 2004).

Calcio: Se utiliza en forma de nitrato y cloruro. Está involucrado en la división celular. Mantiene la integridad de la membrana celular y es importante para la germinación de los granos de polen. Las altas concentraciones de calcio (6 a 9 mM) son necesarios para el control de la necrosis del ápice caulinar (Guerra & Nodari, 2004).

Magnesio: Se lo utiliza en forma de sulfato de magnesio. Es un componente de la clorofila, es también un cofactor importante para muchas reacciones enzimáticas que actúan sobre sustratos fosforilados (Guerra & Nodari, 2004).

Hierro: Se lo considera en un rango intermedio entre los macro y micronutrientes. Se añade al medio en forma de quelato Fe-EDTA. Participa en las reacciones de oxido-reducción en los organismos vivos. Es un elemento esencial para la síntesis de clorofila y es parte integral del grupo hemo de las proteínas porfirinas (Guerra & Nodari, 2004).

Boro: Se utiliza generalmente como ácido bórico. Está involucrado en el metabolismo de los hidratos de carbono y ácidos nucleicos. Es importante en germinación de los granos de polen y en el crecimiento del tubo polínico (Guerra & Nodari, 2004).

Molibdeno: Este elemento se añade como molibdato de sodio (Na_2MoO_4). Actúa como cofactor de la nitrato reductasa (Guerra & Nodari, 2004).

Cobre: Se utiliza como sulfato de cobre. Se trata de un catión en el que la dosis por encima de lo normal en los medios cultivos es fitotóxico. Es un constituyente importante de enzimas involucradas en el transporte de electrones (Guerra & Nodari, 2004).

Otros micronutrientes como el Zinc (sulfato de zinc), el cual es importante en las reacciones de oxido-reducción y actúa como cofactor de la enzima anhidrasa carbónica; otro elemento es el manganeso, el cual se lo emplea como sulfato de manganeso y por último el cobalto que se lo utiliza como cloruro de cobalto (Guerra & Nodari, 2004).

1.4.4.3 Fuentes de carbono

Muy pocos cultivo *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es esencial agregar al medio una fuente de carbono para el crecimiento y desarrollo. Generalmente se usan concentraciones del 2% al 5% de sacarosa (un disacárido), ya que este se sintetiza y se transporta de forma natural por las plantas, se puede reemplazar por glucosa y fructuosa, la maltosa y la galactosa son menos efectivas. Las concentraciones de azúcar dependen mucho del tipo y edad del material vegetal, por ejemplo los embriones jóvenes y anteras requieren concentraciones altas del 6% al 12%, mientras que en protoplastos se usan concentraciones del 1,5%. Generalmente el crecimiento y desarrollo aumento con la concentración de azúcar, hasta que alcanza un punto óptimo, disminuyendo después para muy altas concentraciones (Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1991).

1.4.4.4 Vitaminas

Las vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivos *in vitro* y la falta de alguna de ellas puede ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis (Alemán, 2000b). La tiamina se puede usar en concentraciones de 0,1 a 5 mg/L, tiene un efecto claro en los medios de cultivo y es probable que en forma general sólo sea esencial incorporar tiamina al medio (Roca & Mroginski, 1991). También se ha visto efectos favorables al emplear, ácido nicotínico (0,1-5 mg/L), piridoxina (0,1-1mg/L) y riboflavina (0,1-10 mg/L) sobre el crecimiento de los cultivos (Pierik, 1990).

El compuesto que más frecuentemente se añade a los medios de cultivo es el mioinositol que se emplea en concentraciones entre 50 – 500

mg/L y su efecto se evidencia sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis (Alemán, 2000b). El ácido ascórbico (1 – 100 mg/L) y el ácido cítrico (50 –100 mg/L) se utilizan en ocasiones no como vitaminas sino como antioxidantes para evitar el oscurecimiento de determinados tejidos (Alemán, 2000b; Pierik, 1990).

1.4.4.5 Agente gelificante

Los medios de cultivo pueden ser sólidos, semisólidos y líquidos según la concentración del agente gelificante, entre las sustancias más utilizadas se encuentra el agar, es un polisacárido obtenido de la purificación de las algas, este solidifica el medio y forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica. El agar presenta algunos inconvenientes; el principal consiste en ofrecer una aireación insuficiente que puede afectar el crecimiento de algunos tejidos (Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1991).

La concentración óptima de agar es variable con el origen comercial del agar utilizado y el objetivo del cultivo. Las concentraciones más utilizadas varían entre 6 – 10 g/L. La pureza del agar también es otro factor muy importante, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variable, la marca comercial y las concentraciones de agar utilizado pueden alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos (Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1991).

1.4.4.6 Reguladores de crecimiento

Las fitohormonas son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen en el crecimiento y el desarrollo, actúan generalmente en lugares diferentes a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. Actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citokininas, ácido abscísico y etileno. Además de estas sustancias naturales, existen numerosos productos de síntesis que pueden utilizarse como reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro*. A los productos sintéticos junto con las fitohormonas se les denomina

reguladores y son los responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza y determina el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta. (Alemán, 2000b; Pierik, 1990).

Otras sustancias que eventualmente pueden clasificarse como fitohormonas son: las poliaminas, los jasmonatos, el ácido salicílico, los brasinosteroides, y la sistemina (García, 2004).

Los reguladores como las citokininas y las auxinas juegan un papel muy importante y generalmente el cultivo *in vitro* es imposible sin reguladores, aunque el añadir estos compuestos al medio de cultivo, depende del tipo explante y especie vegetal. Por ejemplo hay cultivo que no necesitan adición exógena de auxinas o citokininas para conseguir la extensión o división celular, según esto se puede hablar de cuatro tipos de cultivo: Cultivo que no necesitan ni auxinas ni citokininas; cultivos que necesitan solo auxinas; cultivos que necesitan solo citokininas y cultivo que necesitan de ambas (Pierik, 1990).

Generalmente se preparan soluciones madre de los reguladores, pero pueden presentarse algunos problemas, por ejemplo al disolver IAA, IBA, y NAA se recomienda usar NaOH 1 N, ya que no se pueden disolver directamente en agua, las citokininas también se recomienda disolver en NaOH 1 N y las giberelinas con etanol o un sonificador. Se debe tomar muy en cuenta que algunos reguladores son inestables a la luz, como el IAA y la kinetina, por lo que deben almacenarse en oscuridad para evitar que se descompongan y pierdan su actividad. También un almacenaje prolongado trae problemas adicionales, como por ejemplo, el IAA en solución acuosa se vuelve poco a poco inactivo o se descompone por la acción de algunas enzimas (Pierik, 1990).

1.4.4.6.1 Auxinas

Son compuestos que tienen un núcleo indólico, éste se sintetiza a partir del aminoácido Triptófano que se sintetiza por la vía Shikímica, la

principal auxina es el ácido 3-indolacético (AIA) (Alemán, 2000b), esta se la utiliza en concentraciones de 0,001-10 mg/L, con un punto óptimo alrededor de 0,1 a 1mg/L (Roca & Mroginski, 1991) y forma parte del grupo de auxinas vegetales como son: el indol-3-acetonitrili, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehido, indol-3-acetaldeido, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, ácido indol-3-propiónico, ácido 5-hidroxiindol-3-acético y el ácido indol-3-acetilaspártico, pero también se pueden emplear auxinas sintéticas y relativamente más activas como el ácido 3- indol butírico (AIB), el 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 3 naftoxiacético (NOA), que son auxinas fuertes. Otros compuestos sintéticos pueden comportarse como auxinas muy débiles como el ácido fenilacético (Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1991).

Las propiedades de las distintas auxinas son diferentes, generalmente producen elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de vástagos axilares y adventicios y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. Con una baja concentración de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxina no se producen raíces, y tiene lugar la formación de callos (Pierik, 1990).

En la práctica no es posible establecer una concentración particular de la auxina que se deba utilizar en un solo caso, esto dependerá mucho de la especie, tipo de tejido y otros factores. El 2,4-D se utiliza en concentraciones que varía de 0.1 a 10 mg/L, con un punto óptimo de alrededor de 1 a 5 mg/L; el ANA generalmente se usa en concentraciones que van de de 1 a 10 mg/L con un punto óptimo de alrededor de 2 mg/L (Roca & Mroginski, 1991). El AIA es la auxina natural más difundida en las plantas, es ampliamente utilizada en los medios de cultivo pero es sensible a la degradación enzimática (AIA-oxidasa) y a la fotoxidación. El ANA es una auxina fuerte que se utiliza para inducir la rizogénesis, a veces en asociación con el AIB (Alemán, 2000b).

El 2,4-D es una auxina muy fuerte, tóxica a concentraciones elevadas, que es un fuerte activador de la actividad meristemática; su empleo es amplio,

muchas veces ligado a citocininas, en trabajos de cultivos celulares, cultivos de tejidos, embriogénesis somática (Alemán, 2000b). La utilización de esta auxina debe limitarse al máximo ya que puede inducir mutaciones y también inhibir la fotosíntesis (Roca & Mroginski, 1991).

Variando la relación de las concentraciones de auxinas y citocininas se ha podido modificar el desarrollo de las células indiferenciadas de los cultivos de tejidos. Una concentración más o menos igual de las dos hormonas, hace que las células sigan indiferenciadas, formando masas de tejido llamadas callos. Cuando la concentración de auxina es superior, el tejido indiferenciado forma raíces. Con una concentración superior de citocinina, se forman yemas. Con un cuidadoso equilibrio de las dos hormonas se puede producir raíces y yemas (García, 2004).

El ión calcio puede modificar la acción de la combinación auxina/citocinina. En estos estudios, el AIA más la adición de una baja concentración de kinetina conducían a un alargamiento celular, pero al añadir Ca^{2+} al cultivo se inhibía el alargamiento para favorecerse el proceso de división celular. Altas concentraciones de calcio prevenían la expansión de la pared celular, por lo que las células no crecían y cambiaban su ciclo de división celular. En conclusión no sólo las hormonas modifican los efectos de otras hormonas, sino que estos efectos combinados son a su vez modificados por factores no hormonales, tales como el calcio (García, 2004).

1.4.4.6.2 Citocininas

Las citocininas son derivados purínicos, en especial derivados de la adenina, se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, las más comunes son la Kinetina, BA, 2iP y el BAP (Alemán, 2000b). Generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. En concentraciones elevadas (1-10mg/L) pueden inducir la formación de vástagos adventicios e inhibir la formación de raíces (Pierik, 1990). Se han reportado en pequeñas cantidades en el agua de coco, jugo de tomate, extractos de flores, tubérculos, nódulos radicales, en frutos, semillas

inmaduras de maíz (zeatina) o microorganismos, etc. (Alemán, 2000b). Las citokininas promueven la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical, también retardan el envejecimiento (Pierik, 1990).

Entre las citokininas naturales tenemos la zeatina, la isopentenil-adenina (IPA), la dimetil amino-purina, la dihidroxizeatina, la metilzeatina, etc. Son citokininas sintéticas la kinetina (KIN: 6-furfunil aminopurina) el BAP o BA (N-6- bencil aminopurina o N6-benciladenina). Recientemente se ha descrito que la N-6- bencil aminopurina (BAP) o N6-benciladenina (BA) ha sido aislada de plantas y constituye también una citokinina natural (Alemán, 2000b).

Actualmente se han aislado citokininas de muchas especies diferentes de plantas, donde se encuentran, fundamentalmente, en órganos cuyos tejidos se están dividiendo de forma activa, es decir, en semillas, frutos, y raíces (García, 2004).

Los efectos fisiológicos producidos por las citokininas pueden variar dependiendo del tipo de citokinina y de la especie vegetal, entre estos tenemos: estimular la división celular, la morfogénesis en cultivo de tejidos; el desarrollo de las yemas laterales; contrarresta la dominancia apical; estimula la expansión foliar debido al alargamiento celular; pueden incrementar la apertura estomática en algunas especies; retrasan la senescencia foliar al estimular la movilización de nutrientes y la síntesis de clorofila; promueven la conversión de etioplastos en cloroplastos vía estimulación de la síntesis de clorofila; intervienen en la estimulación de la pérdida de agua por transpiración y permiten eliminar la dormición que presentan las yemas y semillas de algunas especies (García, 2004).

1.4.4.6.3 Giberelinas

Las giberelinas son dipertenos, derivados de la vía isoprenoide, con una estructura básica denominada esqueleto gibánico o giberelano; la giberelina más difundida es el AG₃ o ácido giberélico, en la actualidad se

conocen más de 90 giberelinas diferentes, aunque en una misma planta pueden encontrarse solo algunas de ellas (Alemán, 2000b).

Las giberelinas aisladas de tejidos vegetales varían algo en estructura y también en actividad (García, 2004). La giberelina más conocida, el ácido giberélico es producida por el hongo *Gibberella fujikuroicuya* (Roca & Mroginski, 1991).

Las giberelinas incrementan tanto la división como la elongación celular, debido a que tras la aplicación de giberelinas se incrementa el número de células y la longitud de las mismas. En las auxinas el mecanismo para el alargamiento celular está mediado en parte por una acidificación que permite un debilitamiento de la pared celular. Sin embargo, éste no parece ser el mecanismo de acción de las giberelinas. Las giberelinas pueden inducir el crecimiento a través de una alteración de la distribución de calcio en los tejidos, por ejemplo se ha demostrado que los iones calcio inhiben el crecimiento de los hipocótilos de lechuga, y esta inhibición puede ser revertida por la aplicación de giberelina (GA₃) (García, 2004).

La respuesta más observada en las plantas superiores es un incremento notable en el crecimiento del vástago; a menudo los tallos se vuelven largos y delgados, con pocas ramas, y las hojas empalidecen. Las giberelinas estimulan a la vez la división celular y afectan tanto a las hojas como a los tallos (García, 2004).

Sus efectos varían según su concentración y el material vegetal. Se han reportado efectos sinérgicos entre las giberelinas, con las auxinas y citoquininas en trabajos " *in vitro*" (Alemán, 2000b). El GA₃, es la más usada, pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor, se pierde el 90% de su actividad biológica después del autoclavado, por lo que debería esterilizarle con filtros (Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1991).

Las giberelinas provocan el alargamiento celular; eliminan el enanismo de las plantas; estimulan la germinación de la semilla de cereales mediante la

inducción de la producción de la α – amilasa; inducen la floración de plantas de días largos; eliminan la dormancia de las yemas, inducen la elongación de los entrenudos, el crecimiento de los meristemas o yemas *in vitro*. (Alemán, 2000b; Pierik, 1990). Generalmente se usa el AG₃ en concentraciones que van de 0.01 a 1mg/L, con un punto óptimo de alrededor de 0.1 mg/L (Roca & Mroginski, 1991).

1.4.4.6.4 Etileno y Ácido abscísico

El etileno es un hormona gaseosa, esta se produce tanto en el cultivo de órganos como en el de callos, también puede darse una acumulación de este gas dentro de los recipientes y en especial los de plásticos, esto produce por ejemplo en ápices de vástagos de clavel una inhibición del crecimiento; pero no existe uniformidad de criterios con respecto al papel desempeñado por el etileno en la organogénesis *in vitro*, algunas referencias nos indican que el etileno no ejerce ninguna influencia en la organogénesis en cambio otras indican un efecto positivo (Pierik, 1990).

En cultivos de callos de tabaco a la luz se demostró que la producción de etileno es mayor cuando se forman vástagos adventicios. El etileno también puede influir en la embriogénesis y formación de órganos en gimnospermas, por ejemplo en cotiledones excisos de *Pinus radiata*, durante la primera semana de cultivo mostraron un incremento de la concentración de etileno y CO₂ en los matraces, induciendo la formación de vástagos adventicios, a diferencia cuando estos gases fueron retirados del matraz el crecimiento se inhibió (Pierik, 1990).

El ácido abscísico (ABA) es un compuesto que existe naturalmente en las plantas. Es un sesquiterpenoide (15 carbonos) que es parcialmente producido a partir del ácido mevalónico en cloroplastos y otros plastos. Otros proponen una ruta biosintética a partir de la degradación de los carotenoides (40 carbonos). El ácido abscísico se obtiene principalmente de las bases ováricas de los frutos. Las proporciones más elevadas de ABA se dan durante

la época de la caída de los frutos (García, 2004). En la mayoría de los casos el ABA produce un efecto negativo en el cultivo *in vitro* (Pierik, 1990).

Los efectos fisiológicos producidos por el ácido abscísico son: estimular el cierre estomático (el estrés hídrico dispara la síntesis de ABA); inhibe el crecimiento del tallo pero no el de las raíces; en algunos casos puede incluso inducirlo; en las semillas induce la síntesis de proteínas de almacenamiento; inhibe el efecto de las giberelinas de inducir la producción de α -amilasa; induce y mantiene la latencia; induce la senescencia en hojas; e induce la transcripción génica de inhibidores de proteasas en respuesta a heridas lo que explicaría su aparente papel en la defensa contra patógenos (García, 2004).

1.4.4.6.5 Oligosacarinas y brasinoesteroides

En los últimos años se han utilizado los brasinoesteroides (BRs) y las oligosacarinas, otros grupos de reguladores, que al incluirse en los medios de cultivo producen efectos positivos sobre el desarrollo de callos, la morfogénesis, la organogénesis, etc. (Alemán, 2000a).

Las oligosacarinas son fragmentos de los polisacáridos de la pared celular, y se descubrió que actúan como mensajeros químicos, con propiedades reguladoras específicas. Las oligosacarinas se desprenden de la pared celular por acción enzimática y actúan en el mecanismo de defensa de las plantas pero también pueden regular la tasa de crecimiento y diferenciación, para producir flores, raíces y yemas vegetativas (Pierik, 1990).

Los brasinoesteroides son derivados esteroidales que tienen un núcleo básico (brasinólido) que se presentan en las plantas y actúan a concentraciones muy bajas; fueron aislados del polen de *Brassica napus*. El brasinólido, el 24-epibrasinólido y el homobrasinólido son los brasinoesteroides naturales más empleados. Debido a que se encuentran en muy bajas concentraciones en las plantas, se trabaja en la síntesis de análogos de brasinoesteroides, que aun no teniendo la estructura del brasinólido con sus

cuatro zonas o sitios activos puedan tener un efecto positivo sobre la fisiología de la planta. (Alemán, 2000a).

1.4.4.7 Otros compuestos

Las poliaminas juntos con enzimas asociadas son importantes en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas, en especial con la diferenciación celular y el desarrollo durante la embriogénesis. Los niveles endógenos de poliaminas (putresceína y espermidina), se incrementan de forma sustancial durante a embriogénesis en zanahoria. La embriogénesis es inhibida por la adición de inhibidores de poliaminas y se restablece con la putresceína, espermidina y espermina. Las poliaminas, junto con uno de sus precursores, la arginina, y el etileno, juegan un papel inter-relacionado en el control de la embriogénesis somática (Pierik, 1990).

Se usan varios compuestos como fuente de nitrógeno y vitaminas. La Caseína Hidrolizada (CH) se la usa en concentraciones de 0,1-1,0 g/L (Pierik, 1990), se la puede aplicar en los casos que se desea aumentar el crecimiento por medio del suministro de una fuente de nitrógeno reducido, el CH digerida enzimáticamente presenta un gran número de aminoácidos y otro gran número de compuestos que no han sido identificados (Roca & Mroginski, 1991).

La peptona es otro compuesto y se lo usa a concentraciones de 0,25-3,0 g/L; la triptona de 0,25-2,0 g/L; el extracto de malta de 0,5-1,0 g/L y la levadura se usa de 0,25-2,0 g/L por la alta cantidad de sus vitaminas (B) (Pierik, 1990).

La levadura y el extracto de malta de cebada también son buenas fuentes de nitrógeno reducido y de precursores de potenciales de las adenil-citokininas, e incluso de las mismas adenil-citokininas. En la práctica los diversos tejidos vegetales responden de manera diferente a los varios suplementos o mezclas de compuestos usados en los medios de cultivo (Roca & Mroginski, 1991).

Actualmente ya no se suele usar aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico, ya que una adecuada proporción entre los iones de NO^{3-} y NH_4^+ puede garantizar las necesidades de nitrógeno. Antes se añadían aminoácidos o mezclas de ellos, ya que la relación entre los anteriores iones no era la adecuada. La L-glutamina es el aminoácido más usado como fuente de nitrógeno; también se utiliza la adenina y la aspargina (Pierik, 1990).

Muchos tejidos responden diferentemente a los suplementos de aminoácidos (Roca & Mroginski, 1991). Las mezclas de aminoácidos parecen presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible establecer una regla general (Alemán, 2000a).

El carbón activado se produce por carbonización de la madera, a altas temperaturas, en presencia de vapor, posee una red muy fina de poros, con una gran superficie interna, en la cual pueden ser absorbidas todo tipo de sustancias, este se usa a concentraciones de 0,2-3,0% p/v. El carbón activa adsorbe pigmentos tóxicos, como los productos de la oxidación fenólica, también puede adsorber otros compuestos como reguladores de crecimiento, vitaminas, quelatos de Zn y Fe; crea condiciones para el crecimiento de raíces al oscurecer el medio, también puede promover la embriogénesis somática; estimular el crecimiento y organogénesis de las especies leñosas y estabiliza el pH del medio (Pierik, 1990).

1.4.5 Preparación del medio de cultivo

Existen varias formulaciones de medios de cultivo, y para escoger el tipo de medio puede depender de la especie, tipo de explante u órgano empleado, la edad del órgano, la sensibilidad a concentraciones altas de sales, las necesidades de reguladores, etc. Una vez escogida la formulación adecuada del medio de cultivo, se procede a su preparación (Pierik, 1990).

Se podrían pesar todas las cantidades de los componentes del medio pero sería una operación muy larga y tediosa, además de imprecisa ya que algunas cantidades son muy pequeñas. Por lo tanto se preparan soluciones madres o soluciones concentradas. Generalmente se trabaja con soluciones stocks de macronutrientes, micronutrientes, de hierro con un agente quelante, de vitaminas y reguladores. Las soluciones stocks y los medios de cultivo deben prepararse con agua bidestilada o desmineralizada-destilada (Gray & Trigiano 2000).

Para la preparación de medios de cultivo se debe usar reactivos analíticos, pesarlos utilizando espátulas limpias y emplear una balanza analítica suficientemente sensible. El agar y el azúcar se deben pesar al momento de prepara el medio, los macro y mico elementos deben tomarse a partir de soluciones madres, al igual que las vitaminas y reguladores (Pierik, 1990). En general los componentes (macro y microelementos) de los medios de cultivo se los debe agrupar en stocks según el tipo de iones, por ejemplo: Stock nitratos, stock sulfatos, stock halógenos, stock P B Mo (fósforo, boro y molibdeno) y stock NaFeEDTA (tabla 1), pueden ser soluciones 10 o 100 veces la concentración especificada en el medio de cultivo (Gray & Trigiano 2000).

Para preparar un litro de medio de cultivo, primero se coloca medio litro de agua desionizada-destilada dentro del matraz, este volumen de agua debe estar en agitación cuando se van añadiendo los componentes, se adicionan los volúmenes correspondientes de las soluciones stocks, por ejemplo según la tabla 1.1 el volumen a usar de cada una de las soluciones stocks para preparar un litro de medio MS es de 10 ml. Se prosigue con la adición de la cantidad apropiada de la stock de vitaminas, el mioinositol se recomienda pesarlo (100mg/L) y el azúcar (20-30 mg/L) (Gray & Trigiano 2000; Sabit, 2006).

Todos los componentes deben quedar bien disueltos, se añade más agua destilada, hasta un volumen inferior al de litro, ya que primero se debe ajustar el pH alrededor de 5,7-5,8 usando HCl o NaOH (1N o 0,1N), una vez ajustado el pH se afora a un litro, se añade el agar, el cual mediante calentamiento y agitación debe disolverse totalmente, el medio deberá quedar

como una solución translúcida para luego ser vertido en los recipientes (Gray & Trigiano 2000; Sabit, 2006).

Tabla 1.1 Macro y micronutrientes, soluciones Stock 100x del medio (MS) Murashige y Skoog (1962).

Stock (100x)	Componentes	Cantidad
Nitratos	NH ₄ NO ₃	165 g
	KNO ₃	190 g
Sulfatos	MgSO ₄ 7H ₂ O	37 g
	MnSO ₄ H ₂ O	1,7 g
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,86 g
	CuSO ₄ 5H ₂ O	2,50 mg
Halógenos	CaCl ₂ 2H ₂ O	44 g
	KI	83 mg
	CoCl ₂ 6H ₂ O	2,50 mg
PBMo	KH ₂ PO ₄	17 g
	H ₃ BO ₃	620 g
	Na ₂ MoO ₄	25 mg
NaFeEDTA	FeSO ₄ 7H ₂ O	2,78 g
	Na ₂ EDTA	3,73 g

El número de gramos o miligramos indicados en la columna de cantidad, deberán ser agregados a 1000 ml de agua destilada desionizada para hacer 1L de una solución Stock. Y por cada litro de medio de cultivo, se debe añadir 10 ml de cada una de las soluciones stocks.

En el caso de tratarse de un medio líquido, no se coloca agar y se procede a dosificar directamente en los contenedores escogidos. Tanto si es un medio sólido como líquido se debe autoclavar los contenedores con el medio, generalmente a 121 °C durante 15-20 minutos (Aleman, 2000a).

El pH es un factor muy importante al momento de la preparación de los medios de cultivo, el pH en el rango de 5-6,5 es apto para el crecimiento, pero un pH bajo (menor a 4,5) o muy alto (mayor que 7) puede frenar el crecimiento. (Pierik, 1990).

Se pueden presentar algunos inconvenientes cuando el pH es demasiado bajo: el agar pierde su rigidez, algunas sales de fosfato y hierro

pueden precipitar, la vitamina B₁ y el ácido pantoténico se hacen menos estables, se retarda la absorción de iones amonio, la auxina y el ácido giberélico se hacen menos estables, también se debe tomar en cuenta que después de la esterilización en el autoclave el pH sufre un descenso de 0,3-0,5 unidades (Pierik, 1990).

Las soluciones madres que se almacenan a bajas temperaturas pueden presentar precipitados, y al momento de disolver nuevamente con calor, se puede perder agua, esto puede hacer variar la concentración de la solución madre. Las sustancias termolábiles deben ser añadidas y esterilizadas mediante filtración, después de que el medio esté autoclavado y enfriado a una temperatura de 45-50°C (Pierik, 1990; Sabit, 2006).

Si los medios de cultivo son almacenados por largos períodos, se recomienda conservarlos a temperaturas de 5°C y en oscuridad, además es importante almacenarlos en bolsas plásticas estériles para prevenir la pérdida de humedad, ya que la pérdida del agua del medio provoca una concentración de las sales y esto puede ser tóxico para los tejidos vegetales, y en caso de usar AIA, se debe tener en cuenta que este pierde su actividad por fotoxidación (Pierik, 1990).

1.4.6 Factores que influyen en el cultivo *in vitro*

Existen diferentes factores que determinan el éxito en el cultivo *in vitro* y los sistemas de propagación, entre estos los principales son: el material vegetal, su manipulación y los factores físicos.

1.4.6.1 Material vegetal

El estado fisiológico de la planta donadora o planta madre influye significativamente en la capacidad morfogénica y en la morfogénesis; los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los explantes provienen de plantas madres en diferentes edades fisiológicas; se conoce que

mientras más joven y menos diferenciado es el tejido que se va a sembrar tendrá mejor respuesta *in vitro* (Roca & Mroginski, 1991).

Se puede usar dos tipos de material vegetal, el que es cultivado bajo condiciones controladas: en invernaderos o cámaras de ambiente controlado o plantas cultivadas en el campo, teniendo en cuenta que hay más probabilidades de contaminación del material de campo, con excepciones de algunos tejidos aislados del interior del vegetal (Pierik, 1990).

Es recomendable usar plantas vigorosas para los experimentos, ya que las plantas débiles son susceptibles a virus o enfermedades. Es importante usar material vegetal sano libre de bacterias, hongos, ácaros, virus, etc. Además se debe hacer una selección del genotipo adecuado, basándose en la tasa de crecimiento, precocidad, producción de flores, color, forma de la flor, conservación de sus características, etc. (Pierik, 1990).

Cada especie o variedad se comportará de manera diferente y además de la edad de la planta, también influye las condiciones de campo, el clima, la época de colecta, la posición del explante en la planta donadora y otros aspectos que no pueden ser controlados en su totalidad (Chagas & Soares, 2003).

El explante es una parte de un tejido o de un órgano que es aislado de la planta con fines de cultivo. Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo (Roca & Mroginski, 1991).

El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y la regeneración de la planta, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que con el aumento del tamaño del explante es mayor el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración de plantas (Aleman, 2000a).

La selección del explante puede hacerse teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta y de los objetivos de la propagación (Roca & Mroginski, 1991; Alemán, 2000a), es posible utilizar una gran variedad de explantes para iniciar los cultivos *in vitro*, sin embargo para los fines de propagación comercial se emplean generalmente meristemos o ápices caulinares, estos últimos debido a que la regeneración de la planta es más fácil, o si el objetivo es la obtención de plantas libres de virus o enfermedades sistémicas es necesaria la utilización solo de meristemas (Alemán, 2000a).

1.4.6.1.1 Esterilización del material vegetal

Existen ciertas sustancias químicas que influyen negativamente sobre las bacterias, pudiendo ejercer dos tipos de efectos diferentes, los bacteriostáticos actúan impidiendo el crecimiento bacteriano; en cambio los bactericidas actúan destruyendo o matando las bacterias (Alemán, 2000b).

Los agentes desinfectantes o germicidas son agentes sobre todo químicos antimicrobianos, capaces de matar los microorganismos patógenos de un material. Pueden presentar efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que se suelen emplear sólo sobre materiales inertes. Los agentes antisépticos son sustancias químicas antimicrobianas que se oponen a la sepsis o putrefacción de materiales vivos. Se trata de desinfectantes con baja actividad tóxica hacia los tejidos vivos donde se aplican (Alemán, 2000b).

Existen diversas sustancias para realizar la esterilización química, como son: el alcohol, el hipoclorito de sodio, el hipoclorito de calcio, el cloruro de mercurio, etc.

El alcohol, para material vegetal se usa al 70%, ya que el de 96% deshidrata demasiado los tejidos. Al esterilizar instrumentos, material o mesas se debe emplear el alcohol al 90% o 96%, ya que el de 70% deja una lámina de agua después de la evaporación. Al sumergir los explantes en el alcohol durante algunos segundos no es suficiente para matar los microorganismos, la principal función es el eliminar el aire y disolver la capa epicuticular, eliminando

la tensión superficial, esto permite que el cloro actúe de mejor manera. Los frutos pueden ser esterilizados con alcohol al 96% y después flamearlos (Pierik, 1990).

El Cloruro de mercurio (HgCl_2) en solución al 0,1% fue muy usado como desinfectante potente, pero es muy tóxico para los animales y el hombre, y apenas se emplea en la actualidad (Alemán, 2000b).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en solución al 3%, se usó en otro tiempo como desinfectante, pero está actualmente en desuso, debido a que algunas bacterias son resistentes, ya que poseen enzimas del tipo de las catalasas y peroxidasas (Alemán, 2000b).

El cloro se presenta bajo las formas de Cl_2 (gaseoso), hipocloritos y cloraminas. El efecto desinfectante se debe a la liberación de cloro libre (Cl_2); a su vez, el Cl_2 reacciona con el agua para dar ácido hipocloroso, que a pH ácido o neutro es un oxidante fuerte. Las concentraciones y tiempos de inmersión varían según el tejido vegetal, este se encuentra comercialmente a concentraciones de 5% (Alemán, 2000b; Pierik, 1990).

El hipoclorito de calcio se usa durante 5-30 min en concentraciones de de 35-100 g/L este penetra con más lentitud en los tejidos vegetales que el hipoclorito sódico y solo puede ser almacenado por un tiempo limitado ya que es delicuescente (Pierik, 1990).

Antes de iniciar la esterilización del material vegetal se debe retirar cualquier porción del suelo o porciones muertas que pueden estar en las plantas o explantes con los que se va a trabajar (Pierik, 1990).

El proceso puede iniciarse con un lavado con agua, si es necesario eliminar capas externas de tejido, hacer lavados con detergente, luego se sumerge el explante el alcohol al 70% por algunos segundos o minutos que permite eliminar las burbujas de aire, actuando como tenso activo, luego se realiza una esterilización durante 10-30 minutos con NaClO al 1%, añadiendo

algunas gotas de tween 20 u 80 que disminuyen la tensión superficial; tanto la concentración de cloro como el tiempo de inmersión puede variar según la especie o tipo de explante empleado; finalmente se hacen tres lavados con agua estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Todo el material con el que se trabaje dentro de la cámara debe ser estéril (Echenique et al., 2004; Pierik, 1990).

1.4.6.1.2 Aislamiento e Inoculación

Después del proceso de esterilización y el lavado dentro de la cámara de flujo laminar, se inicia manipulación del explante empleando pinzas y bisturí, todas las partes afectadas por la lejía deben ser retiradas, en caso de ser yemas se eliminan los primordios foliares y si es necesario se usan microscopios binoculares para el aislamiento de meristemas, es importante tener en cuenta el volumen del explante que es retirado o cortado, ya que puede influir en la cantidad de reservas alimenticias, debido a que a menor tamaño del explante menor posibilidades de regeneración del tejido (Pierik, 1990).

Cuando se inocula el explante en el tubo de ensayo o frascos de vidrio, estos deben mantenerse en posición horizontal para reducir el número de infecciones. El flameado del cuello de los recipientes no es muy recomendable cuando se trabaja en cámaras de flujo laminar ya que puede ingresar etileno al recipiente (Pierik, 1990).

El método de inoculación de los explantes en medios sólidos depende del tipo de material con el que se trabaje, los meristemas o yemas se inoculan sobre el medio, con una pequeña porción de este introducido en el medio, hay que tener cuidado de no ingresarlos demasiado ya que se produciría una deficiencia de oxígeno (Pierik, 1990).

Los explantes mantienen su polaridad después de la siembra, desde el punto de vista fisiológico, por esta razón es muy importante saber cómo se ha llevado la inoculación: polar o apolar (Pierik, 1990).

1.4.6.1.3 Repicado

El repicado o el cambio del explante a un medio nuevo, se realiza por diversas razones: El medio nutritivo está agotado; el tejido a crecido y necesita más espacio o ser dividido; cuando hay exudados de color marrón o negro en el medio de cultivo (oxidación fenólica); el medio nutritivo se ha secado; se necesita cambiar la relación o concentración de reguladores de crecimiento, etc. (Pierik, 1990).

1.4.6.2 Factores Físicos

Las condiciones de incubación pueden variar de un cultivo a otro, cada planta, explante y período de cultivo posee requerimientos específicos, como son: la cantidad e intensidad de luz, fotoperiodos, termoperíodos y otros factores que son de suma importancia en el cultivo *in vitro* (Chagas & Soares, 2003).

1.4.6.2.1 Temperatura

La temperatura puede afectar los procesos fisiológicos de los explantes cultivados *in vitro*, y por lo general cada especie tiene un intervalo de temperaturas para su crecimiento óptimo, este intervalo puede variar en función del genotipo, del órgano del que se ha obtenido el explante, de la época del año, de la edad de la planta madre, del fotoperiodo, etc. (Sabit, 2006).

Determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo *in vitro* puede ser un proceso muy laborioso, pero afortunadamente se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 y 28^oC (Sabit, 2006). Generalmente en las cámaras de cultivo se mantiene temperaturas constantes de 24 a 26^oC, pero dependiendo de la especie experimental se puede elegir una temperatura más baja 18^oC o más alta 28-29^oC para especies tropicales (Pierik, 1990).

La temperatura óptima para el crecimiento *in vitro* es generalmente 3 a 4°C más alta que la temperatura para el crecimiento *in vivo*. Teniendo en cuenta que la temperatura de los tubos de ensayo es 3-4°C más alta que en la cámara de crecimiento debido al efecto de la irradiación, la temperatura de esta última puede ser mantenida en el óptimo para el crecimiento (Pierik, 1990).

El control de la temperatura no es solamente importante porque pueda afectar al crecimiento del cultivo sino también porque puede ser un factor que induzca determinados procesos fisiológicos (Sabit, 2006), por ejemplo se puede elegir una temperatura algo más baja para algunos procesos especiales, como la formación de yemas florales, ruptura de la dormición, germinación de semillas, etc. (Pierik, 1990); temperaturas bajas de 4-5°C permiten superar los periodos de dormición de algunas leñosas y la conservación prolongada de determinados cultivos *in vitro*; mientras que una temperatura constante de 20°C induce la formación de raíces en la mayoría de coníferas (Sabit, 2006).

En otras ocasiones es necesario emplear temperaturas alternantes, por ejemplo la formación de raíces en *Helianthus tuberosus* es estimulada por una temperatura diurna de 26°C y una temperatura nocturna de 15°C (Pierik, 1990).

1.4.6.2.2 Luz

La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos *in vitro*. Sólo una parte de la energía radiante tiene influencia conocida sobre el desarrollo de las plantas (Sabit, 2006). Los aspectos relacionados con la luz que son importantes en los cultivos *in vitro* son el fotoperiodo o duración del día, la irradiación y la composición espectral (Pierik, 1990).

Generalmente se eligen de 14 a 16 horas de luz, aunque otros cultivos usan luz continua y en casos muy especiales se realiza el cultivo en completa oscuridad. Las irradiaciones altas que se producen en el campo (30-70 Wm²)

son dañinas para los cultivos *in vitro* debido a las altas temperaturas que se generan en los recipientes o tubos de ensayo. El crecimiento generalmente tiene lugar a irradiaciones de 8-15 Wm² o a una irradiación más baja (Pierik, 1990).

Se asume que las necesidades de luz de los cultivos *in vitro* son inferiores a las de la planta *in vivo*, dado que el medio de cultivo contiene cantidades importantes de sacarosa, los cultivos *in vitro* se comportan sólo parcialmente de forma autotrófica. Además de un aumento notable de la temperatura dentro del recipiente de cultivo (Sabit, 2006).

Con respecto al espectro o calidad de la luz, se conoce que la clorofila y los demás pigmentos fotosintéticos de las plantas captan la energía contenida en diferentes radiaciones para incorporarla a las diversas reacciones químicas que constituyen el proceso. La luz también puede intervenir en otros procesos fisiológicos, como la germinación, la floración, el fototropismo, entre otros (Sabit, 2006).

Todos estos fenómenos no son producidos en igual medida por todos los tipos de luz (radiaciones de cualquier longitud de onda) sino que algunas radiaciones concretas tienen un efecto considerable mientras que otras tienen un efecto mínimo o ningún. Es preciso conocer el espectro de la radiación que es activo en el proceso fisiológico estudiado y la cámara de cultivo deberá reproducir lo mejor posible ese espectro de luz activo. Es conveniente conocer cuál es el espectro que emiten nuestras fuentes de luz y en qué medida se adapta éste a las necesidades del cultivo (Sabit, 2006).

1.4.6.2.3 Humedad

La humedad dentro de los tubos de ensayo o recipientes es relativamente alta, y puede presentarse problemas si la cámara de crecimiento presenta humedades relativas menores al 50%, debido a una pérdida de agua desde los tubos de ensayo, concentrando las sales del medio, lo cual es tóxico

para los explantes. Sin embargo una elevada humedad en la cámara puede influir en una mayor cantidad de infecciones o contaminación (Pierik, 1990).

1.4.6.2.4 Disponibilidad de agua

La disponibilidad de agua influye sobre la vitrificación. La vitrificación o hiperhidratación es un desorden fisiológico que presentan los tejidos cultivados *in vitro* (Afanador, 2005), porque disponen de una gran cantidad de agua (exceso de humedad) (Pierik, 1990), se presenta especialmente en las hojas, incidiendo sobre dos de los procesos más importantes que realizan estas estructuras: la fotosíntesis y el intercambio gaseoso (Afanador, 2005).

La humedad relativa y el potencial hídrico son el factor clave para explicar estas complejas anomalías producidas *in vitro*. Además existen otros factores que están ligados a este desorden, tales como: concentración de sales, el agente gelificante, concentraciones altas de reguladores de crecimiento (citokininas, auxinas, etileno, entre otras); y una baja intensidad lumínica durante la incubación (Afanador, 2005).

1.4.6.2.5 Oxígeno

Una buena aireación es un factor importante para el crecimiento de células, tejidos, etc. El suministro de oxígeno puede ser facilitado al utilizar medios líquidos, inocular sobre puentes de papel, emplear agitadores, realizar inoculación apolar, etc. (Pierik, 1990).

La formación de órganos, especialmente la formación de raíces adventicias; es facilitada por un mayor disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo. Se ha comprobado que los esquejes de especies leñosas encuentran grandes dificultades en regenerar sus raíces cuando sus bases se encuentran en agar. La formación de raíces *in vivo* es mucho mejor en un medio líquido o en sustrato airado (Pierik, 1990).

1.4.6.2.6 Dióxido de Carbono

La adición de CO₂ *in vitro* tiene escaso valor ya que la concentración de este gas en un tubo bien sellado es casi siempre muy alta. Es mucho mejor emplear la sacarosa como fuente de carbono que utilizar al CO₂, ya que la fotosíntesis *in vitro* es generalmente inferior a la normal debido a la baja irradiación, siendo en consecuencia de poco interés el suministro de CO₂. (Alemán, 2000b; Pierik, 1990).

1.4.7 Cultivo *in vitro* en Leñosas

Existen especie leñosas de interés agrícola en especial las especies frutícolas como la pera, la manzana, el mango, los cítricos y especies leñosas forestales como el eucalipto, coníferas, la teca, etc., otras como el café, el cacao, productoras de almendras y en general todo este grupo de plantas son de suma importancia desde el punto de vista económico y social a nivel mundial (Batista, 1999).

Tradicionalmente, las especies forestales fueron propagadas vegetativamente mediante el enraizamiento de estacas, de braquiblastos en coníferas, así como también por injertos. Sin embargo, para la mayoría de los árboles propagados por estacas se observa una rápida pérdida de capacidad de rizogénesis al aumentar la edad de la planta donante de las estacas. Al usar la micropropagación una de sus principales ventajas es la capacidad potencial de desarrollar protocolos de multiplicación optimizados para multiplicar árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores (Echenique et al., 2004).

En los últimos años a nacido el interés por especies leñosas amenazadas o en vía de extinción, un claro ejemplo a nivel de Latinoamérica son las especies del género *Polylepis* como es el caso de *Polylepis tomentella Weddell ssp.* cuya propagación fue mediante técnicas de cultivo *in vitro*, los estudios de micropropagación en esta especie tuvieron como prioridad

recuperar las poblaciones de *P. tomentella* las cuales eran afectadas constantemente por diversos factores antropogénicos (Vega *et al.*, 2007).

1.4.7.1 Micropropagación

La micropropagación *in vitro* de plantas, es una de las herramientas que permite propagar árboles seleccionados por sus características fenotípicas o con fines de conservación, de especies en peligro de extinción a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Esta técnica permite incrementar la tasa de multiplicación que por la vía sexual difícilmente se pueden alcanzar (Echenique *et al.*, 2004).

Otras de las ventajas de la micropropagación, es que puede mantener un alto margen de sanidad y estabilidad genética del material propagado por esta vía, sin importar las condiciones ambientales y en espacios más reducidos, manteniendo un flujo constante de material vegetativo durante todo el año, de esta forma no se entorpecen los programas de reforestación con fines comerciales o de protección (Echenique *et al.*, 2004; Roca & Mroginski, 1991).

La propagación de plantas *in vitro* es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados (Echenique *et al.*, 2004).

Las células somáticas de cualquier tejido al tener la propiedad de la totipotencia pueden formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciban. Esta regeneración ocurre en fases consecutivas: la fase de desdiferenciación, donde las células se vuelven competentes para responder ante cualquier estímulo organogénico o embriogénico; la fase de inducción, donde las células se determinan para formar un órgano o embrión, y la fase de realización, donde se forma el órgano o embrión propiamente dicho. Estas fases están directamente afectadas por el balance hormonal del medio de cultivo, por lo cual la optimización de los

protocolos de regeneración debe realizarse teniendo en cuenta los requerimientos intrínsecos de cada genotipo en cada fase del cultivo. (Echenique et al., 2004)

1.4.7.2 Etapas de la micropropagación

La micropropagación consta de cinco etapas fundamentales, la fase 0 es la etapa donde se hace la selección de las plantas madres o donadoras, además de la preparación de los explantes para el establecimiento, la fase I o de establecimiento, que es donde se realiza la desinfección de los explantes y la inoculación de los mismos en el medio de cultivo para regenerar plantas. La fase III o de multiplicación es en la que realmente se realiza la propagación masiva de brotes a partir de las plántulas regeneradas, luego sigue la fase IV de enraizamiento y crecimiento de los brotes hasta obtener plantas que son posteriormente trasplantadas a un sustrato en la última fase de adaptación (aclimatación) o fase V (Alemán, 2000b; Echenique et al., 2004).

Las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro* (Echenique et al., 2004).

Cada una de estas fases o etapas tienen sus propias características y su complejidad varía en dependencia de la especie. En algunas el establecimiento es muy problemático debido a lo difícil de lograr una desinfección efectiva de los explantes o la alta oxidación fenólica. En otras es la etapa de multiplicación, donde pueden presentarse coeficientes de multiplicación bajos o la fase de enraizamiento como es en el caso de trabajar con plantas adultas o especies leñosas (Echenique et al., 2004; Pierik, 1990).

1.4.7.2.1 Etapa 0: Preparación y selección de plantas donadora

En esta etapa se selecciona el material vegetal que se utilizará como fuente de explantes y que debe provenir de plantas sanas y vigorosas, garantizando la propagación de un material con la mayor calidad desde el punto de vista genético y fitosanitario según los fines que se persigan (Alemán,

2000b). El estado fisiológico del explante es de gran influencia en el éxito del cultivo "*in vitro*", los explantes tomados de las zonas de crecimiento activas tienen mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo (Echenique et al., 2004).

Pueden aplicarse pretratamientos con reguladores de crecimiento a las plantas donantes, así como también a los explantes. En especies leñosas suele utilizarse como pretratamiento la inmersión de los explantes primarios en soluciones con citokininas a fin de inducir la brotación de yemas. (Echenique et al., 2004).

1.4.7.2.2 Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la edad de la planta madre, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y tamaño del explante (Echenique et al., 2004). Otros factores como las condiciones de cultivo, componentes del medio, luz, y temperatura también pueden influir en esta etapa (Hartmann & Kester 1997).

En esta fase los principales procesos a controlar son el aislamiento, inoculación y esterilización de los explantes (Echenique et al., 2004). En otros casos debe también controlarse la oxidación fenólica de los explantes ya que estos exudados pueden inhibir el desarrollo y el crecimiento, esto se puede contrarrestar con antioxidantes, o modificaciones en la composición del medio, etc. (Hartmann & Kester 1997).

Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas (Echenique et al., 2004).

El meristemo apical es una zona de tejido localizado en la parte más extrema del ápice del tallo, con un tamaño aproximado de 0.1 a 0.3 mm. Mientras que el ápice caulinar incluye el meristemo apical y varios primordios de hojas. La utilización de uno u otro tipo de explante depende de

los objetivos de la propagación y la especie. Si el objetivo es la obtención de plantas libres de virus es necesaria la utilización de meristemos apicales; pero si por el contrario estamos trabajando con una especie donde no es necesario el saneamiento de virus, entonces empleamos ápices caulinares debido a que la manipulación y la regeneración de plantas es más fácil (Alemán, 2000b).

Los desinfectantes más comunes utilizados en esta etapa son el hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno, alcohol y bicloruro de mercurio. El uso de antibióticos en el medio de cultivo durante esta fase es frecuente, así como la aplicación de lavados o fumigaciones con antibióticos y fungicidas a las plantas adultas previo a la toma del explante con el objetivo de disminuir los contaminantes (Alemán, 2000b).

Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio. En esta etapa también pueden observarse infecciones por bacterias y hongos que sobreviven a los tratamientos de esterilización y patógenos endógenos latentes dentro del sistema vascular, resultado de una esterilización inefectiva de los explantes. Estos patógenos latentes podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo (Echenique et al., 2004).

Tanto la luz como la temperatura no son factores críticos en esta etapa, por lo general se usa una intensidad luminosa de alrededor de 1000 lux, ya sea con luz continua o un fotoperiodo y la temperatura puede mantenerse de 20-25°C. Esta etapa dura aproximadamente de 4 a 6 semanas (según la especie o explante empleado) (Hartmann & Kester 1997).

Durante esta etapa, el explante pasa por un período inicial, donde se estabiliza después el estrés producido por el aislamiento de la planta donadora y por los tratamientos de desinfección. De esta manera se espera que ocurra un crecimiento resultado de la división y elongación celular (Afanador, 2005).

1.4.7.2.3 Etapa 2: Multiplicación

En esta etapa el objetivo es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (Echenique et al., 2004).

La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas al medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. El uso de citoquininas es generalizado en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantes (Alemán, 2000b).

Este balance entre hormonas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar altas tasas de proliferación con lo que aumenta la efectividad del método.

Además del balance hormonal hay que tener muy en cuenta el genotipo de las plantas a propagar, ya que es diferente el índice de propagación para cada una de las especies y las diferentes variedades o clones dentro de la especie; esto está muy relacionado con el balance hormonal, ya que al ser diferente la respuesta de los genotipos y variar sus requerimientos hormonales, es necesario establecer las concentraciones de los reguladores del crecimiento para lograr tasas altas de multiplicación (Alemán, 2000b).

La capacidad de respuesta de los explantes a un mismo medio de cultivo cambia con el número de subcultivos, el tipo de explanto subcultivado y el método del repique. Por esto, el medio de cultivo debe optimizarse a fin de lograr la mayor tasa de multiplicación vegetativa (Echenique et al., 2004).

El tamaño óptimo del propágulo y el medio de cortarlos y separarlos varía en las diferentes especies. Generalmente existe una masa crítica de tejido que debe alcanzar el explante, en el cual se puede hacer cortes de un tamaño que se obtengan una producción rápida y uniforme en la transferencia

siguiente. El número de propágulos que se obtienen en cada transferencia varía de 5 a 25 o más por explante. Las etapas de multiplicación pueden repetirse varias veces para aumentar la provisión de material hasta cierto número, para su enraizamiento y trasplante posterior (Hartmann & Kester, 1997).

Es necesario refrescar cada cierto tiempo la fuente inicial de multiplicación, debido a que la edad del material *in vitro* es una de la principales causas de variación (Alemán, 2000b).

Es recomendable lograr que la tasa de intercambio gaseoso entre los ambientes del recipiente y externo sea óptima, evitándose la acumulación de CO₂ y de etileno. En este sentido, el sellado del recipiente es importante, el intercambio gaseoso es más limitado con el empleo de una tapa de plástico que con un film de polietileno extensible. La utilización de una tapa perforada con tapón de gomaespuma es altamente recomendable (Echenique et al., 2004).

Otro de los principales problemas que pueden presentarse durante los sucesivos subcultivos *in vitro* son la *vitrificación* y la producción de *compuestos fenólicos* por los explantos. Por esto, durante el establecimiento y multiplicación *in vitro* es necesario emplear estrategias para disminuir el estrés de las plantas y limitar al mínimo la producción y oxidación de los compuestos fenólicos (Echenique et al., 2004).

1.4.7.2.4 Etapa 3: Enraizamiento y elongación

En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta formar plantas completas y desarrollan un sistema radical que les permite ser trasplantadas a un sustrato, pero no siempre esta fase es llevada a cabo en condiciones "*in vitro*", existiendo la posibilidad de hacerlo en recipientes con sustratos en condiciones de semilaboratorio, sumergiendo los brotes antes del trasplante en una solución enraizadora (Alemán, 2000b). En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en las especies

leñosas es complicado por su limitada capacidad rizogénica (Echenique et al., 2004).

La práctica de enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* reviste gran importancia debido a que tiene como objetivo producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que puedan sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo. La formación del sistema radical y el crecimiento de las raíces son fundamentales para lograr la transferencia de las vitroplantas a condiciones de invernadero (Quintero et al., 2003)

Como se mencionó anteriormente el enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (auxinas) para promover la rizogénesis. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua (Echenique et al., 2004).

No es necesaria la utilización de citokininas al medio de cultivo, pues las que existían anteriormente ejercen un efecto residual y la adición de las mismas provoca la inhibición de la formación de raíces, a veces este efecto residual es tan grande que se hace necesario transferir los brotes a dos subcultivos de enraizamiento (Alemán, 2000b).

El manejo de las sales minerales es empleado ampliamente para estimular el enraizamiento, lográndose la formación abundante de raíces al reducir las sales a la mitad, un cuarto o un tercio de las concentraciones de los medios, aunque tiene la desventaja de que el crecimiento de las plantas es menor, lo cual está dado por el agotamiento temprano de los nutrientes, siendo necesario realizar un nuevo subcultivo para contrarrestar. También se recomienda elevar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, lo cual da como resultado un crecimiento vigoroso de las raíces, aunque aún no se ha determinado si el efecto es totalmente osmótico o tiene otras causas (Alemán, 2000b).

Comúnmente, a fin de proceder a su enraizamiento, los vástagos de buen tamaño proveniente de la etapa de multiplicación y provisto de al menos 4-5 yemas, se colocan durante períodos cortos en soluciones con concentraciones elevadas de auxinas. La auxina más utilizada es el IBA (ácido 3-indolbutírico), que puede utilizarse a concentraciones de 1-10 mM durante pocas horas. Alternativamente se pueden emplear niveles más bajos de auxinas (0.1 a 1mM), pero manteniendo la inducción por un período más prolongado (3 a 7 días). Luego los vástagos se transfieren a un medio de cultivo basal desprovisto de reguladores de crecimiento para permitir el desarrollo de las raíces (Echenique et al., 2004).

Aproximadamente 20 días después del tratamiento de inducción es posible la obtención de una adecuada cantidad de raíces funcionales que permitan continuar hacia la etapa de aclimatación. Es importante acentuar que el uso de auxinas a elevadas concentraciones es contraproducente porque induce la formación de callo en la base de las estacas. Por ello, para cada cultivo es necesario optimizar un protocolo de rizogénesis que minimice la formación de callo y maximice la tasa de rizogénesis y supervivencia de las plantas (Echenique et al., 2004).

Se puede realizar una fase de alargamiento previo al enraizamiento, se colocan los propágulos en un medio de agar durante 2 a 4 semanas, sin citocininas o con concentraciones muy bajas de la misma, en algunos casos se puede añadir ácido giberélico. Una vez finalizado este tiempo se prosigue con el enraizamiento (Hartmann & Kester, 1997).

1.4.7.2.5 Etapa 4: Aclimatación

Las plantas enraizadas se sacan a recipientes de cultivo, se lava por completo el agar que llevan adherido, debido a que es una fuente potencial de contaminación (Hartmann & Kester, 1997). Los sustratos empleados en esta etapa están compuestos por mezclas de arena, suelo, materia orgánica, vermiculita o zeolita, con una estructura física que permita un fácil crecimiento

de la joven plántula. Las plantas permanecerán durante cierto tiempo hasta alcanzar un tamaño que le permita ser plantadas en el campo (Alemán, 2000b).

Durante las primeras semanas de ser plantadas las vitroplantas en el sustrato se deben mantener una humedad alta y se debe regular la intensidad luminosa para facilitar la adaptación de las mismas y evitar la muerte por desecación o quemaduras solares. Los explantos deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz (Alemán, 2000b).

1.4.7.3 Control de la Oxidación fenólica en especies leñosas

Alunas plantas, en especial leñosas, producen exudados de color marrón o negro, la presencia de estos compuestos se encuentra asociada con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés, tales como aquel provocado por el daño mecánico producido durante el aislamiento del explanto de la planta madre, estos exudados son compuestos del tipo polifenol oxidados y taninos, que generalmente hacen imposible el crecimiento y desarrollo en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Echenique et al., 2004; Pierik, 1990).

Existen algunas formas de controlar o prevenir, como: adicionar carbón activado al medio; adicionar PVP (250-1000 mg/L), el cual es un polímero que adsorbe las sustancias de tipo fenólicas; también se suele emplear soluciones antioxidantes de ácido cítrico, ácido ascórbico, tiourea o L-cisteína, estos compuestos pueden impedir la oxidación fenólica; se pueden adicionar aminoácidos como la glutamina, arginina y la aspargina; también se puede hacer un repicado frecuente a un medio reciente o usar medios líquidos que permiten diluir rápidamente los productos tóxicos; una reducción del tejido herido puede disminuir la exudación (Pierik, 1990).

Los reguladores de crecimiento también juegan un papel importante en el oscurecimiento del medio al oxidar los fenoles, por lo que se recomienda eliminar los reguladores para reducir la oxidación; otras alternativas es

disminuir la concentración de sales del medio de cultivo; mojar los explantes en agua antes de inocularlos en el medio o bien mantener el cultivo en condiciones de oscuridad por un período de tiempo (Echenique et al., 2004; Pierik, 1990).

1.5 Hipótesis

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Polylepis microphylla* los tratamientos evaluados en las fases de desinfección, control de oxidación, multiplicación y enraizamiento no tendrán diferencias significativas.

CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Fase de campo

2.1.1 Localización geográfica

La Fase de campo se desarrolló en el bosque de *Polylepis microphylla* localizado al este de la Provincia del Chimborazo, cantón Alausí, parroquia Achupallas, Vía Achupallas–Lagunas de Osogoche Km 15, siendo las coordenadas de la zona de estudio 75° 56` 98 E, 97° 49` 56,1 N, a una altura de 3650 msnm, con una temperatura promedio de 15°C.

2.1.2 Plantas donadoras

Unos de los explantes más usados para la micropropagación son las yemas apicales o axilares las cuales poseen tejido meristemático, ya que mientras más joven y menos diferenciado sea el tejido mejor será la respuesta *in vitro* (Roca & Mroginski, 1991).



Figura 2.1 Planta donadora de explantes del bosque de *Polylepis microphylla* localizado al este de la Provincia del Chimborazo, Coordenadas 75° 56` 98 E, 97° 49` 56,1N.

La metodología para esta fase de campo fue obtenida de un estudio realizado en Bolivia con *Polylepis tomentella*. En el campo (bosque de *P. microphylla*) se recolectó muestras de yemas mediante una selección *in situ* de plantas proveedoras o donadoras de ramas (figura 2.1), las cuales poseían las mejores características fenotípicas, como número renuevo de yemas apicales, follaje perenne, denso (Vega *et al.*, 2007), plantas vigorosas y visiblemente sanas, libres de bacterias, hongos, ácaros y virus.



Figura 2.2 Yemas apicales y laterales de un arbusto de *Polylepis microphylla*, empleadas como explantes.

La toma de muestras se realizó mediante colecta manual, se realizó cortes de ramas de 10-15 cm de longitud que presentaban yemas apicales y laterales (figura 2.2).

Una vez recolectadas las muestras, estas fueron colocadas en bolsas plásticas de polietileno, con 100 ml de agua destilada y estéril a fin de evitar la pérdida de humedad y reducir el proceso de deterioro fisiológico del material vegetal; las bolsas se empacaron en un cooler para evitar daños mecánicos durante el transporte al laboratorio y conservar una temperatura baja para impedir la proliferación de microorganismos contaminantes (Vega *et al.*, 2007).

2.1.3 Identificación de la especie

Para verificar la identidad taxonómica del material vegetal colectado, se contó con la ayuda de la especialista en el género *Polylepis* la PhD Katya Romoleroux, curadora del Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

2.3 Fase de Laboratorio

2.2.1 Localización del ensayo

El trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de Cultivo de Tejidos de Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército, localizados en Sangolquí, Av. el Progreso s/n. Con la dirección técnica de la M.Sc. Mónica Jadán y la Dra. Karina Proaño.

2.2.2 Período de Investigación

El tiempo que se empleó para el desarrollo de la investigación fue de 6 meses.

2.2.3 Fase de establecimiento

2.2.3.1 Manejo del material vegetal

Las yemas apicales y laterales en mejor estado fueron cortadas de las ramas con una longitud de 4-5 cm, retirando hojas y partes muertas de los explantes (figura 2.3).

Las yemas luego fueron colocadas en un vaso de precipitación con agua destilada para conservar el material en buen estado y poder iniciar con la fase de desinfección.



Figura 2.3 Yemas apicales y laterales que fueron cortadas para iniciar la fase de desinfección.

2.2.3.2 Medios de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó en la fase de establecimiento para *Polylepis microphylla* fue el medio de Chu et al., 1975 (N6) con las vitaminas de Kao y Michayluk (1975) en base a estudios realizados en *P. tomentella* y *P. racemosa* en Bolivia (Quezada & Rocabado, 2005; Vega et al., 2007), este medio se lo modificó, variando las concentración de Nitrógeno, Potasio, FeSO_4 y sacarosa (tabla 2.3) debido a que en los primeros ensayos hubo una alta oxidación y como medida preventiva para esto se empleó a la mitad de la concentración los compuestos enunciados anteriormente, disminuyendo así las sales del medio, el hierro y la sacarosa que están involucrados o son causantes de inducir procesos de oxidación fenólica en los explantes (Batista, 1999).

En la fase de establecimiento la concentración de agar fue de 8 g/L; 25mg/L de azúcar y de reguladores de crecimiento fueron: 1mg/L de BAP, 1mg/L de GA_3 y 0,5 mg/L de AIB.

Tabla 2.1 Componentes del medio de Chu et al., 1975 (N6) modificado, con las vitaminas de Kao y Michayluk (1975), usado en la fase de establecimiento.

Medio N6 (modificado)	
Componentes	Concentración mg/L
KNO ₃	1174,8
KH ₂ PO ₄	400
MgSO ₄ 7H ₂ O	185
(NH ₄) ₂ SO ₄	387,4
CaCL ₂ 2H ₂ O	166
KI	0,8
MnSO ₄ H ₂ O	2,98
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1,5
H ₃ BO ₃	1,6
Fe SO ₄ 7H ₂ O	13,93
Na ₂ EDTA	18,63
Sacarosa	25g/L
Vitaminas KM	
Tiamina HCl	1
Piridoxina HCl	1
Ácido nicotínico	1
Mioinositol	100
Biotina	0,01

Los reguladores de crecimiento y las vitaminas usadas en el medio de cultivo fueron esterilizados con filtros milipore de 0.22 μ m, dentro de la cámara de flujo laminar y añadidas cuando el medio tenía una temperatura de 50-60°C, este procedimiento (figura 2.4) se realizó debido a que las vitaminas son termolábiles y parte de la actividad de los reguladores se pierde al ser esterilizados en el autoclave.



Figura 2.4 Esterilización de los componentes termolábiles de los medios de cultivo.

El volumen de los componentes termolábiles es colocado en una jeringa estéril, luego se le adapta el filtro a la jeringa y se va filtrando sin ejercer mucha presión, este volumen filtrado se lo puede colocar en un vaso estéril o directamente al medio de cultivo a la temperatura anteriormente indicada, luego se agita varias veces, para homogenizar completamente las vitaminas y reguladores en todo el medio, después se vierte en los tubos de ensayos o frascos de vidrio estériles el volumen de medio de 8 ml o 30 ml respectivamente.

2.2.3.3 Desinfección del material vegetal

Para la desinfección del material vegetal (yemas), se inició con un lavado con 3 g de detergente comercial por cada treinta yemas en un volumen de agua destilada de 500 ml, el detergente debe ser disuelto con agitación antes de usarlo, las yemas se lavaron por 10 minutos con el detergente y con agitación en un hot plate, luego se realizaron 3 lavados con agua destilada para eliminar los restos de detergente.

Después de eliminar el detergente, las yemas se lavaron con alcohol al 70% por 1 minuto, los explantes deben quedar completamente cubiertos, finalizado este tiempo de inmersión se eliminó el alcohol. Luego se evaluaron

tres concentraciones de cloro comercial (5,25%) al 10%, 20% y 30% y tres tiempos de inmersión (10, 20 y 30 min), generando 9 tratamientos (tabla 2.2). Para cada tratamiento de desinfección se realizaron tres enjuagues consecutivos en agua destilada estéril, cada uno de cinco minutos, dentro de las cámaras de flujo laminar (Sánchez & Salaverría, 2004; Vega *et al.*, 2007).

Tabla 2.2 Tratamientos de desinfección de los explantes en la fase de establecimiento, empleando tres concentraciones de cloro comercial 5,25% y tres tiempos de inmersión.

Tratamiento	Concentración (NaClO)	Tiempo (min)
T 1	10%	10
T 2	10%	20
T 3	10%	30
T 4	20%	10
T 5	20%	20
T 6	20%	30
T 7	30%	10
T 8	30%	20
T 9	30%	30

Dentro de la cámara de flujo laminar, en una placa de vidrio y con la ayuda de una pinza y bisturí, se seccionaron los explantes axénicos eliminando algunos folíolos. Los explantes desinfectados fueron sembrados en tubos de ensayo (figura 2.5) que contenían 8 ml del medio de cultivo de Chu *et al.* 1975 (N6) modificado, mas las vitaminas de Kao & Michayluck (1975) y reguladores de crecimiento 1mg/L de BAP, 1mg/L de GA₃ y 0,5 mg/L de AIB como se indicó anteriormente (tabla 2.1).



Figura 2.5 Aislamiento e inoculación de los explantes de *Polylepis microphylla*.

Cada tratamiento de desinfección tuvo 10 repeticiones y las observaciones para evaluar la contaminación, sobrevivencia, nivel de oxidación y número de brotes se realizaron a los 30 días de iniciado el experimento, dando valores de 1 a los explantes contaminados y 0 a los no contaminados, con respecto a la sobrevivencias se dio valores de 1 a los explantes vivos y 0 a los explantes muertos.

Para el porcentaje de oxidación la evaluación se realizó según la escala de oxidación (tabla 2.3) y para la variable número de brotes la evaluación se realizó contando los brotes obtenidos por explante (yema).

Tabla 2.3 Escala de los niveles de oxidación, valores y equivalencia en porcentaje de oxidación en el medios de cultivo.

Oxidación del medio de cultivo		
	0	5%
	1	30%
	2	60%
	3	90%
	4	100%

2.2.3.4 Control de oxidación

2.2.3.4.1 Modificación del potencial Redox

En esta fase específicamente para los explantes de *Polylepis microphylla* se evaluaron soluciones antioxidantes filtradas, aplicándolas en forma de lavados antes de inocular los explantes en el medio (tabla 2.4). Se midió el porcentaje de oxidación de los medios (tabla 2.3) a los 30 días de iniciada la prueba.

Se evaluaron lavados de ácido cítrico 300mg/L, ácido ascórbico 300 mg/L, cisteína HCl 4g/L y en combinación ácido cítrico y ácido ascórbico 300 mg/L (Vega *et al.*, 2007).

Tabla 2.4 Tratamientos para el control de la oxidación mediante soluciones de lavado usadas en la fase de establecimiento.

Tratamientos	Soluciones antioxidantes
T1-S	Ácido cítrico 300mg/L
T2-S	Ácido ascórbico 300 mg/L
T3-S	Cisteína HCl 4g/L
T4-S	Combinación ácido cítrico y ácido ascórbico 300 mg/L

2.2.3.4.2 Modificación del ambiente (medio de cultivo)

También se realizaron pruebas cambiando la composición del medio de cultivo como se indico anteriormente evaluándose el efecto de la disminución de N, K, Fe y sacarosa versus medios normales de N6 para la fase de establecimiento (tabla 2.5). Se midió el porcentaje de oxidación de los medios según la tabla 2.3 y la sobrevivencia a los 30 días de iniciada la prueba.

Tabla 2.5 Tratamientos para el control de la oxidación mediante modificación del medio de Chu et al., 1975 (N6) usado en la fase de establecimiento.

Tratamientos	Medio
T1-N	Medio N6 (concentraciones normales)
T2-N	Medio N6 (modificado)

2.2.3.4.3 Control de oxidación mediante manipulación

Otra alternativa que se empleó para el control de la oxidación en la fase de establecimiento fue la manipulación del explante, que consistió en determinar el efecto de la eliminación de todos los primordios foliares de las yemas antes de la inoculación (tabla 2.6). Se midió el porcentaje de oxidación de los medios de cultivo (tabla 2.3) y la sobrevivencia a los 30 días de iniciada la prueba.

Tabla 2.6 Tratamientos para el control de la oxidación mediante la eliminación de primordios de las yemas de *P. microphylla*.

Tratamientos	Manipulación
T1-M	Con primordios
T2-M	Sin Primordios

2.2.3.5 Condiciones del cultivo

Para la fase de establecimiento de los explantes de *P. microphylla* la temperatura promedio del cuarto de incubación fue de 24°C, con una humedad relativa de 53%, inicialmente el material estuvo con un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 oscuridad controlado por un temporizador automático y con una intensidad de luz de 1200 lux.

2.2.4 Fase de multiplicación

En la fase de multiplicación se usaron los explantes que lograron establecerse, evaluando diferentes concentraciones de BAP, GA₃ y AIB, para la inducción de brotes, generando 4 tratamientos (tabla 2.7).

Tabla 2.7 Tratamientos para la fase de multiplicación de brotes *P. microphylla*.

	GA ₃	BAP	AIB
T1-B	1	1,5	0,5
T2-B	1,5	1	0,5
T3-B	1	1	0,5
T4-B	1,5	1,5	0,5

La relación en que se mantiene entre los reguladores de crecimiento es importante para los procesos morfogénicos, de esta forma se pretende determinar si existe alguna influencia sobre las combinaciones de citoquininas, giberelinas y auxinas, en la inducción de brotes de las yemas establecidas. Los datos para esta fase fueron tomados a los 40 días de iniciada esta fase.

El medio de cultivo que se utilizó en esta fase fue el mismo medio de cultivo de Chu et al.,1975 (N6) con las vitaminas de Kao y Michayluk (1975), solo se modificó las concentración de Nitrógeno, Potasio, mientras que las concentraciones de FeSO_4 fue normal y de sacarosa fueron 30g/L (tabla 2.8).

Tabla 2.8 Componentes del medio de Chu et al., 1975 (N6) modificado, con las vitaminas de Kao y Michayluk (1975), usado en la fase de multiplicación de *P. microphylla*.

Medio N6 (modificado)	
Componentes	Concentración mg/L
KNO3	1174,8
KH ₂ PO ₄	400
MgSO ₄ 7H ₂ O	185
(NH ₄) ₂ SO ₄	387,4
CaCL ₂ 2H ₂ O	166
KI	0,8
MnSO ₄ H ₂ O	2,98
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1,5
H ₃ BO ₃	1,6
Fe SO ₄ 7H ₂ O	27,85
Na ₂ EDTA	37,25
Sacarosa	30g/L
Vitaminas KM	
Tiamina HCl	1
Piridoxina HCl	1
Ácido nicotínico	1
Mioinositol	100
Biotina	0,01

Para la fase de multiplicación de los explantes de *P. microphylla* la temperatura promedio del cuarto de incubación fue de 25°C, con una humedad relativa de 50%, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 oscuridad controlado por un temporizador automático y con una intensidad de luz de 1500 lux.

2.2.5 Iniciación de la fase de enraizamiento

Los brotes de la anterior fase fueron colocados en el mismo medio de la etapa de multiplicación de brotes pero con una concentración de sacarosa de 50 g/L. Para esta fase se realizó la evaluación de la concentración de auxina (ácido indol butírico) y el carbón activado (tabla 2.9). Determinando la presencia o ausencia de estructuras rizogénicas en la base de los brotes a los 40 días de iniciado el experimento.

Tabla 2.9 Tratamientos la iniciación del enraizamiento de brotes de *P. microphylla*.

Tratamientos	AIB mg/L	ANA mg/L	Carbón Activado g/l
T1-E	0,5	0,1	5
T2-E	2	0,1	0
T3-E	5	0,1	0

En esta fase la temperatura promedio del cuarto de incubación fue de 24°C, con una humedad relativa de 50%, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 oscuridad controlado por un temporizador automático y con una intensidad de luz de 1500 lux.

2.2.6 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de oxidación, contaminación y sobrevivencia de la fase de establecimiento se realizaron análisis de frecuencias, tablas de contingencia y la prueba de Chi-cuadrado para determinar si existe o no relación entre las variables y para la variable número de brotes se analizó a través de un diseño estadístico completamente al azar con su respectivo análisis de varianza (ANOVA) y al encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó una prueba Tukey ($\alpha = 0.05$) para realizar comparaciones múltiples.

Se realizó un análisis perceptual, para determinar las interacciones entre los tratamientos de desinfección y la relación con las variables

dependientes, la oxidación, sobrevivencia y contaminación. También se hizo un análisis de correlación entre las variables, tiempo de inmersión, concentración de cloro, tiempo-cloro con las variables dependientes, contaminación y oxidación.

Para los datos obtenidos de las pruebas de manipulación y control de oxidación con modificación del medio de cultivo y lavados con soluciones antioxidantes se evaluó el porcentaje de oxidación de los medios con un diseño estadístico completamente al azar con su respectivo análisis de varianza (ANOVA) y para la sobrevivencia se realizaron análisis de frecuencia, tablas de contingencia y la prueba de Chi-cuadrado para determinar si existe o no relación entre los tratamientos.

Para la fase de multiplicación de brotes se realizó un diseño estadístico completamente al azar con su respectivo análisis de varianza (ANOVA). No se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) debido a que no había significancia estadística entre los tratamientos.

Para la fase de enraizamiento se aplicó estadística descriptiva. La información se analizó empleando el programa estadístico SPSS 11.5.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Fase de establecimiento

3.1.1 Desinfección del material vegetal

Para la desinfección del material vegetal se diseñaron 9 tratamientos que combinaron 3 concentraciones de cloro comercial y 3 tiempos de inmersión, se tomaron datos de contaminación, oxidación del medio de cultivo, sobrevivencia de los explantes y el número de brotes evaluado a los 30 días (Anexo A).

Para la contaminación se realizó la prueba de chi-cuadrado en base a la frecuencia de explantes contaminados y no contaminados en cada tratamiento de desinfección, analizando primero por separado el efecto de la concentración de cloro (tabla 3.1), obteniendo un valor de significancia alto (0,165) (tabla 3.2), esto posiblemente nos indica que la contaminación y la concentración de cloro no están relacionadas o son independientes con respecto a los tratamientos evaluados, aunque se puede diferenciar una tendencia en la figura 3.1; a mayor concentración de cloro, menor contaminación (figura 3.1). Esto se confirma con la baja correlación negativa encontrada en la tabla 3.3.

Tabla 3.1 Frecuencia de contaminación de los explantes por cada nivel de concentración de cloro, evaluado a los 30 días.

		Contaminación		Total
		No contaminado	Contaminado	
Concentración de cloro	10 %	20	10	30
	20 %	24	6	30
	30 %	26	4	30
Total		70	20	90

Tabla 3.2 Pruebas de chi-cuadrado en base a la frecuencia de contaminación de los explantes por cada nivel de concentración de cloro, evaluado a los 30 días.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,600(a)	2	,165
Razón de verosimilitud	3,572	2	,168
Asociación lineal por lineal	3,433	1	,064
N de casos válidos	90		

a 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 6,67.

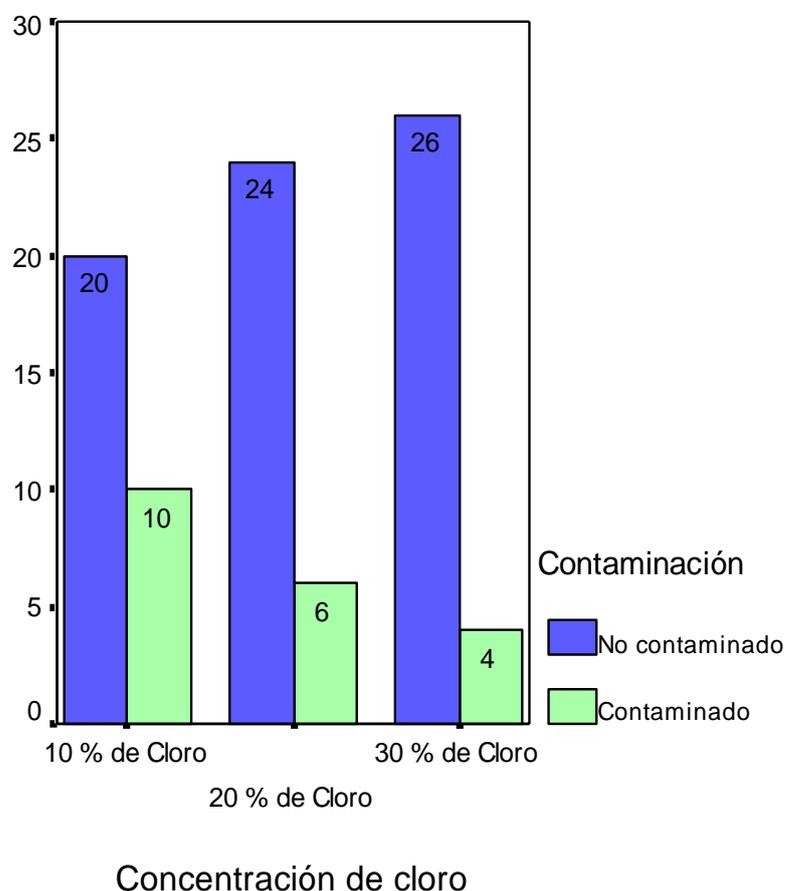


Figura 3.1 Contaminación de los explantes por cada nivel de concentración de cloro, evaluado a los 30 días.

Tabla 3.3 Correlación entre la concentración de cloro, la contaminación y la oxidación.

		Concentración de cloro
Concentración de cloro	Correlación de Pearson	1
	Sig. (unilateral)	.
	N	90
Contaminación	Correlación de Pearson	-,196(*)
	Sig. (unilateral)	,032
	N	90
Oxidación	Correlación de Pearson	,392(**)
	Sig. (unilateral)	,000
	N	90

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (unilateral).

** La correlación es significante al nivel 0,01 (unilateral).

También se realizó la prueba de chi-cuadrado en base a la frecuencia de explantes contaminados y no contaminados en cada tratamiento de desinfección, analizando el efecto del tiempo de inmersión (tabla 3.4), obteniendo un valor de significancia alto (0,295) (tabla 3.5), esto posiblemente nos indica que la contaminación y el tiempo de inmersión no están relacionadas o son independientes con respecto a los tratamientos evaluados, aunque se puede diferenciar una tendencia en la figura 3.2; a mayor tiempo de inmersión en cloro, menor contaminación.

Tabla 3.4 Frecuencia de contaminación de los explantes por cada tiempo de inmersión en cloro, evaluado a los 30 días.

	Contaminación		Total
	No contaminado	Contaminado	
Tiempo de Inmersión 10 min	21	9	30
20 min	23	7	30
30 min	26	4	30
Total	70	20	90

Tabla 3.5 Pruebas de chi-cuadrado en base a la frecuencia de contaminación de los explantes por cada tiempo de inmersión en cloro, evaluado a los 30 días.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,443(a)	2	,295
Razón de verosimilitud	2,538	2	,281
Asociación lineal por lineal	2,384	1	,123
N de casos válidos	90		

a 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 6,67.

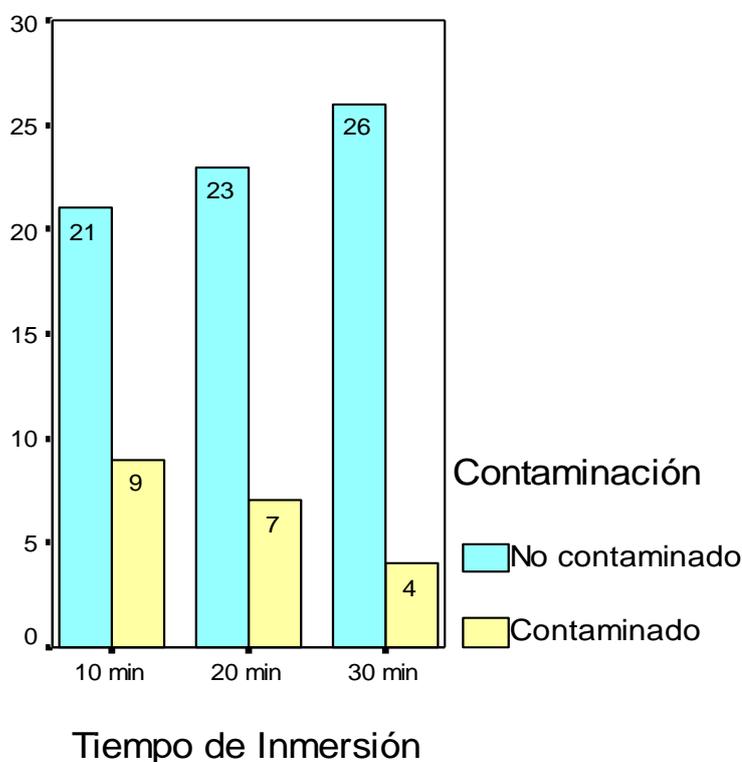


Figura 3.2 Frecuencia de contaminación de los explantes por cada tiempo de inmersión en cloro, a los 30 días.

Para evaluar el efecto de las dos variables independientes (concentración de cloro y tiempo de inmersión) sobre la contaminación se realizó la prueba de chi-cuadrado, en base a las frecuencias observadas (tabla 3.6), las cuales demuestran una disminución de contaminación al trabajar con concentraciones altas y tiempos de inmersión más prolongados.

Tabla 3.6 Frecuencia de contaminación de los explantes en cada tratamiento de desinfección, evaluado a los 30 días.

		Contaminación		Total
		No contaminado	Contaminado	
Tiempo- Cloro	10-10 T1	5	5	10
	10-20 T2	7	3	10
	10-30 T3	9	1	10
	20-10 T4	6	4	10
	20-20 T5	9	1	10
	20-30 T6	8	2	10
	30-10 T7	9	1	10
	30-20 T8	8	2	10
	30-30 T9	9	1	10
Total		70	20	90

El valor de la significancia para la interacción (tiempo-cloro) fue alto (0,254) (tabla 3.7) esto posiblemente nos indica que el tiempo de inmersión, la concentración de cloro y la contaminación no están relacionadas o son independientes con respecto a los tratamientos evaluados, aunque se puede diferenciar una tendencia en la figura 3.3; a mayor concentración de cloro y tiempo de inmersión menor contaminación y viceversa. Esto se confirma con la baja correlación negativa encontrada en la tabla 3.8.

Tabla 3.7 Pruebas de chi-cuadrado en base a la frecuencia de contaminación de los explantes en cada tratamiento de desinfección, evaluado a los 30 días.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,157(a)	8	,254
Razón de verosimilitud	9,784	8	,281
Asociación lineal por lineal	4,205	1	,040
N de casos válidos	90		

a 9 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 2,22.

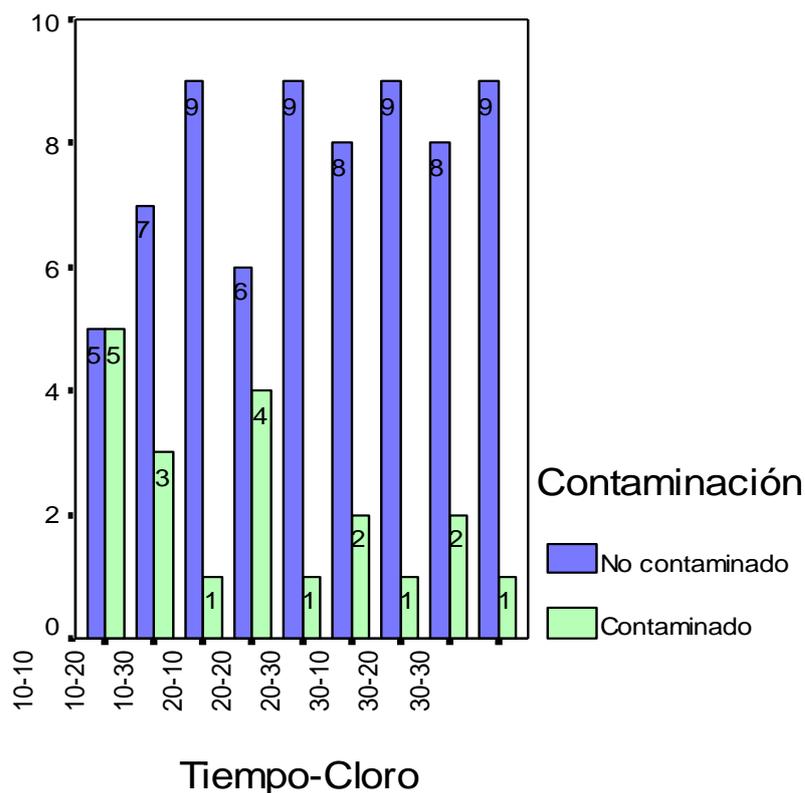


Figura 3.3 Frecuencia de contaminación de los explantes por cada tiempo de inmersión en cloro, evaluado a los 30 días.

Tabla 3.8 Correlación entre la concentración de cloro, el tiempo de inmersión, la contaminación y la oxidación.

		Tiempo-Cloro
Tiempo-Cloro	Correlación de Pearson	1
	Sig. (unilateral)	.
	N	90
Contaminación	Correlación de Pearson	-,217(*)
	Sig. (unilateral)	,020
	N	90
Oxidación	Correlación de Pearson	,581(**)
	Sig. (unilateral)	,000
	N	90

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (unilateral).

** La correlación es significante al nivel 0,01 (unilateral).

Las tendencias que se puede observar en las figuras 3.1, 3,2 y 3.3, que muestran que a mayor concentración de cloro y tiempo de inmersión, hay menor contaminación, es debido al NaClO, cuyo efecto desinfectante se debe a

la liberación de cloro; el Cl_2 reacciona con el agua para dar ácido hipocloroso, que a pH ácido o neutro es un oxidante fuerte. Al no haber ningún estudio previo en esta especie, se evaluaron diferentes concentraciones y tiempos de inmersión porque el efecto varía según el tejido vegetal (Pierik, 1990).

Los tiempos muy prolongados de esterilización permiten disminuir en gran medida la contaminación por bacterias y hongos, este desinfectante es un gran agente oxidante, cuya actividad antimicrobiana le permite matar microorganismo patógenos presentes en el tejido del material vegetal. El cloro actúa modificando grupos funcionales, inactivando proteínas enzimáticas, por lo que es un bactericida muy útil y muy potente (Aleman, 2002). Pero puede causar efectos negativos sobre el explante y más aún si se trabaja con concentraciones altas de cloro, debido a que el líquido esterilizante puede penetrar por las heridas del explante y producir un efecto tóxico, inclusive puede causar la muerte del tejido vegetal (Pierik, 1990).

Conseguir 0% de contaminación en un tratamiento de desinfección, no es necesariamente un tratamiento óptimo, ya que se deben evaluar otros factores como es la sobrevivencia, el tiempo de generación de las primeras estructuras foliares, el nivel de oxidación del medio, en especial en leñosas. Todos estos aspectos nos indicarán si es o no favorable la respuesta del material vegetal a las condiciones *in vitro* (Vega *et al.*, 2007).

Se analizaron diferentes concentraciones de cloro y el efecto sobre la oxidación fenólica, mediante un ANOVA (tabla 3.9). Se encontró diferencias significativas en el porcentaje de oxidación entre las 3 concentraciones de cloro. Al realizar la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) y las comparaciones múltiples (Anexo B) se determinaron dos grupos de significancia (tabla 3.10) siendo las concentraciones de 10% y 20% las que presentaron menores niveles de oxidación (figura 3.4). Debido a que a menor concentración de cloro, será menos agresivo el tratamiento para el material vegetal, disminuyendo el estrés fisiológico y con esto la oxidación (Echenique *et al.*, 2004; Pierik, 1990). Esto también se confirma con la correlación positiva encontrada en la tabla 3.3.

Tabla 3.9 Anova un factor para las variables oxidación y concentración de cloro.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	25,756	2	12,878	10,448	,000
Intra-grupos	107,233	87	1,233		
Total	132,989	89			

Tabla 3.10 Subconjuntos homogéneos para las tres concentraciones de cloro evaluando la variable dependiente oxidación.

Concentración de cloro	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
10 % de Cloro	30	2,80	
20 % de Cloro	30	2,87	
30 % de Cloro	30		3,97
Sig.		,971	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 30,000.

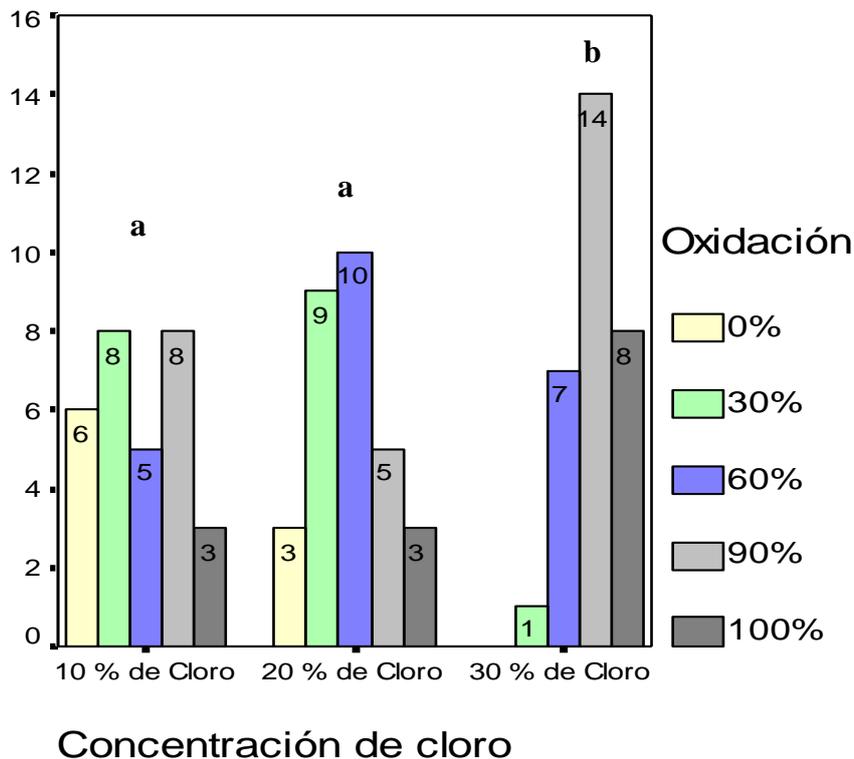


Figura 3.4 Oxidación de los explantes por cada nivel de concentración de cloro, evaluado a los 30 días.

Se analizaron diferentes tiempos de inmersión y su efecto sobre la oxidación fenólica. Mediante un ANOVA (tabla 3.11) se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de oxidación entre los 3 tiempos de inmersión; al realizar la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) y las comparaciones múltiples (Anexo C) se determinaron dos grupos de significancia (tabla 3.12) siendo los tiempos de 10 y 20 minutos los que presentaron menores niveles de oxidación (figura 3.5). Debido a que a menor tiempo de inmersión, será menos agresivo el tratamiento para el material vegetal, disminuyendo así el estrés fisiológico y con esto la oxidación (Echenique et al., 2004; Pierik, 1990). Esto se confirma con la correlación positiva encontrada en la tabla 3.13

Tabla 3.11 Anova un factor para las variables oxidación y tiempo de inmersión.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	38,422	2	19,211	17,674	,000
Intra-grupos	94,567	87	1,087		
Total	132,989	89			

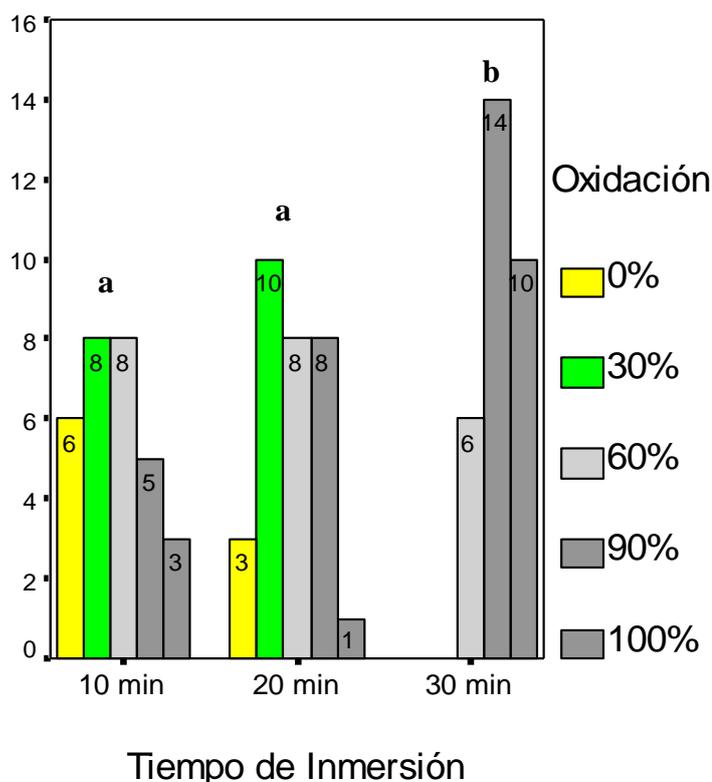


Figura 3.5 Frecuencia de oxidación de los explantes según el tiempo de inmersión, se muestran los grupos de significancia.

Tabla 3.12 Subconjuntos homogéneos para los tres tiempos de inmersión evaluando la variable dependiente oxidación.

HSD de Tukey

Tiempo de Inmersión	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
10 min	30	a 2,70	
20 min	30	a 2,80	
30 min	30		b 4,13
Sig.		,927	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 30,000.

Tabla 3.13 Correlación entre el tiempo de inmersión y la oxidación.

		Tiempo de Inmersión
Tiempo de Inmersión	Correlación de Pearson	1
	Sig. (unilateral)	.
	N	90
Oxidación	Correlación de Pearson	,481(**)
	Sig. (unilateral)	,000
	N	90

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (unilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (unilateral).

En la figura 3.6 se pueden observar los diferentes niveles de oxidación en el medio de cultivo, la coloración marrón o negro es el producto de exudados de los explantes, que son compuestos del tipo polifenol oxidados y taninos, y generalmente hacen imposible el crecimiento y desarrollo en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Echenique et al., 2004; Pierik, 1990).



Figura 3.6 Diferentes niveles de oxidación presente en los medios de cultivos

Para evaluar el efecto de las dos variables independientes (concentración de cloro y tiempo de inmersión) sobre la oxidación. Se realizó un Anova (tabla 3.14) y se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de oxidación entre los 9 tratamientos de desinfección.

Al realizar la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) y las comparaciones múltiples (Anexo D) se determinaron dos grupos de significancia (tabla 3.15) siendo los tratamientos 10-10, 10-20, 20-10 y 20-20 son los tratamientos que presentaron menores niveles de oxidación (figura 3.7 y 3.8). Esto es el resultado de emplear bajas concentraciones de cloro (10% y 20%) y bajos tiempos de inmersión (10 y 20 min) que permiten disminuir el estrés fisiológico y con esto una disminución de la oxidación fenólica y un aumento de la sobrevivencia del tejido (Sánchez & Salaverría 2004). Esto se confirma con la correlación positiva encontrada en la tabla 3.8.

Tabla 3.14 Anova un factor para las variables oxidación, tiempo de inmersión y concentración de cloro.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	79,889	8	9,986	15,233	,000
Intra-grupos	53,100	81	,656		
Total	132,989	89			

Tabla 3.15 Subconjuntos homogéneos para los 9 tratamientos de desinfección evaluando la variable dependiente oxidación.

Tiempo-Cloro	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
10-10 T1	10	a 1,90	
10-20 T4	10	a 2,20	
20-10 T2	10	a 2,20	
20-20 T5	10	a 2,40	
20-30 T8	10		b 3,80
10-30 T7	10		b 4,00
30-20 T6	10		b 4,00
30-30 T9	10		b 4,10
30-10 T3	10		b 4,30
Sig.		,902	,902

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

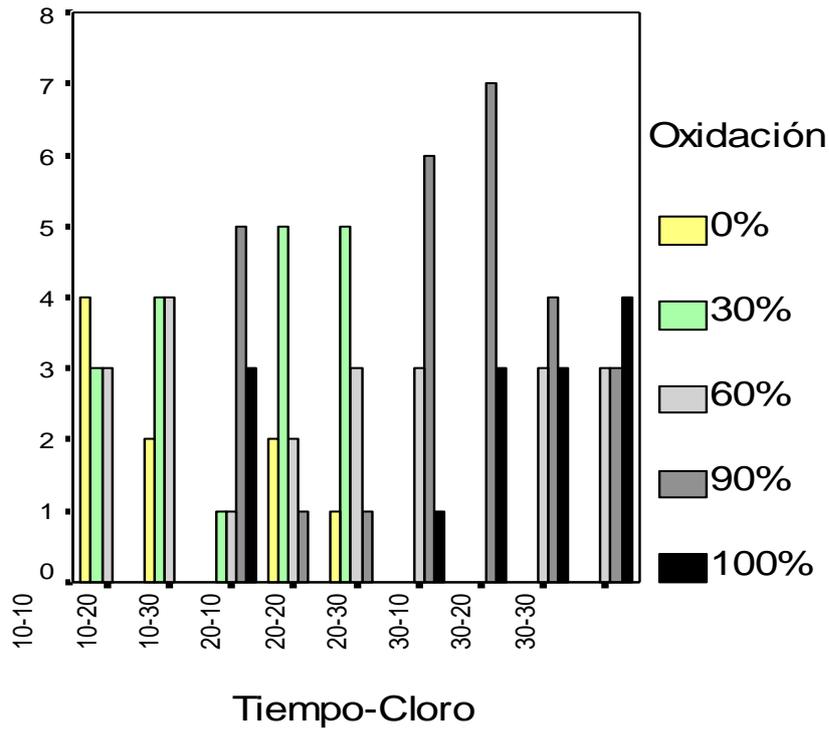


Figura 3.7 Frecuencia de oxidación de los explantes en cada tratamiento de desinfección, evaluado a los 30 días

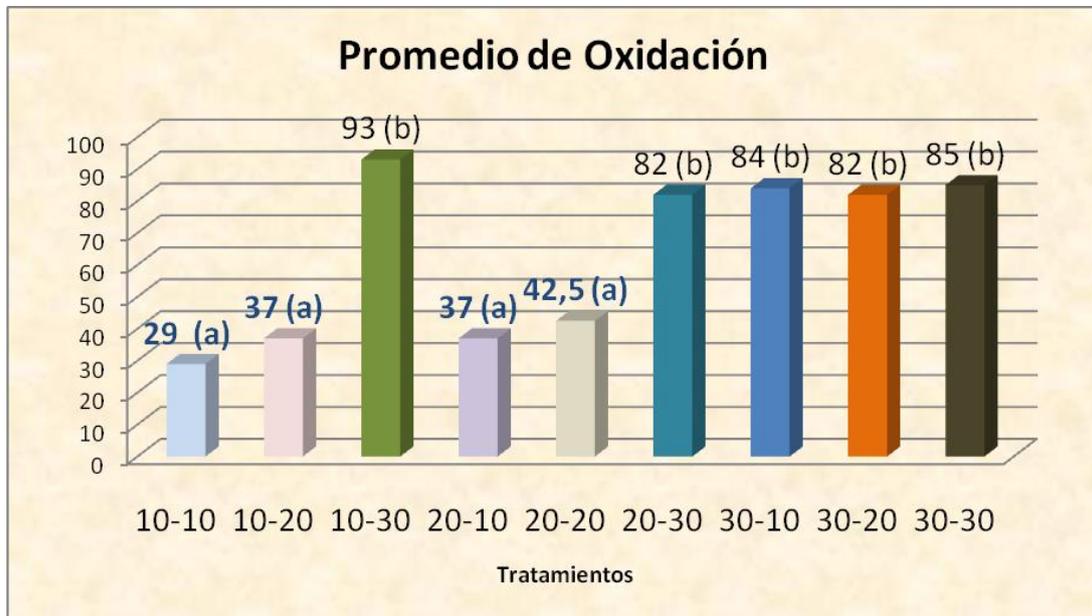


Figura 3.8 Promedios de oxidación en los 9 tratamientos de desinfección, se muestra los grupos de significancia, (a) muestran menores promedios de oxidación, (b) presenta mayores promedios de oxidación.

Con relación a la sobrevivencia el valor de la significancia fue de 0,005 (tabla 3.16), por lo que es probable que la concentración de cloro y el tiempo de inmersión influyan significativamente sobre la sobrevivencia de los explantes. Como se puede ver en la figura 3.9 a menor concentración de cloro y tiempo de inmersión, hay mayor sobrevivencia de los explantes, siendo los tratamientos (tiempo-cloro) 10-10, 10-20, 20-10, los que presentan mayor porcentaje de sobrevivencia (60%) (tabla 3.17 y figura 3.10).

Tabla 3.16 Pruebas de chi-cuadrado en base a la frecuencia de sobrevivencia de los explantes en cada tratamiento de desinfección, evaluado a los 30 días.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	21,851(a)	8	,005
Razón de verosimilitud	21,804	8	,005
Asociación lineal por lineal	12,203	1	,000
N de casos válidos	90		

a 9 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 2,89.

Tabla 3.17 Frecuencia de sobrevivencia de los explantes en cada tratamiento de desinfección, evaluado a los 30 días.

	Sobrevivencia		Total
	Muerto	Vivo	
Tiempo-Cloro 10-10 T1	4	6	10
10-20 T2	4	6	10
10-30 T3	8	2	10
20-10 T4	4	6	10
20-20 T5	9	1	10
20-30 T6	9	1	10
30-10 T7	9	1	10
30-20 T8	8	2	10
30-30 T9	9	1	10
Total	64	26	90

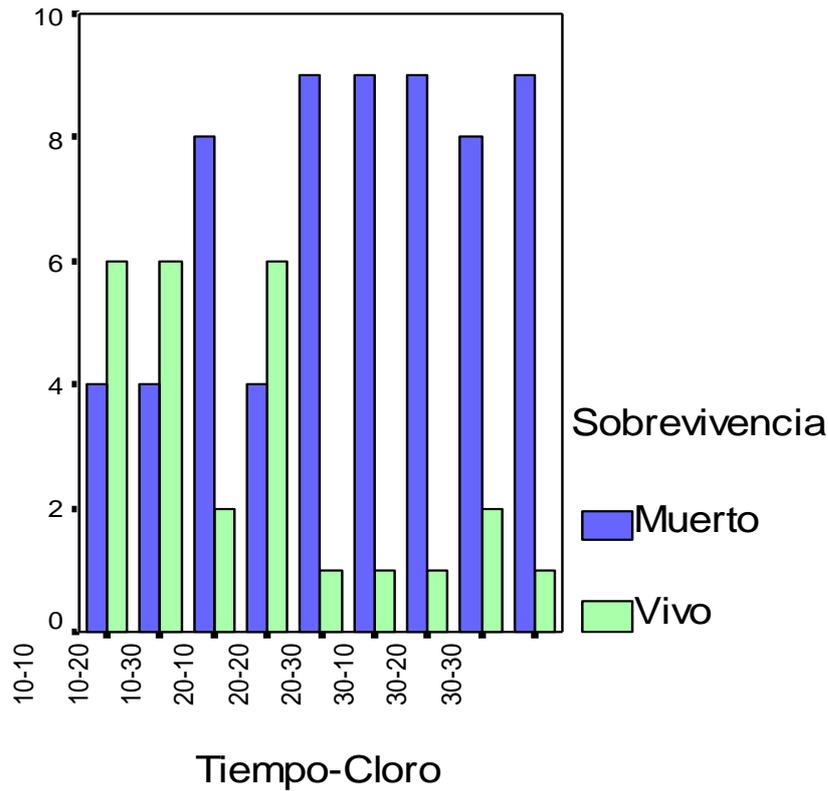


Figura 3.9 Frecuencia de sobrevivencia de los explantes en cada tratamiento de desinfección, a los 30 días.

Por esta razón después del lavado con el detergente se sumergió el tejido en alcohol al 70% por un minuto a los explantes de *P. microphylla*. Al respecto, (Jiménez, 1999 en Vega et al., 2006) menciona que los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de bacterias asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*; muchas son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores quedando protegidas, de esta manera, de los agentes químicos. Esto podría explicar los resultados obtenidos en cuanto a la dificultad de eliminar por completo la contaminación (figura 3.10)

Un factor a tomar en cuenta es la pubescencia del tejido (Villalobos y Pérez (1979) en Sánchez et al., 2004), si el tejido es pubescente, debe hacerse un prelavado con detergente o etanol al 70% durante 30s para romper la tensión superficial y permitir que la superficie sea más accesible a la acción de los agentes desinfectantes.

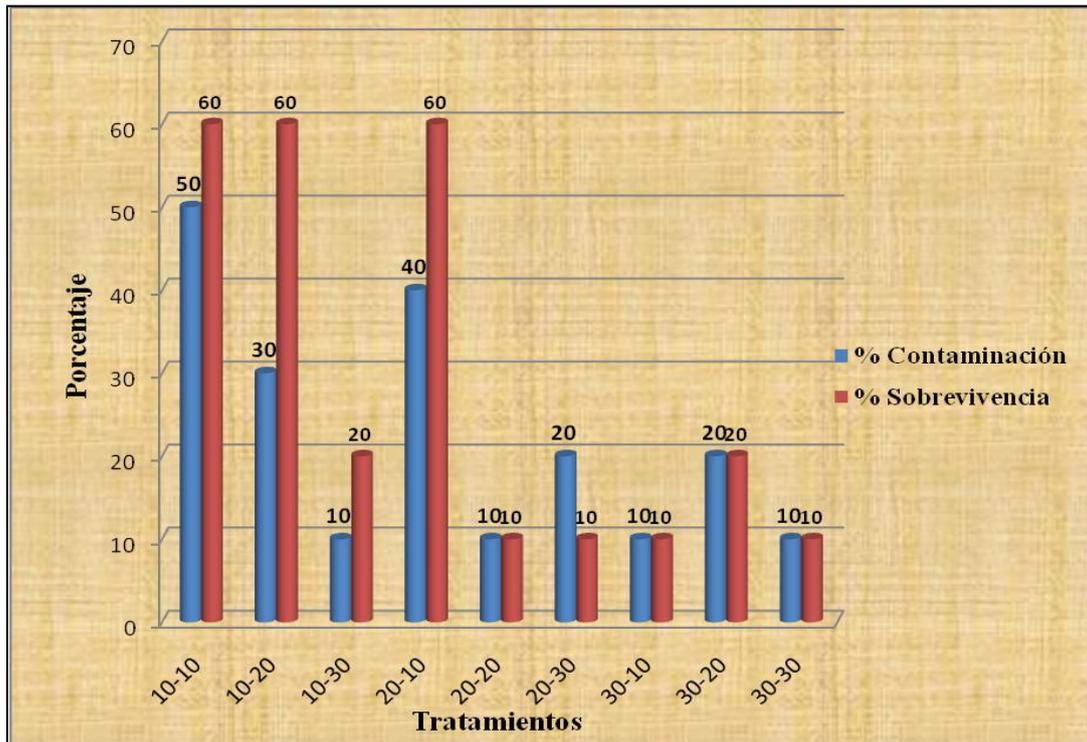


Figura 3.10 Porcentajes de contaminación y supervivencia de los 9 tratamientos de desinfección a los 30 días de iniciado el experimento.

Al realizar una prueba de chi-cuadrado entre la supervivencia, la oxidación y los tratamientos de desinfección (tiempo de inmersión y concentración de cloro), se encontró un valor bajo de significancia (tabla 3.18 y 3.19), lo que posiblemente indica que las variables están relacionadas, por lo tanto los tratamientos de desinfección muy agresivos (altas concentraciones y tiempos de inmersión muy prolongados), pueden inducir mayor oxidación fenólica, mayor toxicidad y con esto menor supervivencia (figura 3.11) (Pierik, 1990).

Tabla 3.18 Pruebas de chi-cuadrado en base a la frecuencia de supervivencia según el nivel de oxidación, a los 30 días de iniciado el experimento.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,023(a)	4	,040
Razón de verosimilitud	9,553	4	,049
Asociación lineal por lineal	8,684	1	,003
N de casos válidos	90		

a 2 casillas (20,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,60.

Tabla 3.19 Prueba de chi-cuadrado, para sobrevivencia, nivel de oxidación y los 9 tratamientos de desinfección (tiempo-cloro).

Sobrevivencia		Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Muerto	Chi-cuadrado de Pearson	57,673(a)	32	,004
	Razón de verosimilitud	66,178	32	,000
	Asociación lineal por lineal	17,246	1	,000
	N de casos válidos	64		
Vivo	Chi-cuadrado de Pearson	53,733(b)	32	,009
	Razón de verosimilitud	45,625	32	,056
	Asociación lineal por lineal	7,243	1	,007
	N de casos válidos	26		

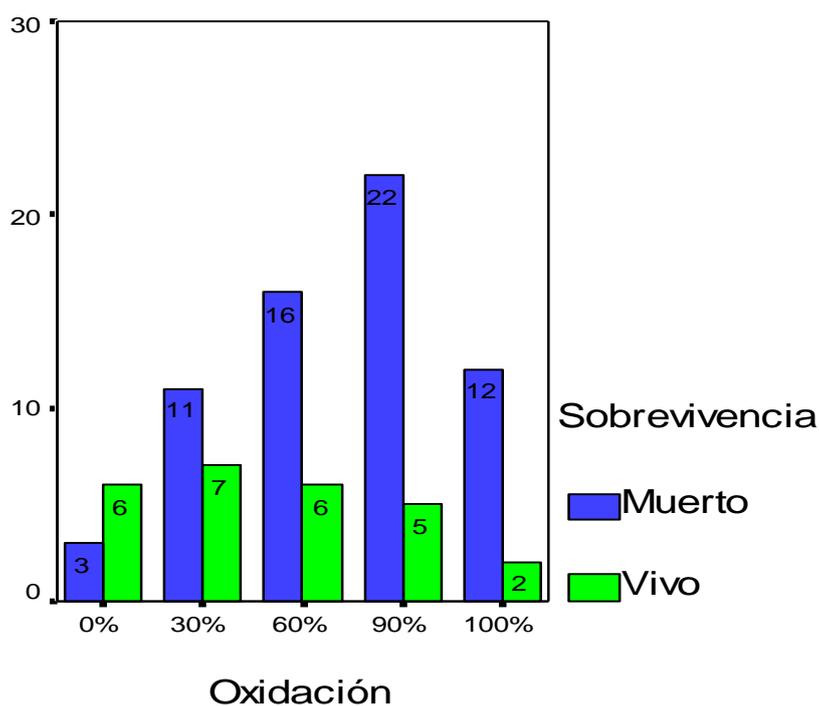


Figura 3.11 Sobrevivencia de los explantes según el nivel de oxidación.

Se encontraron diferencias significativas en el número de brotes entre los tratamientos de desinfección (tabla 3.20). Al realizar la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) y las comparaciones múltiples (Anexo E) se determinaron tres grupos

de significancia. Siendo los tratamientos 10-10, 10-20 y 20-10, los que presentaron un mejor estado de los explantes y con esto un mayor número de brotes con respecto a los otros tratamientos evaluados (tabla 3.21, figura 3.12). Siendo el tratamiento 10-20, el que presentó mayor número de brotes (figura 3.13).

Tabla 3.20 Anova un factor para la variable número de brotes entre los tratamientos de desinfección.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	18,356	8	2,294	4,693	,000
Intra-grupos	39,600	81	,489		
Total	57,956	89			

Tabla 3.21 Rangos de significancia para la variable número de brotes

Tratamientos			
Tiempo - cloro		Promedio	Rangos de Significancia
10-20	T4	1,3	a
10-10	T1	1	a b
20-10	T2	0,8	a b
30-10	T3	0,2	b c
10-30	T7	0,2	b c
30-30	T9	0,1	b c
20-30	T8	0,1	b c
20-20	T5	0,1	b c
30-20	T6	0	c

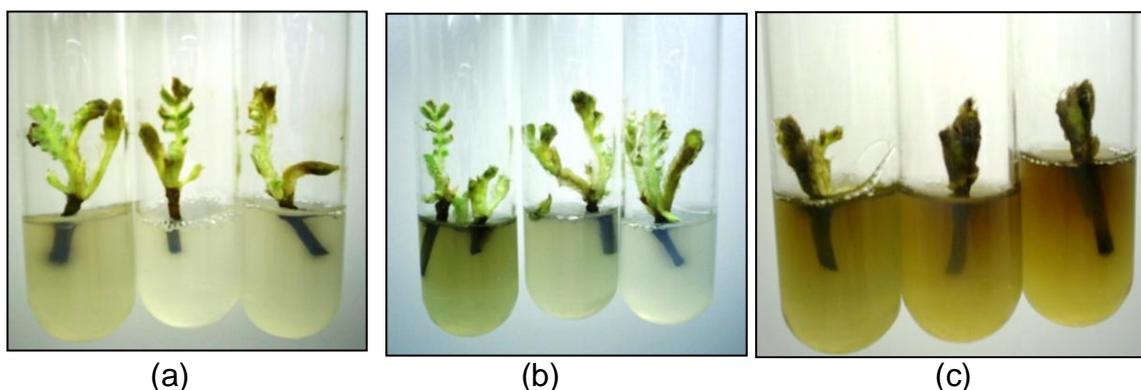
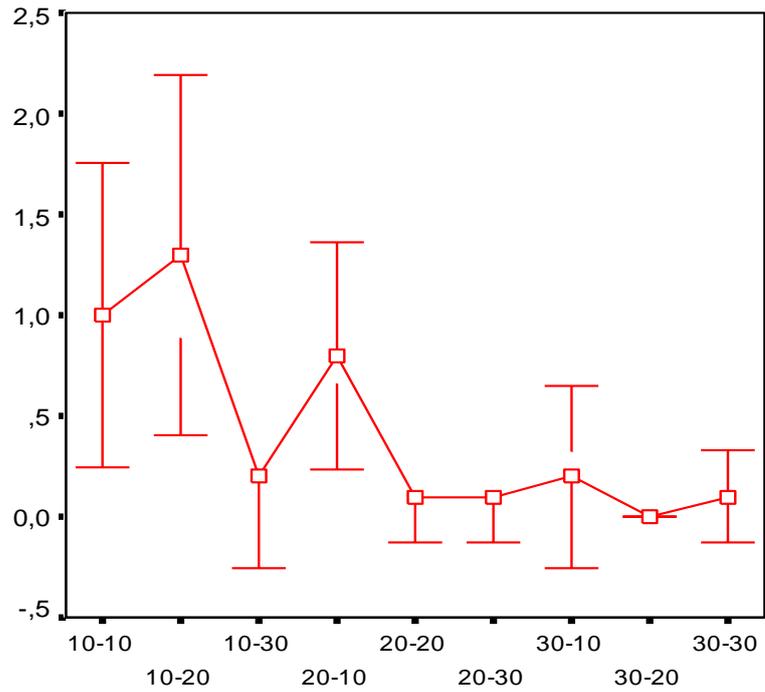


Figura 3.12 (a y b) Explantes establecidos del tratamiento (10-20): 10 minutos de tiempo de inmersión a una concentración del 20% de cloro comercial (5,25%); (c) explantes no establecidos por el efecto tóxico de la oxidación.



Tiempo-Cloro

Figura 3.13 Barras de error, con intervalos de confianza, para la variable número de brotes.

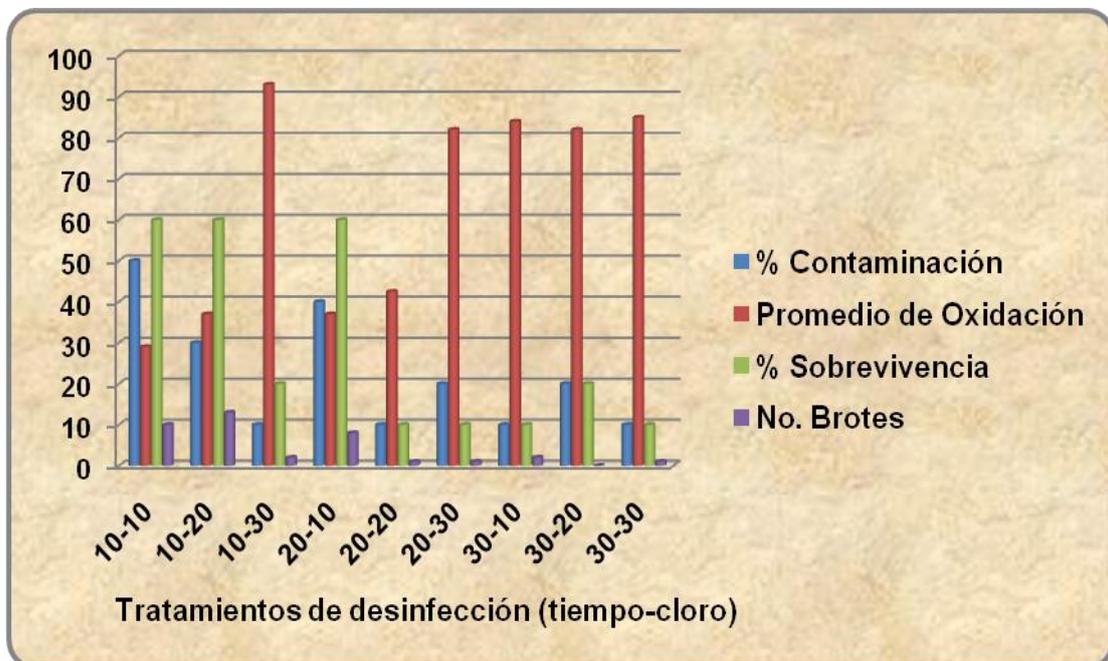


Figura 3.14 Porcentajes de contaminación, promedios de oxidación, porcentaje de supervivencia y número de brotes para cada tratamientos de desinfección.

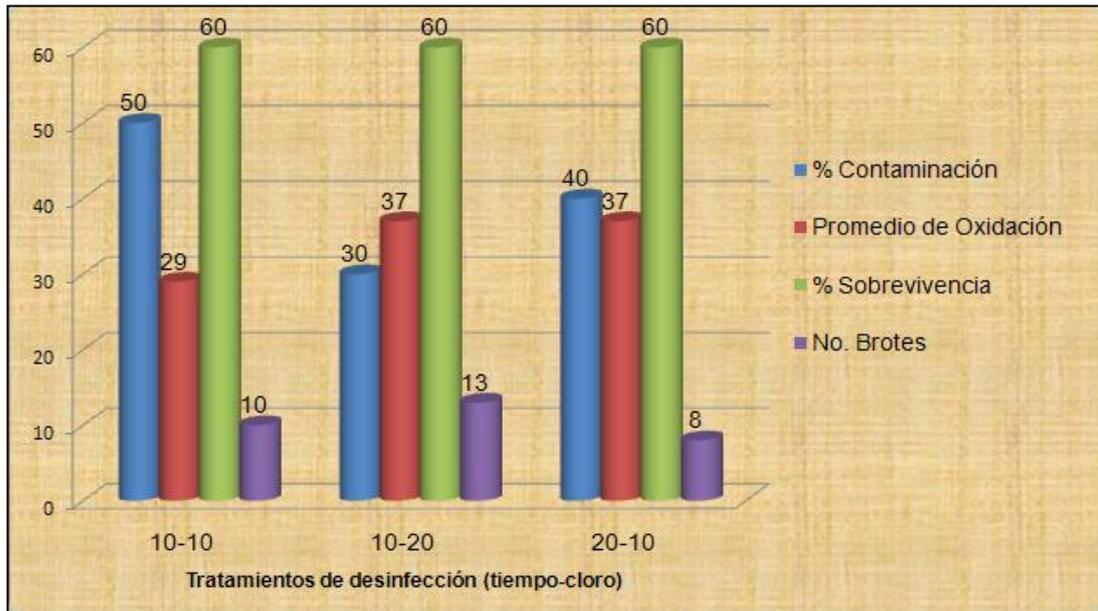


Figura 3.15 Porcentajes de contaminación, supervivencia, oxidación y número de brotes para el grupo a de los rangos de significancia.

Los tiempos de inmersión muy prolongados y concentraciones muy altas, aumentan los daños en los tejidos vegetales y provocan la necrosis y muerte celular (figura 3.12 (c)), por esta razón para determinar el mejor método de desinfección se debe tomar no solo en cuenta el tratamiento que menos contaminación tiene, sino, el que permite mayor supervivencia con menor contaminación (figura 3.14 y 3.15), (Sánchez & Salaverría 2004).

En la figura 3.16 podemos ver un mapa perceptual o de interacciones (Anexo D) que nos permite distinguir a varios grupos, el primer grupo (parte inferior izquierda) está asociado con tiempos de inmersión cortos, concentraciones de cloro bajas, mayor contaminación y mayor supervivencia. Esto es debido a que los tratamientos de desinfección de este grupo son poco agresivos y así como permitirán mayor supervivencia también aumentará crecimiento de microorganismos (bacteria y hongos).

El segundo grupo (parte inferior derecha) está asociado a concentraciones altas de cloro, tiempos de inmersión prolongados, cero contaminación y muerte del tejido vegetal, esto posiblemente, es debido a que

los tratamientos de este grupo son muy agresivos y así como eliminan toda la contaminación, matan el tejido vegetal.

Y un tercer grupo (parte superior) que asocia concentraciones y tiempos de inmersión intermedios, niveles de oxidación del 30-60%, cercano al grupo o más asociado a los no contaminados y un poco alejado del grupo de mayor sobrevivencia. De esta forma se podría asociar condiciones del primer y tercer grupo para encontrar lo óptimo en la fase de desinfección.

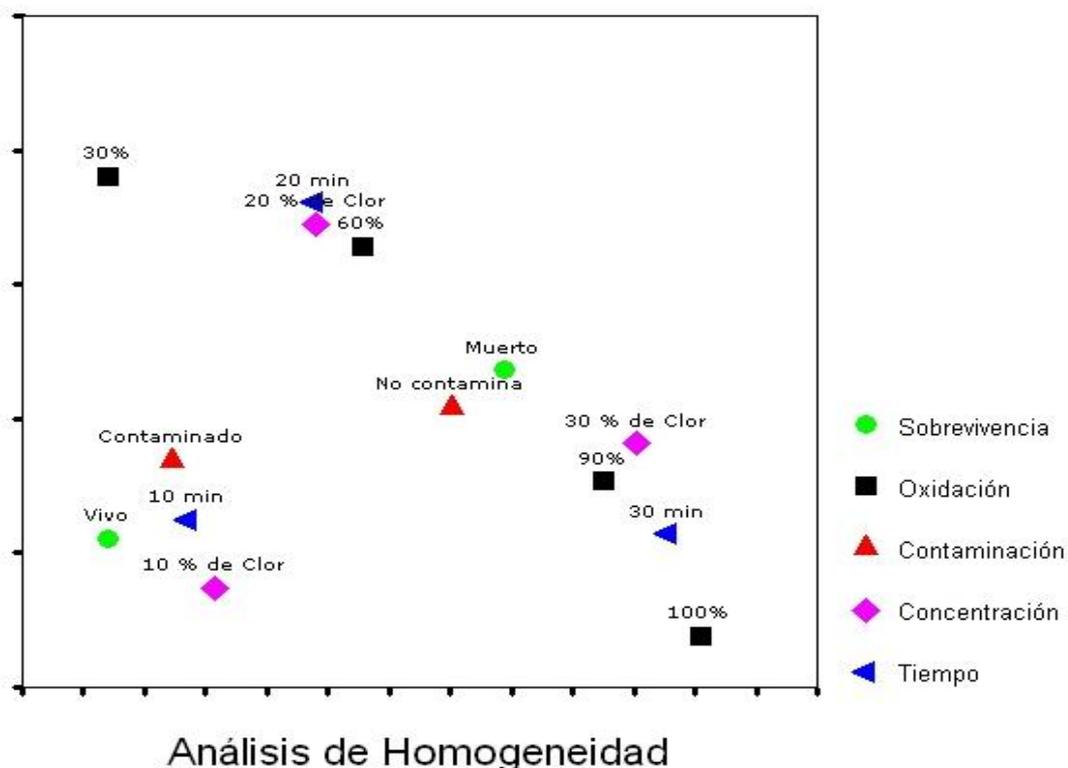


Figura 3.16 Mapa perceptual de los tratamientos de desinfección (interacción entre factores).

3.1.2 Control de Oxidación

En el proceso de aislamiento, desinfección e inoculación en el medio de cultivo siempre se generan en mayor o menor medida situaciones de estrés, provocando la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos y la exudación al medio de cultivo de estos productos. Por esta razón se analizaron diferentes estrategias para controlar la oxidación fenólica.

Para el control de oxidación mediante una modificación del potencial redox, se evaluaron 4 tratamientos con soluciones antioxidantes, los niveles más bajos de oxidación se los pudo obtener con cisteína 4 g/l (figura 3.17), permitiendo también la mayor sobrevivencia del tejido vegetal (figura 3.18).

Se encontró diferencias significativas en el promedio de oxidación entre los tratamientos de lavado (tabla 3.22), por lo tanto es probable que los antioxidantes empleados en el lavado puedan actuar de diferente forma para el control de la oxidación.

Tabla 3.22 Anova un factor para los cuatro tratamientos de lavado.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6420	3	2140	7,17	0,00067	2,866
Dentro de los grupos	10740	36	298,33			
Total	17160	39				

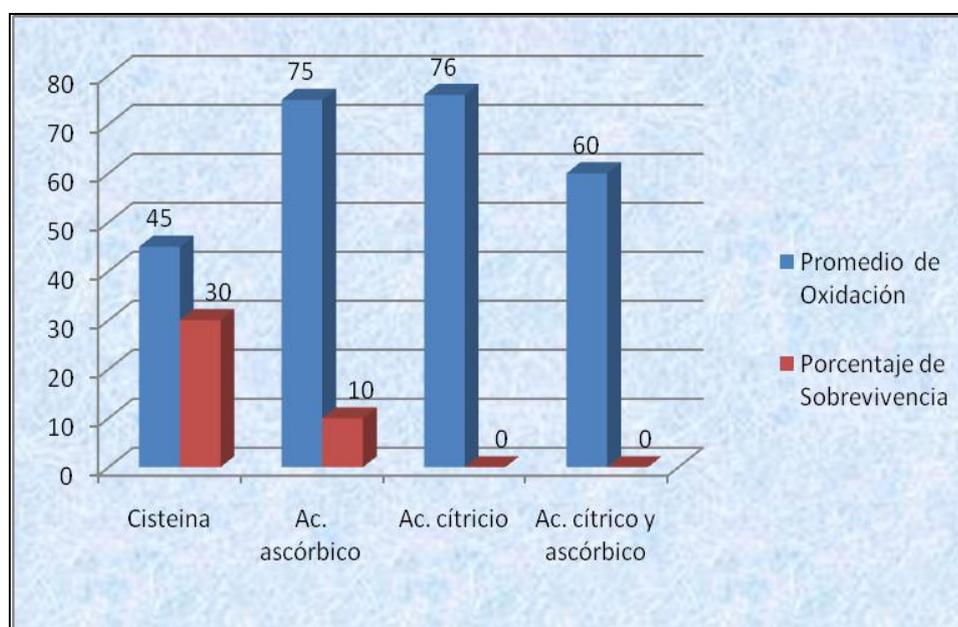


Figura 3.17 Promedios de oxidación y porcentaje de sobrevivencia en los 4 tratamientos de lavado en la fase de establecimiento

Las quinonas son uno de los productos de esta oxidación, los cuales son fitotóxicos, por lo que son capaces de alterar procesos morfogénicos o de crecimiento y desarrollo, potenciando en otras ocasiones procesos de oxidación, ya que tras su propia oxidación se convierten en potentes oxidantes.



Figura 3.18 Resultados del lavado con Cisteína HCl 4g/L.

La cisteína, de acuerdo con (George y Sherrington (1984) en Sánchez et al., 2004), no previene la oxidación, sino que actúa en la rápida remoción de cualquier quinona que se forma, permitiendo así, una disminución de los efectos fitotóxicos. Además, como es un aminoácido, pudo haber inducido un rápido desarrollo de los explantes al ofrecer nitrógeno orgánico, rápidamente biodisponible, para suplir sus requerimientos.

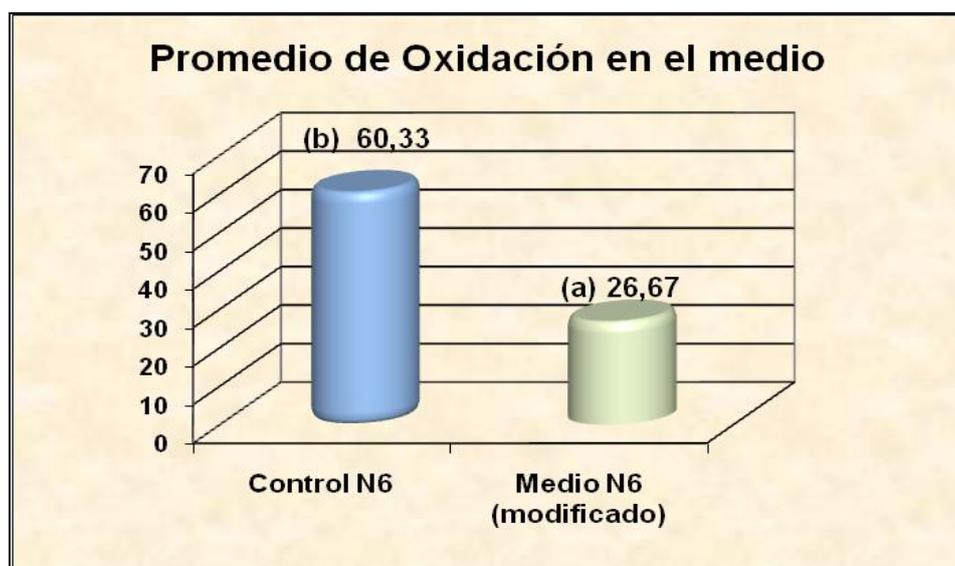


Figura 3.19 Promedios de oxidación al utilizar un medio modificado y un control. Hay diferencias significativas entre a y b.

Para el control de la oxidación mediante la modificación del ambiente (medio de cultivo), se encontró diferencias significativas en el promedio de oxidación entre los dos tratamientos, siendo el mejor, el medio N6 modificado con un promedio de oxidación de 26,67 % (tabla 3.23 y figura 3.19).

Tabla 3.23 Anova un factor para los tratamientos de modificación del ambiente.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8500,83	1	8500,83	14,91	0,00060	4,195
Dentro de los grupos	15956,66	28	569,88			
Total	24457,5	29				

Para el control de la oxidación mediante la modificación de la concentración de nutrientes, al disminuir el nitrógeno, potasio, FeSO₄ y sacarosa, se logró minimizar la síntesis de polifenoles y oxidación fenólica, permitiendo una mayor sobrevivencia de los tejidos y formación de brotes (figura 3.19 y 3.20) (Batista, 1999).

Esta modificación del medio, disminuyendo sales, es una forma más efectiva de controlar la oxidación, ya que se disminuye el estrés fisiológico generado por el potencial osmótico y salino. Y de esta forma se previene la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos y la exudación al medio de cultivo de estos productos (Batista, 1999).

Los carbohidratos son necesarios para la biosíntesis de polifenoles, de esta forma una reducción de la concentración de sacarosa también contribuye a disminuir la biosíntesis de polifenoles (Batista, 1999).

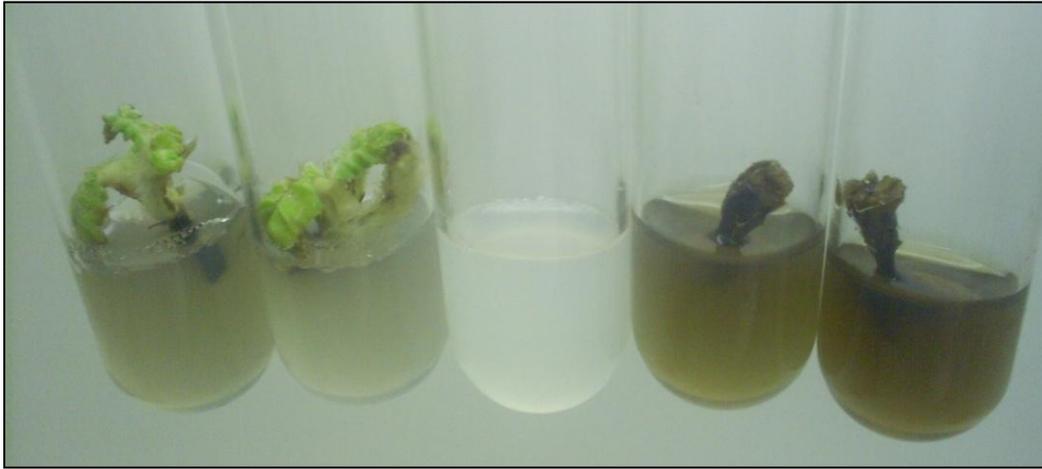


Figura 3.20 Resultados del control de oxidación mediante modificación de nutrientes del medio de cultivo (izquierda) versus un control (derecha).

En el control de oxidación mediante manipulación del explante, se encontró diferencias significativas en el porcentaje de oxidación entre los dos tratamientos de manipulación (tabla 3.24). Estos resultados (figura 3.21) se los obtuvieron en el medio (N6) modificado, obteniéndose un 94,4 % de sobrevivencia al eliminar los primordios, con un promedio de 33,33 % de oxidación del medio.

La eliminación de los primordios foliares permite minimizar la oxidación fenólica ya que al eliminar el tejido más expuesto a los agentes químicos, se está eliminando el tejido que mayor estrés fisiológico ha tenido en todo el proceso (figura 3.22). Este tejido que posee compuestos oxidados puede potenciar otros procesos de oxidación, ya que tras su propia oxidación se convierten en potentes oxidantes. Estas sustancias se pueden ligar a proteínas de la membrana y enzimas generando toxicidad y la muerte celular (Batista, 1999).

La oxidación impide que las células del explante sinteticen algunas proteínas, que al no elaborarse, afectan la formación de estructuras y el crecimiento de las vitroplantas (Quintero et al., 2003).

Tabla 3.24 Anova un factor para los tratamientos de manipulación del explante.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	11739,68	1	11739,68	20,84	0,0002	4,38
Dentro de los grupos	10705,56	19	563,45			
Total	22445,24	20				

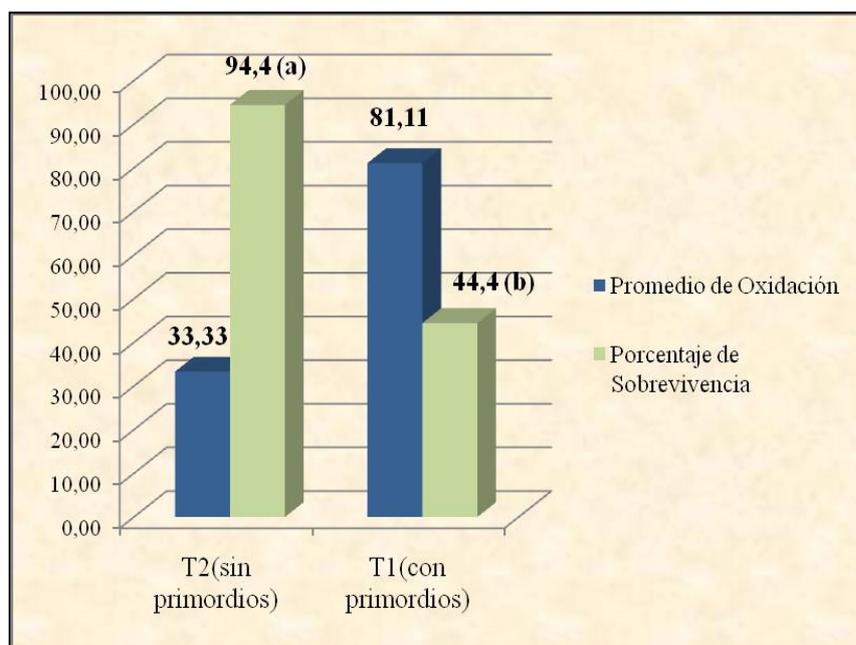


Figura 3.21 Promedios de oxidación y porcentajes de supervivencia en los tratamientos de manipulación del explante.

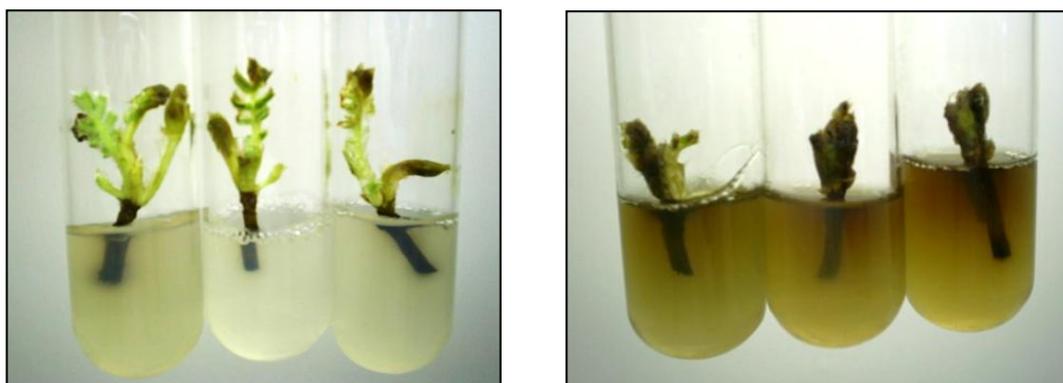


Figura 3.22 Resultados del control de oxidación mediante manipulación de los explantes, tratamiento con la eliminación de primordios (izquierda) versus tratamiento sin eliminación de primordios (derecha).

3.2 Fase de multiplicación

No se encontró diferencias significativas en el número de brotes entre los cuatro tratamientos evaluados (tabla 3.25). Estadísticamente los tratamientos son iguales, aunque los datos del promedio de brotes en la figura 3.23 son diferentes, el tratamiento con las concentraciones de 1,5 mg/L de BAP, 1,5 mg/L de GA3 y 0,5 mg/L de AIB se observó un mayor número de brotes, con un promedio de 4 brotes por explante a los 40 días de iniciada la fase de multiplicación (figura 3.23 y 3.24).

Esta proliferación de brotes se logró con la adición de una mayor concentración de citoquinina (BAP) al medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas. Este balance hormonal, con mayor concentración de citoquininas y menor de auxinas es determinante en el coeficiente de multiplicación (Aleman, 2000b).

Se empleó ácido giberélico que permite incrementar tanto la división como la elongación celular, debido a que tras la aplicación de giberelinas se incrementa el número de células y la longitud de las mismas. Además, de los efectos sinérgicos entre las giberelinas, con las auxinas y citoquininas " *in vitro*" (Aleman, 2000b).

Tabla 3.25 Anova un factor para los tratamientos en la fase de multiplicación.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5,92	3	1,97	0,468	0,71	2,87
Dentro de los grupos	147,67	35	4,22			
Total	153,59	38				

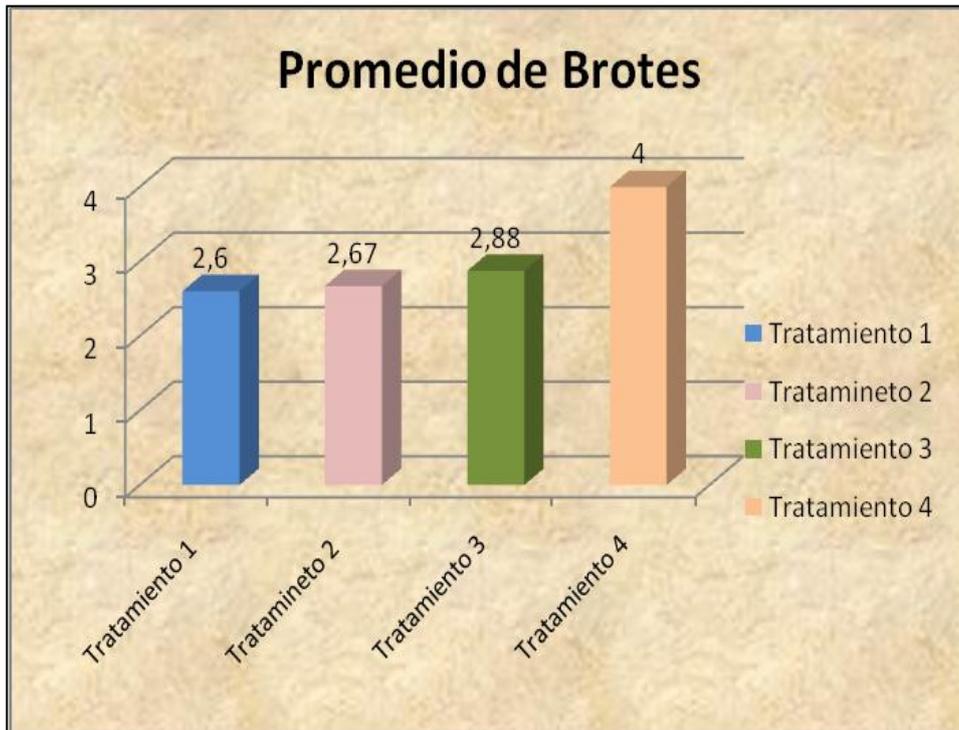


Figura 3.23 Promedios de número de brotes por explante en la fase de multiplicación a los 40 días



Figura 3.24 Brotes en la fase de multiplicación a los 40 días.

3.3 Iniciación de la fase de enraizamiento

Para iniciar el proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* se requiere generalmente el trasplante a un medio de cultivo modificado. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir o eliminar las citoquininas y aumentar las auxinas (Quintero et al., 2003). Por esta razón en los medios de cultivo solo se manejó un balance hormonal entre las auxinas AIB y ANA.

Además, Para estimular el enraizamiento es recomendable reducir las sales del medio de cultivo y elevar la concentración de sacarosa en el medio, lo cual da como resultado un crecimiento vigoroso de las raíces (Alemán, 2000), por esta razón se empleó el medio N6 modificado, con disminución de sales y se incrementó el azúcar, a pesar de esto solo se obtuvieron callos, posiblemente por emplear una concentración muy alta de citoquininas.

Los tratamientos para esta fase fueron: T1 (2mg/L AIB + 0,1 mg/L ANA); T2 (5mg/L AIB + 0,1mg/L ANA) y T3 (CA + 0,5 mg/L AIB + 0,1mg/L ANA), obteniendo resultados en el tratamiento 2, solo 5 explantes de 15 presentaron callos en la parte basal (figura 3.25).

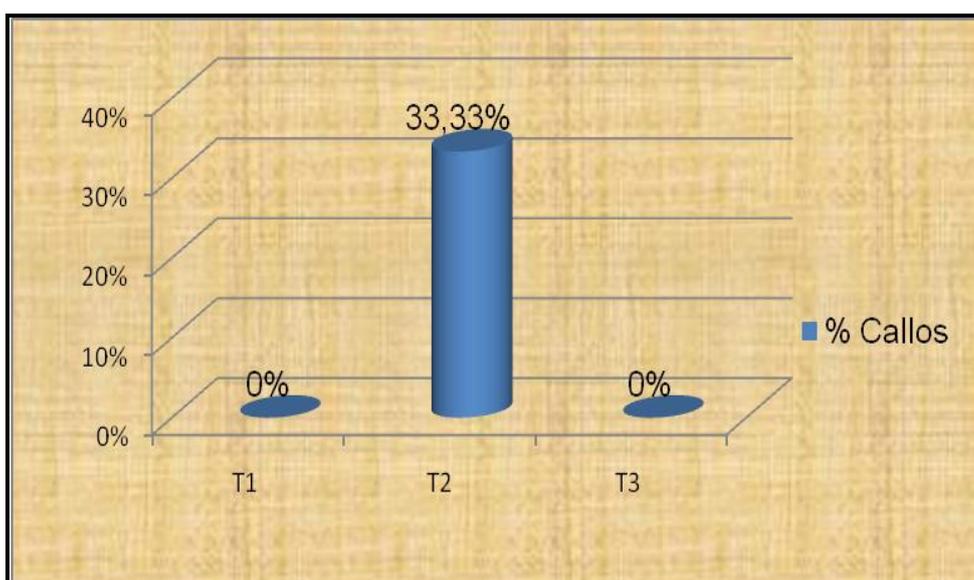


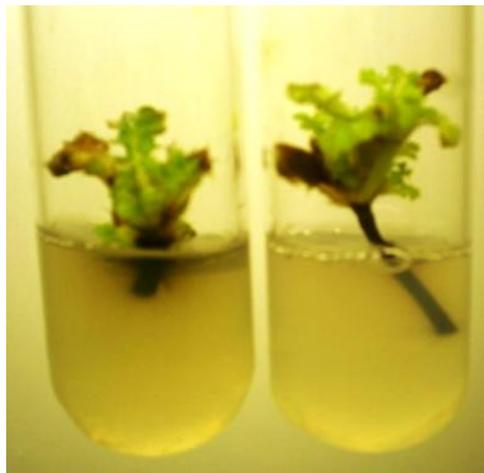
Figura 3.25 Presencia de callos en los brotes de *P. microphylla*.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 3.26 (a y b) Tratamiento 2, presencia de callos en la parte basal de los brotes, (c) tratamiento 1, (d) tratamiento 3.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

Los tratamientos (tiempo-cloro) 10-10, 10-20, 20-10 presentaron los mayores porcentajes de sobrevivencia y los niveles más bajos de oxidación. Siendo el tratamiento 10-20 el que presentó mejor estado de los explantes establecidos y mayor número de brotes.

El mejor método de desinfección fue 10 minutos de tiempo de inmersión en cloro comercial al 20%, presentando la mayor sobrevivencia de los explantes (60 %), una contaminación baja del 13%, con un promedio bajo de oxidación (37%) y con el mayor promedio de brotes, 1,3 brotes por explante en la fase de establecimiento.

Tiempos muy prolongados de inmersión y concentraciones muy altas de cloro disminuyen la contaminación de los explantes, pero pueden causar mayor oxidación fenólica, necrosis y muerte del tejido vegetal.

Al trabajar con especies leñosas es muy importante diseñar estrategias para controlar la oxidación fenólica pues incide significativamente en la sobrevivencia de los explantes.

Para el control de oxidación mediante modificación del potencial redox el mejor resultado fue una solución de lavado con cisteína HCl 4g/L.

Para el control de oxidación mediante modificación de los nutrientes del medio, una disminución a la mitad de las concentraciones de K, N, FeSO₄ permitió una mayor sobrevivencia de los tejidos, formación de brotes y reducción de la oxidación fenólica al 26,67%, permitiendo una mayor sobrevivencia.

La disminución de sales y sacarosa del medio de Chu et al., 1975 (N6) permitió prevenir la biosíntesis de polifenoles y la oxidación fenólica de los mismos.

Se obtuvo una sobrevivencia del 94,4% al eliminar los primordios foliares de la yemas de *P. microphylla*, el cual es el tejido más expuesto a los agentes químicos, y por lo tanto se está eliminando el tejido que mayor estrés fisiológico ha tenido en todo el proceso, permitiendo una mayor sobrevivencia.

Al iniciar el estudio, la oxidación fenólica fue una de las limitaciones para el crecimiento y desarrollo de las yemas de *P. microphylla*, debido a la segregación de sustancias al medio, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. Los productos de la oxidación son fitotóxicos y son capaces de alterar procesos morfogénicos o de crecimiento y desarrollo, potenciando otros procesos de oxidación.

No hubo diferencia estadística entre los tratamientos en la fase de multiplicación, pero uno de ellos permitió un mayor número de brotes. El balance hormonal empleado en esta fase es determinante en el coeficiente de multiplicación, al lograr un balance adecuado es posible alcanzar altas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método.

Para la multiplicación de explantes establecidos de *Polylepis microphylla*, el mejor balance hormonal fue 1,5 mg/L de BAP, 1,5 mg/L de GA₃ y 0,5 mg/L de AIB, en el medio de cultivo de Chu et al., 1975 (N6) con las vitaminas de Kao y Michayluk (1975), con las concentración de Nitrógeno y Potasio a la mitad y de 30g/L de sacarosa.

En la iniciación de la fase de enraizamiento con el balance hormonal empleado no se logró inducir raíces, pero hubo la presencia de callos, lo cual es un indicio de una respuesta rizogénica. Para optimizar esta fase se debe minimizar la formación de callo y maximizar la tasa de rizogénesis.

El balance hormonal que presentó callos fue 5mg/L AIB y 0,1mg/L ANA, en el medio de Chu et al., 1975 (N6) con las vitaminas de Kao y Michayluk (1975), con las concentración de Nitrógeno, Potasio a la mitad y 50g/L de sacarosa.

CAPÍTULO 5. RECOMENDACIONES

Es necesario evaluar otras concentraciones de reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación de *P. microphylla* para poder optimizar el balance hormonal de esta técnica.

En futuras investigaciones, recomiendo emplear el medio N6 modificado, debido a su efectividad para prevenir y minimizar la oxidación fenólica, además se podrían evaluar otros medios de cultivo como el TL (Tremblay & Lalonde 1984) y el medio de McCown & Lloyd (1980), en las fases de multiplicación y enraizamiento. Y se recomienda que continúen estudios sobre esta especie debido a su importancia en el ecosistema andino.

En futuras investigaciones, recomiendo realizar la eliminación de primordios foliares de las yemas y la modificación del medio de cultivo ya que son muy efectivos para prevenir la oxidación, además se podría realizar más pruebas con otros antioxidantes como el PVP y aminoácidos como la glutamina, arginina y la aspargina para minimizar aún más este efecto fitotóxico. Además, de estudiar el efecto de la época de recolección de muestras (invierno o verano), porque esto permite disminuir la contaminación y la oxidación del material vegetal.

Debido a la dificultad en la recolección del material vegetal por la distancia y la altura de muestreo en la Provincia del Chimborazo (4000 msnm), se recomendaría mantener un vivero cerca del laboratorio para acelerar la investigación.

Se sugiere que el trabajo de laboratorio de introducción de material para la fase de establecimiento se cuente con mayor apoyo humano, pues el manejo dentro de la cámara de flujo laminar es laborioso y lleva bastante tiempo, aumentando los riesgos de contaminación y deterioro del material vegetal cuando trabaja solo una persona.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

Afanador, A., (2005). Propagación *in vitro* de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. (clavel). Colombia. Tesis previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas.

Asociación Ecosistemas Andinos. (2005). Evaluación de la biodiversidad de los Bosques de Polylepis del Corredor de Conchucos – Huaraz: Conservación Internacional. Perú: Author.

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%20BIOTECNOLOGÍA/silvia2/Páginas%20de%20la%20portada/Pagina%20tema%20IV.htm>.

Alemán, S. (2000b). Organización y técnicas de cultivo de células y tejidos (cap. 3). 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%20BIOTECNOLOGÍA/silvia2/Páginas%20de%20la%20portada/Pagina%20tema%20III.htm>.

Batista, J. (1999). Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia

Chagas, J., & Soares, M. (2003), Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais. Brasil: Embrapa

Echenique, V., Rubistein, C., & Mroginski, L., (2004), Biología y Mejoramiento Vegetal. Argentina: INTA

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

Gray, J. & Trigiano, N. (2000). Plant tissue, culture concepts and Laboratory Exercises. United States of America: CRC Press LLC.

Guerra, M. P. & Nodari, R. O. (2004). Biología, Extraído el 10 de Marzo, 2007, del sitio Web de la Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, Brasil: <http://www.cca.ufsc.br/ldgv/style.css>

Hartmann, H. & Kester, D. (1997). Propagación de plantas, principios y prácticas. México: Campania Editorial Continental. S.A. de C.V.

Hofstede, R., Groenendijk, J., Coppus, R., Fehse, J., & Sevink J. (2002). Impact of Pine Plantations on Soils and Vegetation in the Ecuadorian High Andes. Mountain Research and Development, 22, 159–167.

Jameson, S. J., & Ramsay, P. R. (2007). Changes in high-altitude *Polylepis* forest cover and quality in the Cordillera de Vilcanota, Peru 1956-2005. Biological Conservation 138, 38-46.

Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., Espitia, A., (2003) *In vitro* rooting of *Dioscoreas* sp. Revista colombiana de biotecnología, 5(2), 51–56.

Kessler, M. (1995). The genus *Polylepis* (Rosaceae) in Bolivia. Candollea, 50, 131-171.

Kessler, M. (2006). Bosques de *Polylepis*. Botánica económica de los andes centrales, 110-120

Kessler, M., & Schmidt-Lebuhn, A. N. (2006). Taxonomical and distributional notes on *Polylepis* (Rosaceae). Organisms, Diversity and Evolution, 6, 67-69.

Pierik, R. (1990), Cultivo *in vitro* de las plantas superiores (L. M. S, Ayerbe, Trad.). España: Mundi-Prensa

Quezada, P. J., & Rocabado, K. P. (2005). Inducción del enraizamiento *in vitro* de brotes caulinares de *Polylepis racemosa* a través del manejo de la concentración de ácido indol acético (AIA) y sacarosa. Biofarbo, 8, 83-86.

Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., & Espitia, A. (2003) *In vitro* rooting of *Dioscoreas* sp. Revista Colombiana de Biotecnología, 5 (2), 51-56

Randall, A., K., & Hake, S. (1997). Shoot meristem formation in vegetative development. The Plant Cell, 9, 1001-1010.

Renison, D., Cingolani, A. M., suarez, R., Menoyo, E., Coutsiere, C., Sobral, A., & Hensen, I. (2005) The Restoration of Degraded Mountain Woodlands: Effects of Seed Provenance and Microsite Characteristics on *Polylepis australis* Seedling Survival and Growth in Central Argentina. Restoration Ecology, 13 (1), 129–137.

Renison, D. & Cingolani, A. (2002). Evaluation of *Polylepis australis* (Rosaceae) seedling survival and growth to choose seeding plants. Agriscientia, 24, 63-66.

Reninson, D., Hensen, I., & Cingolani, A. M. (2004). Anthropogenic soil degradation affects seed viability in *Polylepis australis* mountain forest of central Argentina. Forest Ecology and Management, 196, 327-333.

Richardson, D. M. (1998). Forestry trees as invasive aliens. Conservation Biology, 12, 18–26.

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

Romoleroux, K. (1996). Rosaceae Flora of Ecuador. Ecuador (pp. 56).

Romoleroux, K. (1989). Estudio taxonómico de los géneros *Polylepis*, *Hesperomeles* (Rosacea), *Escallonia* (Grosseclariaceae) y *Columellia* (Columelliaceae) en el Bosque Montaña Ecuatoriano, Tesis previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas.

Sánchez, M., & Salaverría, J., (2004) Control of oxidation and contamination of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) cultivated in vitro. Revista UDO Agrícola 4 (1), 21-26

Servicios Agrobiotecnológicos (Sabit). (2006). Módulo 2, Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Quito: Laboratorio de Biotecnología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador

Simpson, B. (1979). A revision of the genus *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisorbeae). Smithsonian Contributions to Botany, 43, 1-62

Vega, K. C., Bermejo, F. J., Villegas, A. G., Quezada, P. J., Aguilar, L. M., & Conde V. E., (2007). Massive propagation of *Polylepis tomentella* Weddell ssp. Nana through in vitro culture techniques. Ecología en Bolivia, 42(2), 102-120