

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

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

**RESCATE DE Fragaria chiloensis var. Huachi ESPECIE DE
FRUTILLA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN, A TRAVÉS DE LA
TÉCNICA DE CULTIVO *IN VITRO* UTILIZANDO MERISTEMOS Y
HOJAS**

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

MARCELA ALEXANDRA COBA ZAPATA

SANGOLQUÍ, MARZO DEL 2009

AGRADECIMIENTOS

“Procura ser la mejor versión de ti mismo y no una versión mediocre de alguien más”
Judy Gadlan

Agradezco a Dios por su infinito amor y bendiciones, por permitirme cumplir una meta más en mi vida.

A la Mc.S Mónica Jadán por su amistad, dedicación, sabios consejos y direccionar mi investigación con sus conocimientos.

A la Dra. Karina Proaño por sus consejos y guías en el desarrollo de la investigación.

Al Ing. Pedro Romero por sus conocimientos y tiempo invertido en la realización de este trabajo.

A mis padres, por su amor, paciencia, amistad, confianza e interés en verme culminar una meta más de mi vida.

A mi hermano por sus oraciones, bendiciones y sabios consejos que han sabido orientarme y guiarme en los momentos más duros de mi vida.

A mi familia, en especial a mis sobrinos, mi hermana y a Juan Pablo Castellanos por estar siempre presentes en el desarrollo de mi vida y acompañarme en todos los acontecimientos de ésta.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la ESPE por su amistad y ayuda en el desarrollo de mi investigación.

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. MARCELA ALEXANDRA COBA ZAPATA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 18 de Junio del 2007

M.Sc. Mónica Jadán
Director de Tesis

Dra. Karina Proaño
Codirector de Tesis

REVISADO POR

Ing. Rafael Vargas
Coordinador de la carrera

DEDICATORIA

Al Sr. Carlos Zapata Moya mi abuelo, a mis padres el Dr. Marcelo Coba y a la Dra. Carlota Zapata, a mi hermano Marcelo por ser una constante en mi vida y ser la fuerza y el apoyo incondicional siempre.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULOS

PÁGINAS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1	Formulación	del							
	problema.....		1						
1.2	Justificación.....								
		2						
1.3	Objetivos	de	la						
	investigación.....		4						
	1.3.1	Objetivo							
	general.....		4						
	1.3.2	Objetivos							
	específicos.....		4						
1.4	Marco								
	teórico.....		4						
	1.4.1	Características	generales	de	la	Frutilla	(<i>Fragaria</i>		
							<i>chiloensis</i>).....	4	
		1.4.1.1	Descripción	botánica	de	la	frutilla.....	5	
		1.4.1.2	Enfermedades		de	la	frutilla.....	7	
		1.4.1.3	Formas			de	propagación.....	9	
		1.4.1.4	Importancia				económica.....	10	
		1.4.1.5	Características	de	<i>fragaria</i>	<i>chiloensis</i>	var.	Huachi.....	10
		1.4.2	Generalidades	del		Cultivo	<i>in</i>	<i>vitro</i>	11

1.4.2.1	Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	12
1.4.3	Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	14
1.4.3.1	Material vegetal.....	14
1.4.3.2	Factores físicos.....	14
1.4.3.3	Factores químicos.....	15
1.4.3.4	Reguladores de crecimiento vegetal.....	17
1.4.3	Ventajas y limitaciones del Cultivo <i>in vitro</i>	19
1.4.4	Métodos de propagación <i>in vitro</i>	20
1.4.4.1	Cultivo de segmentos nodales.....	20
1.4.4.2	Cultivo de yemas axilares.....	20

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Localización del ensayo.....	21
2.2	Condiciones de cultivo.....	21
2.2.1	Plantas donantes o madres.....	21
2.2.2	Plantas <i>in vitro</i> (cuarto de cultivo).....	21

2.3 Fase de establecimiento del cultivo.....	22	
2.3.1 Selección del material vegetal.....	22	
2.3.2 Desinfección del material vegetal.....	22	
2.3.3 Inoculación del material vegetal.....	23	
2.4 Fase de multiplicación.....	24	
2.5 Fase de enraizamiento <i>in vitro</i>	25	
2.6 Fase de aclimatación en invernadero.....	25	
2.7 Análisis estadístico.....	26	

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Fase de establecimiento del cultivo.....	28	
3.2 Tratamiento con Cisteína.....	34	
3.3 Fase de multiplicación.....	37	
3.4 Fase de aclimatación en invernadero.....	39	

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Fase de establecimiento del cultivo.....	41	
4.1.1 Tratamiento con Cisteína.....	44	
4.2 Fase de multiplicación.....	45	

4.3 Fase de enraizamiento <i>in vitro</i>	45
4.4 Fase de aclimatación en invernadero.....	46
CAPÍTULO	5:
CONCLUSIONES	47
CAPÍTULO	6:
RECOMENDACIONES	48
CAPÍTULO	7:
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS	
.57	
ABREVIATURAS	
...67	
GLOSARIO	
.68	

RESCATE DE *Fragaria chiloensis* var. Huachi ESPECIE DE FRUTILLA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN, A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE CULTIVO *IN VITRO* UTILIZANDO MERISTEMOS Y HOJAS

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.5 Formulación del problema

Los recursos vegetales han sido fundamentales en el desarrollo de las culturas andinas como fuente de alimento, medicinas, combustible, materiales de construcción, entre otros, incluso han ocupado un lugar importante en su sistema de creencias y ritos (Almeida 2000).

En el Ecuador, la agricultura ha tenido un rol fundamental ya que constituye una de las actividades de mayor relevancia en la economía del país. En la región andina, una de las provincias que reporta una gran actividad agrícola con cerca del 50% de tierras destinadas a la agricultura es la provincia de Tungurahua pues concentra en esta actividad a un 40% de la población económicamente activa. La variedad de suelos permite que Tungurahua cuente con una producción agrícola con gran diversidad especialmente de tubérculos, raíces, hortalizas y frutas (EXPLORED ECUADOR, 2006).

En 1985 Tungurahua abasteció el mercado ecuatoriano en más de 55% y en algunos casos del 80% de algunas frutas como babaco, tomate de árbol, claudia, durazno, frutilla, manzana, mora, pera y taxo. Los cantones Ambato y Píllaro con sus respectivas parroquias Huachi y Cevallos, son la región que sobresale en la producción de frutas (EXPLORED ECUADOR, 2006).

En la parroquia “Huachis” una importante fuente de ingresos de los agricultores durante de los años 70 fue el cultivo de la frutilla (*Fragaria Chiloensis* var. Huachi), según información recolectada entre los habitantes de la zona, la frutilla Huachi constituía parte importante de la cultura, ya formando parte de los remedios caseros; además, advierten que es una fruta que resiste la sequía y el mal tiempo, y goza de una agradable y dulce sabor y posee una deliciosa fragancia. Sin embargo, factores como el desinterés comercial sobre ésta por su pequeño tamaño, llevaron a que con los años sea sustituida casi totalmente por cultivos con riego artificial como es el caso de los frutales de hoja caduca como manzanos, perales, ciruelos, durazneros, entre otros.

1.6 Justificación

Los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación constituyen la base biológica de la seguridad alimentaria y contribuyen al sustento de la población (MAG, 1999).

Una importante fuente de ingresos de los agricultores ecuatorianos es el cultivo de la frutilla, la importancia de éste cultivo no sólo en el Ecuador ha permitido que su cultivo se extienda por casi toda Europa, al Reino Unido, Francia, Alemania, ex - Yugoslavia, Países Bajos, Polonia y España, en América a Estados Unidos, Canadá, México, Guatemala, Costa Rica, Colombia, Chile y Argentina (PROEXANT, 2005).

La diseminación del cultivo de frutilla por casi todo el mundo se debe al desarrollo de variedades con distinto grado de adaptación ecológica y a los modernos sistemas de manejo, lo cual hace posible su producción desde las regiones frías hasta las regiones tropicales y subtropicales (PROEXANT, 2005).

La frutilla se ha convertido en un cultivo industrial muy importante a nivel mundial, posee variadas posibilidades de manejo, esta condición le ha permitido un desarrollo inusitado en las áreas productivas (PROEXANT, 2005).

Al desarrollo científico y tecnológico en la producción de ésta fruta ha contribuido la naturaleza de su morfología y fisiología, que permiten manejarla en condiciones de ambiente controlado y también la atracción que ofrecen sus características de forma, color, gusto y aroma, lo que ha hecho de la frutilla uno de los productos más apetecidos, tanto para consumo directo como para la elaboración de derivados de gran demanda universal.

La frutilla es cultivada no sólo por sus características digestivas y tónicas, sino por su valor nutritivo que se detalla en la tabla (1.1)

Agua	89.9%
Calorías	37 Kcal
Proteínas	0.7 g

Grasa	0.5 g
Hidratos de carbono	8.4 g
Vitamina A	60 UI
Vitamina B1	0.03 mg
Vitamina B2	0.07 mg
Vitamina B	0.6 mg
Vitamina C	59 mg
Calcio	21 mg
Fósforo	21 mg
Hierro	1 mg
Sodio	1 mg
Potasio	164 mg

Tabla 1.1 Contenido nutricional en 100 mg (Kirshbaum, 2001)

En el Ecuador la frutilla Huachi tiene una importancia primordial, ya que juega un papel esencial de la historia de un pueblo, además de contar con características atractivas como su exquisito aroma y su delicioso sabor. Al ser una planta de importancia económica nacional y mundial, con beneficiosas características nutricionales es de suma importancia rescatar ésta variedad de frutilla, ya forma parte de nuestra cultura ancestral.

Además, al ser una especie endémica de la región, es importante realizar estudios e investigación en rescate y protección de la misma, para potencializar sus características como sabor y aroma, y así poner a disposición de la comunidad en general una fruta que goza de excelentes características nutricionales.

1.7 Objetivos de la investigación

1.7.1 Objetivo general:

Rescate de *Fragaria Chiloensis* var. Huachi especie de frutilla que esta en peligro de extinción, a través de la técnica de cultivo *in vitro* utilizando meristemos y hojas.

1.7.2 Objetivos específicos:

- Desarrollar, Estandarizar y optimizar protocolos para la desinfección de *Fragaria Chiloensis* var. Huachi.
- Establecer y estandarizar medios para la introducción, multiplicación y enraizamiento de *Fragaria Chiloensis* var. Huachi utilizando meristemas y hojas
- Optimizar condiciones para el óptimo desarrollo y crecimiento de la planta *in vitro* y en invernadero.
- Obtener plantas libres de virus y bacterias, óptimas para mejoramiento genético con el cultivo de meristemas.

1.8 Marco teórico

1.8.1 Características generales de la frutilla (*Fragaria Chiloensis*)

El género *Fragaria* aparece en estado silvestre en América, Asia y Europa. En este último continente existen referencias sobre consumo desde los tiempos de la antigua Roma. El cultivo de las frutillas de fruto pequeño se extendió en Europa hasta el final del siglo XIX, momento en el que comenzaron a surgir híbridos entre las especies europeas y las americanas, con frutos de mayor tamaño que se conocen como fresones. En Chile, antes de la llegada de los colonizadores se cultivaba la especie *F. virginiana*, de fruto grande.

Las frutillas de origen europeo y con frutos de pequeño tamaño (*F. vesca*, *F. alpina* y *F. viridis*) se cruzan con las especies americanas de frutos grandes (*F. chiloensis* y *F. virginiana*) dando origen a los híbridos (fresones), también de fruto grande que pertenecen en su mayoría a la especie *Fragaria x annanasa*, variedad cultivada en la actualidad (Kirshbaum, 2001).

1.8.1.1 Descripción botánica de la frutilla

La clasificación científica de *Fragaria Chilensis* corresponde al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Rosales, familia Rosaceae, subfamilia Rosoideae, género *Fragaria*, especie *Fragaria chiloensis* var. *Huachi*

La frutilla es una planta herbácea, espolonífera, de bajo porte. El sistema radicular en general es fibroso y de desarrollo superficial, alcanzando en sentido lateral unos 30 cm. Aproximadamente, está formado por raíces principales engrosadas y por un sistema de raicillas más finas, de color claro, agrupadas en ramificaciones laterales, éstas raicillas viven pocos días. Las raicillas son responsables de la absorción de agua y nutrientes del suelo. Las raíces principales son las responsables del anclaje de la planta y del almacenamiento de reservas durante los períodos de bajas temperaturas y fotoperíodos decrecientes. La profundidad de la exploración radicular depende de las condiciones del suelo, humedad y variedad. Bajo condiciones favorables, nuevas raíces emergen de la corona en la base de cada nueva hoja, sin embargo si la base está sobre el suelo, las raíces pueden no inducirse o secarse antes de tocar el suelo (Kirschbaum, 2001).

El eje principal de crecimiento es un tallo corto y engrosado (corona), con forma de cilindro de 2 – 3 cm de longitud, del que emergen hojas de los nudos y una yema en la axila de cada hoja. Estas yemas pueden estar en estado vegetativo, así la yema evolucionará a corona o estolón, o en estado reproductivo o floral (un racimo floral). La yema terminal en estado vegetativo siempre formará nudos muy cortos siendo éstos conocidos como la corona. Las yemas auxiliares, en cambio, pueden formar coronas laterales o estolones (tallos superficiales de crecimiento horizontal) de longitud y tamaño variable. En su estructura anatómica es un verdadero tallo con tejidos especializados en la conducción de nutrientes y asimilados. Por ello, el estolón sirve de sostén para las plantas hijas en sus primeros estadios de crecimiento (Kirschbaum, 2001).

Usualmente los estolones tienen dos entrenudos muy largos, seguidos por una serie de entrenudos cortos que forman la corona de la futura planta. La yema del primer nudo está generalmente en dormición, y cuando se desarrolla

es de menor longitud y vigor. En la extremidad del estolón cuya primera hoja es rudimentaria, la yema axilar del segundo nudo que forma la corona emite un segundo estolón, y así sucesivamente. La longitud dependerá de las condiciones del cultivo y ambiente (Kirschbaum, 2001).

Las hojas son trifoliadas, compuestas, de color verde más o menos oscuro y brillante, borde aserrado y con la cara superior pubescente. Los peciolo son generalmente largos y pubescentes. Las hojas presentan gran cantidad de estomas (Kirschbaum, 2001).

Las inflorescencias se originan generalmente de la yema terminal en el tallo principal o de una ramificación de la corona en posición axilar (Verdier, 1987). El proceso de inducción y diferenciación floral se inicia en la yema terminal, pero la yema axilar inmediatamente adyacente a la terminal pasa a tomar la posición de una nueva yema vegetativa terminal, provocando que la inflorescencia queda en posición lateral (López, 2000).

La flor de la frutilla es de simetría actinomorfa (radial) pedunculada con un grueso receptáculo, pueden ser perfectas (hermafroditas), con órganos masculinos y femeninos (estambres y pistilos), o imperfectas con un solo órgano masculino o femenino (Kirschbaum, 2001).

Cada flor perfecta está constituida por un cáliz compuesto normalmente por 5 sépalos, una corola compuesta generalmente por 5 pétalos, generalmente blancos de forma variable, desde elípticos a redondeados u ovalados; por numerosos órganos masculinos (estambres) compuestos cada uno por filamento, de longitud variable que sostiene las anteras que contienen el polen (Kirschbaum, 2001).

La polinización es cruzada y realizada por insectos, lo que es indispensable para inducir al desarrollo del receptáculo, de lo contrario aparecen frutillas deformes (Kirschbaum, 2001).

La frutilla propiamente es un fruto agregado, formado por un receptáculo muy desarrollado como consecuencia de la fecundación de los óvulos; el

receptáculo, que es la parte comestible, sostiene a los verdaderos frutos que son los aquenios (Kirschbaum, 2001).

1.8.1.2 Enfermedades de la frutilla

Enfermedades de la raíz y del cuello:

- ***Rhizoctonia solani*** provoca un colapso total de la planta durante la época de cosecha. Las hojas bajas toman un color púrpura y los pecíolos se tornan color café, el cuello de la planta muere y se producen brotes laterales, las raíces se pudren y toman un color café (Allen, 1959).
- La pudrición causada por ***Phytophthora fragaria*** conocida como estela roja, produce enanismo de la planta en los casos severos. En las hojas jóvenes aparece una coloración verde azulada y en las hojas viejas roja, naranja o amarilla. En el ápice de las raíces jóvenes aparece una pudrición que avanza hasta alcanzar las raíces laterales y al cortar la raíz se observa la estela de color rojo (Allen, 1959).
- En el caso de la pudrición por ***Berticillium alboatrum*** las hojas externas de la planta muestran una coloración café oscuro en los márgenes y en el área intervenal. Las hojas internas conservan su turgencia y color verde, aunque la planta esté muerta, lo cual la diferencia del ataque de *Phytophthora sp.* en que mueren tanto las hojas jóvenes como las viejas (Allen, 1959).

Enfermedades del follaje:

- **Viruela *Mycosphaerella fragaria***: ataca las plantas de cualquier edad, aunque son más susceptibles las plantas nuevas con follaje succulento. Puede ser muy severa en época lluviosa y días nublados, cuando el follaje permanece húmedo. El síntoma inicial es una mancha circular pequeña, hundida, color púrpura en el haz de la hoja con el centro color café al inicio y posteriormente gris, rodeado por un halo color púrpura; estas lesiones aumentan de tamaño hasta alcanzar de 3 a 6 mm de diámetro (Allen, 1959).

- **Manchas de las hojas *Denrophoma sp.* y *Diplocarpon sp.*:** Son dos tipos de manchas de las hojas que aparecen esporádicamente, sobre todo en condiciones de alta humedad. *Dendrophoma sp.* produce grupos de cinco a seis lesiones circulares de color rojo púrpura en las hojas en desarrollo, cuyo centro, posteriormente, toma un color grisáceo. Cuando la enfermedad avanza, las lesiones coalescen y toman un color café con forma de letra V y en su centro se pueden observar los picnidios. *Diplocarpon sp.* causa numerosas manchas en forma irregular y color púrpura que pueden alcanzar un diámetro entre 1 y 5 mm. Las lesiones coalescen con el avance de la enfermedad por lo que la lámina de la hoja toma una coloración rojiza ó púrpura. Cuando las lesiones envejecen aparecen los acérvulos y la planta toma un apariencia quemada (Allen, 1959).
- **Mancha angular *Xanthomonas sp.*:** causa una mancha muy característica, en forma de ángulos delimitados por las nervaduras de las hojas; al verla contra la luz se ve translúcida y aceitosa, sobre todo por el envés de la hoja. Esta enfermedad aparece en época de mucha lluvia o en época seca, cuando se riega por aspersion. En algunas ocasiones por el haz de la hoja las lesiones tiene una forma irregular, con una coloración café rojiza necrótica y no dejan pasar la luz a través del tejido afectado, por lo que es difícil distinguirla de la lesiones de *Mycosphaerella sp.* y *Dyplocarpon sp.* (Allen, 1959).

Enfermedades de la flor y el fruto:

- **Moho gris *Botrytis cinerea*:** esta enfermedad ataca las flores sobre todo, cuando se presentan períodos prolongados con alta humedad relativa y al fruto durante su desarrollo, maduración y transporte. En el fruto aparece como una mancha amarillenta de consistencia acuosa, que posteriormente se extiende a toda la fruta y se cubre de un polvo gris, que corresponden a las esporas del hongo, (Darrow, 1966).
- **Otras pudriciones del fruto:** aunque el principal problema es *Botrytis sp.*, normalmente aparecen otros hongos que dañan el fruto en la etapa poscosecha. El más importante es *Pestalotia sp.*, que se manifiesta como una mancha de consistencia seca, ligeramente hundida y de

apariencia translúcida. También se presentan, como problemas poscosecha menos frecuentes, el moho *Rhizopus* sp., *Pizizella* sp., y la antracnosis *Colletotrichum* sp, (Darrow, 1966).

1.8.1.3 Formas de propagación

El sistema de crecimiento y formación de nueva coronas y estolones, permite una propagación vegetativa rápida y segura. La forma más corriente de propagar este cultivo es por medio de estolones o guías mismos que son un brote delgado, largo rastrero que se forma a partir de las yemas axilares de las hojas situadas en la base de la corona, se desarrollan en gran cantidad en épocas de alta temperatura, en el extremo del estolón se forma una roseta de hojas que en contacto con el suelo emite raíces, lo que origina una nueva planta con idénticos caracteres que la planta madre. Los estolones constituyen el método más fácil de propagación de plantas (López, 2000).

La frutilla también se propaga por semillas, la plantita originada por una semilla emite una fina raíz principal muy delgada, blanca, que pronto se ramifica, después de formarse las primeras hojas y la corona primaria, se inicia la formación de raíces adventicias en los dos costados de la base de las hojas, con tres primordios radicales por cada lado, al crecer y desarrollarse la corona primaria o formarse coronas secundarias, se van formando nuevas raíces adventicias, siempre que las zonas de los primordios radicales estén en contacto con el suelo húmedo; cuando el nudo fértil de los estolones toca el suelo húmedo rápidamente emite raíces adventicias en la base de las escamas y de las hojas originando la formación de una nueva planta (López, 2000).

1.8.1.4 Importancia económica

La producción mundial de frutillas ha aumentado progresivamente en los últimos 25 años. En los sesenta, se producía en promedio 760.000 toneladas anuales, pasando a 2.700.00 toneladas anuales entre los años 1996 a 1998 (FAOSTAT, 1999).

El continente europeo en su conjunto, representa el primer productor mundial, por delante de Estados Unidos que posee un área de plantaciones de frutillas de aproximadamente cinco mil hectáreas, la producción en el 2005 fue de aproximadamente 23.000 toneladas, pero el consumo total, tanto de fresco como de congelado e importado alcanzó 112.000 toneladas (SISCA, 2006).

En Ecuador la producción es amplia ya que en exportaciones a Estados Unidos como fruta congelada a generado ingresos de US \$1'184000, además se designa cierta cantidad se distribuye en el uso interno entre la industria y el mercado en fresco (MAG, 2004).

1.8.1.5 Características de *Fragaria chiloensis* var. Huachi

Esta especie de frutilla se encuentra ubicada en la Parroquia Huachi Grande, ubicada a siete kilómetros al sur de la ciudad de Ambato. Es una planta termo y fotoperiódica, o sea que su crecimiento depende de las condiciones de luz y temperatura. Las altas temperaturas y los días largos (más de doce horas de luz) provocan crecimiento vegetativo excesivo; en cambio las bajas temperaturas y días cortos inducen floración, por lo tanto, se encuentra en lugares de clima medio cálido, la temperatura óptima para el crecimiento de 23° C. La planta tiene un sistema radical con un 80% ó más ubicada en los primeros 15 cm del suelo. Los suelos volcánicos con buen contenido de materia orgánica, se comportan en buena forma para este cultivo, el pH debe estar entre 5,1 a 5,7 y el suelo debe tener buena fertilidad.

Fragaria chiloensis var. Huachi es una especie endémica del Ecuador, ésta especie se ha podido conservar, ya que la diversidad biológica está indisolublemente ligada a una gran variedad de pueblos y culturas locales que han manejado sus recursos naturales, han elaborado complejos universos culturales asociados a ellos y han favorecido los procesos de diversificación natural y de conservación de muchas especies de plantas y animales Acosta Solís (1982). La diversidad biológica está, pues, ligada a las diversidad cultural del país (Cabrera y Willink, 1973).

Es importante, la región andina por su biodiversidad, gracias al aislamiento de los páramos, existe un alto endemismo en cada uno de ellos. En cuanto a los recursos genéticos vegetales, la zona andina constituye uno de los mayores centros de formación de cultivos. Aquí existen parientes silvestres de la papa, cultivo silvestre que alimenta a un alto porcentaje del planeta, de pseudo-cereales como la quinua y el amaranto de leguminosas, de gran valor como diversos tipos de fréjol, chocho, etc; tubérculos andinos de gran valor como son la oca, el melloco, la jícama, la arracacha (apio) y de frutales. (Acosta, 1982).

1.8.2 Generalidades del cultivo *in vitro*

El cultivo *In vitro* se define como cultivo de porciones muy pequeñas de plantas bajo vidrio, en medio aséptico, e incluye diversas técnicas cuyos métodos y fines son muy diferentes (Boutherin y Bron, 1994). Además Pierik en 1990 define al cultivo *in vitro* como un cultivo sobre un medio nutritivo en condiciones estériles, optimizando las condiciones ambientales y nutricionales de células, protoplastos, embriones, semillas, explantes (trozos de tejidos u órganos extraídos de la planta madre) o plantas (Montes, 2007).

Cultivo *in vitro* proviene del hecho de que todo cultivo se realiza habitualmente en recipientes de vidrio, sin embargo actualmente también se utilizan otros materiales como el polipropileno (Qureshi y Saxena, 1992).

El cultivo *in vitro* se basa en el principio de la “totipotencia celular”, capacidad de una célula vegetal de dar lugar al desarrollo de una planta completa (Pierik, 1990), obteniéndose así la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original (clones) a partir de cualquier parte aislada de la planta.

Propagación masiva, obtención de plantas libres de patógenos, conservación de germoplasma, mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones, hibridación somática, introducción de nuevas características en

las plantas mediante ingeniería genética y la propagación masiva de plantas son las principales aplicaciones del cultivo *in vitro* (Alonso, 2002).

Según varios autores existen varias fases o etapas en la micropropagación.

Etapas 0: Preparación y selección de plantas madres

Conocida como Fase Preparativa, misma que es indispensable en el desarrollo de un esquema de micropropagación, ya que en esta fase se selecciona la planta donadora de los explantes y se determinan todas las condiciones para el posterior establecimiento de los mismos (Montes, 2007). En ésta etapa se seleccionan y acondicionan las plantas madres que serán utilizadas para iniciar los cultivos *in vitro* (Pérez *et al.*, 1999). previa a estas cuatro etapas.

Etapas I: Establecimiento del cultivo aséptico

La función de esta etapa es establecer al explante en el medio de cultivo e inducir el desarrollo de brotes múltiples para multiplicación posterior, lo cual puede implicar: (a) estimular la formación de brotes axilares, (b) la iniciación de brotes adventicios en brotes, hojas, escamas de bulbos, escapos florales, cotiledones y material similar, o (c) la iniciación de formación de callo en superficies cortadas (Hartmann y Kester, 1995).

Etapas II: Multiplicación

En esta etapa, cada explante se desarrolla y forma un grupo de brotes que salen de una masa basal común expandida de tejido tipo callo. Esta estructura se divide y se transplanta a un medio de cultivo fresco. Depende de la especie el tipo de medio a usarse pero siempre el medio diseñado para la fase de establecimiento se usa para la multiplicación aumentando la concentración de citoquinina (Hartmann y Kester, 1995).

Etapas III: Enraizamiento y elongación

Es necesaria esta etapa para el enraizamiento individual de los brotes, el incremento de su resistencia al estrés de humedad y enfermedades, para el

establecimiento de las reservas de alimentos necesarios en el período de transición y para el desarrollo de la capacidad autotrófica. La apariencia verde de las plantas no es suficiente para poder realizar la fotosíntesis, ya que aunque los pigmentos fotosintetizadores estén presentes, las enzimas están en ocasiones ausentes o inactivas (Izquierdo y Quiones, 2001).

Etapa IV: Aclimatación

Las plantas enraizadas o sin enraizar, se sacan del recipiente de cultivo, se lavan para retirar el residuo de agar, y se transplantan a una mezcla de tierra autoclavada, en macetas pequeñas. Inicialmente se debe proteger las plantas colocándolas en sombra, con alta humedad relativa o bajo niebla. Pueden necesitarse varios días para que se formen nuevas raíces (Hartmann y Kester, 1995). Boutherin y Bron en 1994 señalan que las raíces nacidas *in vitro* son extremadamente frágiles y colocadas en contacto con un sustrato, mueren. Es necesario esperar la formación y el crecimiento de nuevas raíces para que la planta se nutra.

1.8.3 Factores que influyen en el cultivo *in vitro*

1.8.3.1 Material vegetal

El estado fisiológico de la planta madre influye en su capacidad morfogénica (Styer, 1983), mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos, 1982b).

Entre individuos de un mismo clon, se debe tomar los más sanos como material experimental, ya que esto repercute sobre el porcentaje de infección después del aislamiento (Pierik, 1990).

Para iniciar los trabajos de cultivo *in vitro*, en primera instancia, dicha selección está dada por el objetivo perseguido, se emplean plantas sanas y vigorosas, y dentro de éstas, las zonas que se encuentran en activa división, como los meristemas. Las plantas jóvenes aportan los explantes más reactivos,

ya que la totipotencialidad disminuye con la edad, los explantes jóvenes no leñosos, en estado vegetativo y de mayor tamaño, tienen mayor capacidad de regeneración y adaptación *in vitro* (Pierik, 1990).

El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta, pues la dificultad para iniciar un cultivo aumenta con su disminución (Mroginski, 1991). El tamaño de un explante puede variar desde 1 a 5 mm de la punta meristemática misma, a un trozo de tallo de varios centímetros de largo. También se pueden utilizar para obtener explantes trozos de hojas que tengan nervaduras, escamas de bulbos, escapos florales y cotiledones (Hartmann y Kester, 1995).

1.8.3.2 Factores físicos

Influyen prácticamente en todos los procesos: absorción de agua, evaporación, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, cuajado del fruto, entre otros (Roca, 1991 y Pierik, 1990). No obstante se debe tener en cuenta que cada cultivo tiene sus propias especificidades (Izquierdo y Quiones, 2001).

- **Luz:** Es un factor fundamental en la morfogénesis (Villalobos, 1982), la luz involucra varios componentes como la intensidad, el fotoperíodo y la calidad.
- **Temperatura:** la temperatura generalmente fluctúa entre los 20 – 28 °C, variando el régimen de temperatura pocas especies se han visto beneficiadas (Chee, 1982).
- **Humedad relativa:** la humedad del cultivo es alta 70 – 80 %, ya que por las paredes de vidrio y la cubierta plástica se crea un efecto invernadero. Una elevada humedad en el cuarto produce como resultado una mayor cantidad de infecciones (Chee, 1982).
- **Concentración de O₂ y CO₂:** se proporciona aireación a un cultivo líquido cuando se lo coloca en agitación (Torres, 1997). La concentración de CO₂ dentro de cualquier recipiente de cultivo bien sellado es casi siempre muy alta, por lo que el suministro de este gas tiene muy poco interés en el cultivo *in vitro* (Trujillo, 2004).

1.8.3.3 Factores químicos

Las células del material vegetal necesitan una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos para un buen crecimiento (Cuadro 1.1). Se necesita las fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos para que el explante pueda producir sus proteínas, siendo también necesaria la presencia de sustancias orgánicas en mínimas cantidades, mismas que actúan en el crecimiento de la planta (Roca, 1993).

NECESIDADES NUTRICIONALES Y HORMONALES DE LOS CULTIVOS DE ÓRGANOS Y TEJIDOS VEGETALES

AGUA			
Sustancia orgánica	Macroelemento	Microelemento	pH básico
Azúcares Aminoácidos Vitaminas Auxinas Citoquinas Giberelinas Ácido abscisico Etileno <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> } reguladores </div>	N P K Ca Mg S	Fe Zn B Mn Cu Co Ni Al Mo I	

Mezcla de sustancias poco definidas:

- extracto de levadura
- leche de coco
- extracto vegetal
- hidrolizado de caseína
- peptona y triptona

Cuadro 1.2 Componentes de un medio de cultivo (Pierik, 1990).

- **Sales inorgánicas:** Los elementos minerales son muy importantes para la vida de las plantas. Además del C, H y O se conocen otros 12 elementos esenciales para el crecimiento de la planta: nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, potasio, magnesio, hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno (Pierik, 1990).
- **Carbohidratos:** Pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, así que es necesario agregar al medio una fuente de carbono (White, 1989). La sacarosa es la más utilizada, y puede ser reemplazada por glucosa, fructosa; maltosa galactosa; siendo las dos últimas mencionadas menos efectivas (Roca y Mroginski, 1993). El mioinositol da como resultados un mejor desarrollo de los callos y suspensiones celulares (King, 1984).
- **Vitaminas y aminoácidos:** Es necesario añadir al medio un cóctel de vitaminas como la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico, existen otras vitaminas como el ácido pantoténico, biotina, riboflavina y colina que pueden ser útiles pero no son indispensables (Roca, 1993). El ácido ascórbico puede actuar como un reductor y retrasar la formación de productos semejantes que inhiben el crecimiento, tiene además efecto sobre el crecimiento (Vancin, 1949; Nitsch, 1954). La vitamina B12 es benéfica en el establecimiento de cultivos de tejidos y células (Reinert, 1956). Al trabajar con vitaminas hay que tener en cuenta su condición de termolábiles, para evitar su degradación (Roca, 1993). Los aminoácidos son considerados un problema complejo en la nutrición de tejidos y células vegetales, ya que muchos tejidos

responden de manera diferente a los suplementos de aminoácidos (Roca, 1993).

- **Agente gelificante:** Un cultivo para ser exitoso debe contar con un medio de cultivo que contenga los ingredientes básicos (nutrimentos, azúcar y hormonas), además del óptimo agente gelatinizados (Romberger y Tabor, 1971; Bending, 1974; Lorz, 1983).
El agar puede afectar las respuestas de un cultivo debido a su alta cantidad de impurezas (Kohlembach y Wernicke, 1978; Singha, 1985).

1.8.3.4 Reguladores de crecimiento vegetal

- **Auxinas:** auxina proviene del griego *auxein*, crecer, producida en el ápice del coleóptilo de avena (Wareing y Phillips, 1973). Son promotores de crecimiento, promueven la división celular en el cultivo de tejidos. Existen un grupo denominado “naturales”, que incluyen AIA, indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, ácido indol-3-propiónico, y otros; de todo este grupo la más usada es AIA (Scout, 1984). También existe un grupo de auxinas sintéticas que provocan un efecto fisiológico similar entre las cuales se encuentra el 2,4-D, ANA y ABI; su uso es un arte ya que no es posible establecer una concentración particular de auxina que siente bien en todos los cultivos (Roca, 1993).

Las auxinas se disuelven en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio (White, 1989).

- **Citoquinas:** en 1955 Skoog propone el término cinina como genérico para sustancias naturales y sintéticas que presentaban los mismos tipos de actividad biológica, el papel primordial de las citoquinas es estimular principalmente la división celular o citocinesis, la inducción de yemas adventicias en callos y órganos, proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical (Murashige y Skoog, 1962). La mayoría

de las citoquininas naturales como sintéticas, son derivados de la adenina (Hurtado y Merino, 1988).

Las citoquininas más utilizadas son la KIN, BAP (bencil amino purina), kinetina, 2-ip (isopentenil-adenina) y zeatina (extraída del endospermo del maíz) (Gamborg *et al.*, 1968), ZEA (6-(-4-hidroxi-E-metil but_trans-2-enilamino) purina).

Algunas citoquininas como la KIN no tiene actividad si no hay presencia de una auxina.

- **Giberelinas:** las giberelinas provienen del hongo *Gibberella fujikuroi*, intervienen en el alargamiento celular, en la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro*; también pueden romper la dormición de embriones aislados o yemas (Pierik, 1990), su concentración varia entre 0.01 a 1 mg/L con un punto óptimo de 0.1 mg/L, (Schroederm, 1957), en combinación con auxinas estimulan la formación de callos; son termolábiles (van Braga, 1971a).
- **Otros reguladores:** el ácido abscísico (ABA) en su mayoría produce un efecto negativo en los cultivos *in vitro*, sin embargo en determinados casos interviene en la maduración de embriones, y en cultivos de células en suspensión facilita la sincronización de la división celular (Pierik, 1990).

1.8.4 Ventajas y limitaciones del cultivo *in vitro*

La propagación por vía vegetativa utilizando los métodos tradicionales, posee el riesgo de transmitir infecciones virales u otros patógenos. La micropropagación *in vitro*, debido a que se realiza en un ambiente esterilizado no posee ese riesgo. Así, esta técnica en todos sus aspectos permite la obtención de plantas de sanas y de calidad. Este método ofrece, además, la posibilidad de incrementar rápidamente nuevos materiales, controlar las condiciones ambientales y estudiar diversos procesos fisiológicos de la planta (Mroginski, 1991; Kitto, 1997).

Además de la rápida introducción de nuevas variedades o clones, la producción independiente de las condiciones ambientales, el incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y saneamiento, la uniformidad en las plantaciones producidas y mejor facilidad para la comercialización (Mroginski, 1991; Kitto, 1997).

Entre otras se puede citar al salvamento de especies en vía de desaparición, la creación de bancos de germoplasma, que podrán conservar especies o cultivares que ofrezcan un interés agronómico, hortícola, industrial, ecológico, etc., la garantía de homogeneidad y una buena calidad sanitaria (Boutherin y Bron, 1994).

La regeneración de plantas a partir de cultivo *in vitro* de ciertas especies, exige la búsqueda de técnicas complejas. Estas deben permitir a las plantas sobrevivir a los problemas de oxidación, heterogeneidad de respuesta y sobre todo a la ambientación cuando son trasplantadas a un sustrato y expuestas a las condiciones naturales. Por otro lado, una desventaja de la micropropagación son los posibles problemas de variabilidad genética. Este tipo de variaciones, pueden llegar a ser un problema menor en plantas ornamentales, pero con cultivos frutales y especies forestales, la estabilidad fenotípica es esencial (Mroginski, 1991; Kitto, 1997).

Además están los altos costos de las instalaciones y en muchas especies de plantas las consideraciones económicas es posible que no justifiquen su empleo comercial, además que para efectuar las operaciones se necesita adiestramiento específico, que los errores de identidad, introducción de organismos patógenos desconocidos o la aparición de mutantes desapercibidos, pueden multiplicarse a escala considerable, en un tiempo muy corto (Hartmann y Kester, 1995).

1.8.5 Métodos de propagación *in vitro*

1.8.5.1 Cultivo de segmentos nodales

Cultivo de una yema, junto con una porción de tallo, con el fin de obtener un vástago a partir de la yema (Pierik, 1990). Este es el método más

natural de propagación vegetativa de las plantas *in vitro*, ya que también puede aplicarse *in vivo* (Ziv y Halevy, 1983). El aislamiento de yemas y ápices del vástago, es una técnica, donde en principio no se añaden auxinas para evitar la dominancia apical (Pierik, 1990). La finalidad del cultivo es hacer crecer y dividir en segmentos nodales (Trujillo, 2004).

1.8.5.2 Cultivo de yemas axilares

Método semejante al cultivo de segmentos nodales, con la diferencia que se usan explantes más pequeños y se hace necesario el empleo de altas concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo (Trujillo, 2004).

En la práctica el método de explantes nodales se usa generalmente en combinación con el método de las yemas axilares (Pierik, 1990).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.8 Localización del ensayo

La presente investigación fue desarrollada en la Escuela Politécnica del Ejército, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales - Biotecnología, ubicado en la Avenida El Progreso s/n, Sangolquí – Ecuador.

2.9 Condiciones de cultivo

2.9.1 Plantas donantes o madres

Las plantas madres fueron seleccionadas por sus características físicas, de la población de Huachi Grande, ubicada a siete kilómetros de la ciudad de Ambato.

2.9.2 Plantas *in vitro* (cuarto de cultivo)

En el laboratorio, los recipientes con los diferentes explantes se colocaron en estanterías en un cuarto de cultivo climatizado con una temperatura media de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa media del $60 \pm 3\%$ y una intensidad lumínica de 2000 lux emitida por tubos fluorescentes blancos.

Los recipientes de cultivo consistieron en tubos de ensayo tienen una capacidad de 20 ml sellados con tapones de algodón en donde se dispensaron 10 ml de medio de cultivo y se sembró un explante por tubo.

Para la fase de multiplicación y enraizamiento, se utilizó frascos de vidrio con capacidad de 200 ml.

2.10 Fase de establecimiento del cultivo

2.10.1 Selección del material vegetal

El material vegetal de partida se lo tomó de la parroquia Huachi ubicada a siete kilómetros de la ciudad de Ambato, la selección se basó en las características físicas que cada planta presentaba: coloración, forma y tamaño.

2.10.2 Desinfección del material vegetal

En el laboratorio se realizó un lavado de las yemas y hojas de *Fragaria Chiloensis* Var. *Huachi* con abundante agua corriente para eliminar impurezas, posteriormente los explantes fueron colocados en vasos de 1000 ml, se realizaron tres lavados con 4 g de detergente y agitación constante por 6 minutos cada uno, seguido a esto se lavaron en agua destilada estéril y agitación hasta eliminar cualquier resto de detergente, paso seguido se

sumergió en alcohol al 70% por un minuto, además se llevaron los explantes a una solución de cloro al 15, 20 y 25% mas 5 gotas de Tween[®] 80/l y agitación durante 15, 20 y 25 minutos.

Finalmente, fueron retiradas las yemas y hojas de la solución de cloro y Tween[®] 80 que se encontraban en agitación, y se las trasladó a la cámara de flujo laminar donde bajo condiciones asépticas se procedió a realizar 3 lavados en agua destilada estéril durante 3 minutos cada uno, luego empleando pinzas y bisturís esterilizados previamente, se procedió a seccionar los explantes (yemas con uno o dos primordios foliares y fragmentos de hoja).

A partir de este momento se aplicaron los 9 diferentes tratamientos de desinfección (Anexo B) utilizando soluciones de alcohol etílico al 70%, hipoclorito de sodio al 15, 20 y 25% más 5 gotas de Tween[®] 80 a diferentes tiempos de inmersión 15, 20 y 25 minutos seguidos de lavados continuos en agua estéril, los cuales se resumen en la Tabla 2.1.

Tratamiento	Codificación	Tiempo (min.)		Cloro concentraciones (%)	
T1	1c1	1	15	C1	15
T2	2c2	2	20	C2	15
T3	3c3	3	25	C3	15
T4	1c1	1	15	C1	20
T5	2c2	2	20	C2	20
T6	3c3	3	25	C3	20
T7	1c1	1	15	C1	25
T8	2c2	2	20	C2	25
T9	3c3	3	25	C3	25

Tabla 2.1 Codificación de tratamientos de desinfección del material vegetal.

2.10.3 Inoculación del material vegetal

El material vegetal luego de los lavados consecutivos en agua destilada estéril, fue sembrado en tubos de ensayo con medio de cultivo Boxus (Anexo C), el cual fue preparado de la siguiente manera: las sales de Boxus fueron suplementadas con 1.2 mg de BA, 0.5 mg de IBA y 0.5 mg de GA3, 30 g/L sacarosa y 7.5 g/L agar, y se ajustó el pH a un valor de 5.3 con la utilización de HCl y NaOH 1N, a continuación se procedió a esterilizar el medio en autoclave a 121°C y 15 psi de presión por 15 minutos(Anexo D). Antes de proceder a la transferencia de los explantes al medio de cultivo, se adicionó al medio 2 gotas de cisteína a diferentes concentraciones, con la ayuda de una jeringuilla de 5 ml y un filtro 2 um, todo el procedimiento se realizó bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar, empleando pinzas y bisturís esterilizados. El material vegetal fue mantenido en el medio por 3 días y posteriormente se procedió a realizar el mismo procedimiento manteniéndolos por 3 semanas.

Tratamientos	Concentración de Cisteína
T1	0,20 mg/L
T2	0,40 mg/L
T3	0,60 mg/L
T4	0,80 mg/L
T5	1,00 mg/L

Tabla 2.2 Codificación de los tratamientos de concentración de cisteína

2.11 Fase de multiplicación

Luego de 3 semanas en que los explantes se adaptaron al medio y se eliminó la oxidación, se obtuvieron plántulas vivas y liberadas de contaminantes exógenos, posteriormente, éstas fueron repicadas.

Los explantes repicados fueron sembrados en 3 diferentes medios de propagación o multiplicación que corresponden a los 3 tratamientos aplicados en esta fase; los 3 medios se componen de las sales de Boxus (Anexo E), suplementados con 30 g/L sacarosa, 7.5 g/L agar, 0.5 mg IBA y 0.8 mg de GA3 y como variantes para cada medio de cultivo, BAP en 3 diferentes concentraciones (1.2, 1.5 y 2 mg).

La Tabla 2.2 detalla la composición de los 3 medios de cultivo empleados para la multiplicación de los explantes. El medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5.3 y dispensado en frascos de cristal con tapas de plástico transparente y finalmente autoclavado a 121 °C y 15 psi de presión por 15 minutos. Los brotes multiplicados fueron mantenidos en el cuarto de cultivo por 4 semanas, a 21°C ± 2 de temperatura, con porcentaje de 60% ± 3 de humedad y 2000 lux de intensidad lumínica emitida por los tubos fluorescentes blancos.

Tratamiento	Sales minerales	Sacarosa (g/L)	Agar (g/L)	IBA (mg/L)	GA3 (mg/L)	BAP (mg/L)
T1	BOXUS	30	7.5	0,5	0,8	1.2
T2	BOXUS	30	7.5	0,5	0,8	1.5
T3	BOXUS	30	7.5	0,5	0.8	2.0

Tabla 2.3 Diferentes concentraciones de BAP aplicadas en la fase de multiplicación de los brotes.

2.12 Fase de enraizamiento *in vitro*

Para la fase de enraizamiento *in vitro* se utilizaron brotes de 1.5 cm de longitud aproximadamente y se inocularon en un medio de cultivo provisto de las sales de Boxus (Anexo E) a la mitad de su concentración, suplementado con 30 g/L sacarosa, 7.5 g/L agar, 2.5 mg/L de Pantotenato de Ca, 4g/L de carbón activado y 1 mg/L de IBA.

El medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5.3, dispensado en frascos de cristal con tapas de plástico transparente; esterilizado en el autoclave a 121 °C y 15 psi de presión por 15 minutos. Las plántulas fueron mantenidas 7 semanas en el cuarto de cultivo a 21°C ± 2 de temperatura, con porcentaje de 60% ± 3 de humedad y 2000 lux de intensidad lumínica emitida por los tubos fluorescentes blancos.

2.13 Fase de aclimatación en invernadero

Para la fase de aclimatación las plantas enraizadas se transfirieron a bandejas plásticas con tapa, mismas que contenían un sustrato autoclavado a 121 °C y 15 psi de presión por 15 minutos, compuesto por 45% de cascarilla de coco + 45% de humus + 10% de ceniza volcánica. El procedimiento consistió en eliminar de las raíces el medio con abundante agua destilada y autoclavada.

Se colocaron las plantas bajo luz artificial para mantener la temperatura y paulatinamente se fueron levantando las tapas de las bandejas, hasta quedar completamente descubiertas; plantas fueron regadas cada 2 días con medio Boxus (Anexo E) a la mitad de su concentración.

2.14 Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ADEVA) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Cuando existió diferencias se realizó una prueba de T Student. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS, versión 17.0.

Para todas las fases de la investigación se realizaron 3 ensayos del tratamiento a los cuales se los denominó muestras y se analizaron las siguientes variables:

Fase de establecimiento del cultivo:

- Porcentaje de explantes contaminados (%): medición del porcentaje de explantes contaminados a las 3 semanas del establecimiento del cultivo en relación a los 9 tratamientos aplicados.

Unidad experimental = 1 tubo con 1 explante

- Porcentaje de explantes quemados (%): medición del porcentaje de explantes quemados (tejido necrosado) a las 3 semanas del establecimiento del cultivo en relación a los 9 tratamientos aplicados.

Unidad experimental = 1 tubo con 1 explante

Fase de multiplicación:

- Índice de propagación (IP): medición del número de brotes por explante dentro de la unidad experimental (frasco) a las 4 semanas de cultivo en relación a los 3 tratamientos hormonales.
- Porcentaje de presencia de raíz (%): para la evaluación de esta variable se relacionó el número de brotes que al menos formaron una raíz de 0.5 cm con el número total de brotes del tratamiento a las 7 semanas de cultivo en relación a los 2 tratamientos.

Unidad experimental = 1 frasco con 1 plantula

Fase de aclimatación en invernadero:

- Porcentaje de sobrevivencia (%): esta variable fue medida mediante la relación de las plantas muertas y el número total de plantas aclimatadas, multiplicado por 100 después de 4 semanas en relación al tratamiento aplicado.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.5 Fase de establecimiento del cultivo

En esta fase se seleccionó hojas y yemas de plantas vigorosas. A los explantes de hojas y yemas se les realizó desinfecciones con alcohol al 70% por 1 minuto y con cloro a diferentes concentraciones y tiempos de inmersión.

Se probaron 9 tratamientos de desinfección (Anexo B), cada tratamiento tuvo 5 unidades experimentales, y se realizaron 3 ensayos para cada uno, en la tabla 3.1 se puede observar los resultados obtenidos.

TRATAMIENTO	CONTAMINADOS		
T1	3	4	5
T2	5	5	5
T3	5	5	4
T4	3	3	3
T5	1	1	1
T6	2	1	3
T7	0	0	0
T8	0	0	0
T9	0	0	0
	M1	M2	M3

Tabla 3.1 Cuantificación de explantes contaminados, donde de T1 a T9 representan a los tratamientos de desinfección y de M1 a M3, los ensayos realizados

Los datos obtenidos en la tabla 3.1 se sometieron a un análisis de varianza para determinar la variable “porcentaje de explantes contaminados en

el ensayo”, los tratamientos T8 y T9, no arrojaron datos para ninguna prueba por la necrosis total que presentó el material vegetal. En la tabla 3.2 se puede observar el porcentaje de contaminación. En dicha tabla se puede evidenciar que el F calculado (48.89285) es mayor al F crítico (2.85000), demostrando así la hipótesis que por lo menos uno de los tratamientos aplicados es diferente, en el Anexo G se detallan las diferencias significativas entre los tratamientos.

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F
Entre	101.4074	8	12.6759259	48.89285
Dentro	4.6666667	18	0.25925926	
Total	106.074074	26		
% de contaminación 43.7037037				
* F crítico 2.85000				

Tabla 3.2 Análisis de varianza para la variable porcentaje de explantes contaminados en la fase de establecimiento del cultivo.

Al observar los resultados de la Figura 3.1, se determinó que los tratamientos T7, T8 y T9 no evidenciaron contaminación, sin embargo por su alta concentración de cloro los tejidos de los explantes necrosaron, por lo que perdieron su viabilidad, mientras que los tratamientos de desinfección restantes si presentaron diferentes niveles de contaminación (Figura 3.2).

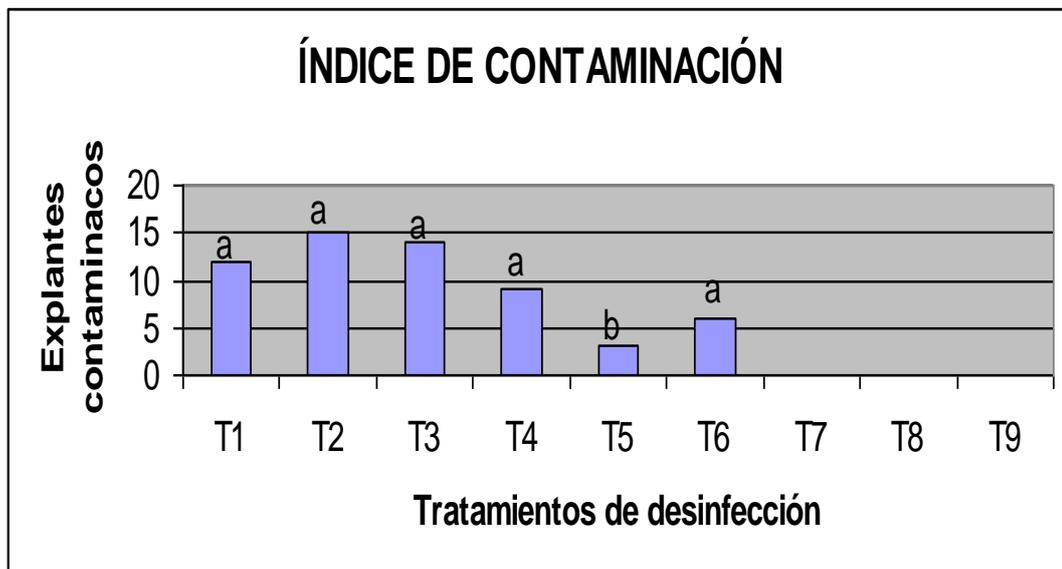


Figura 3.1 Evaluación de los 9 tratamientos de desinfección, para determinar el índice de contaminación, donde de T1 a T9 representan los tratamientos de desinfección y los números representan los explantes contaminados

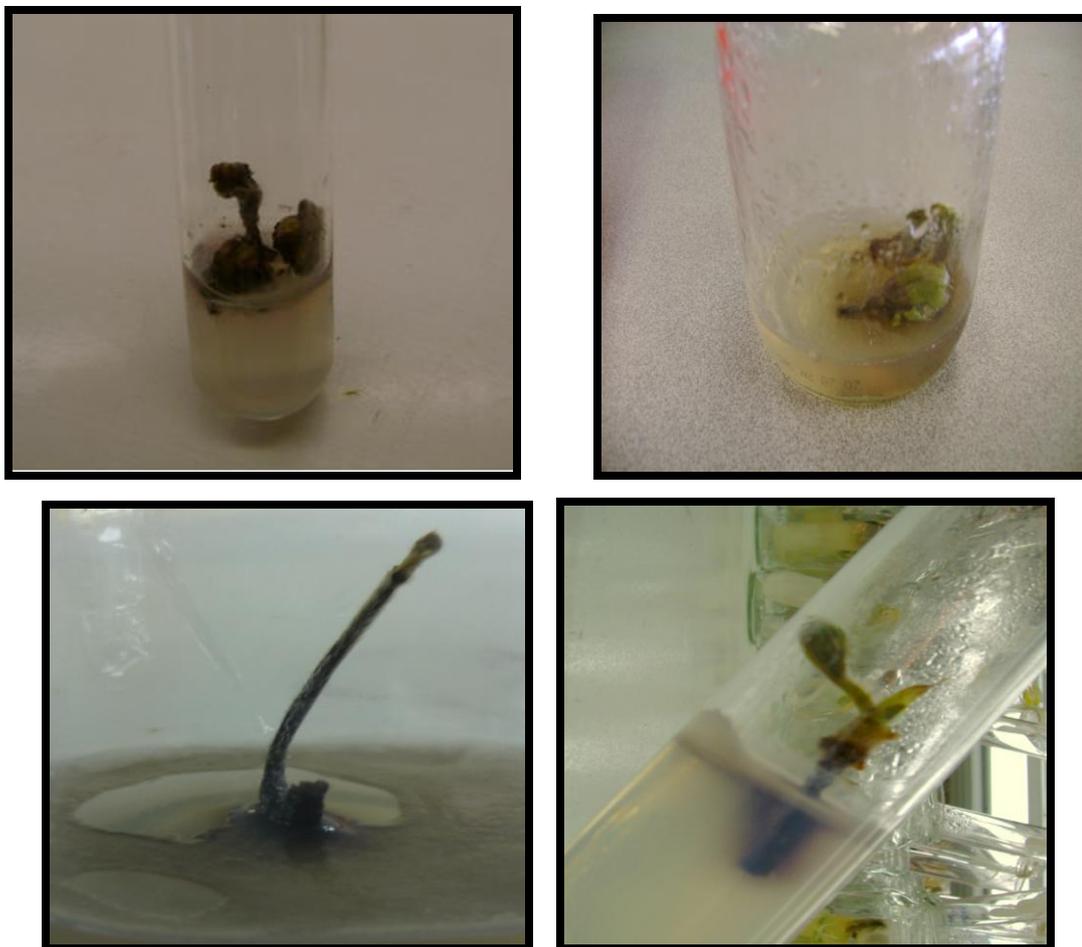


Figura 3.2 Explante contaminado con bacterias a los 5 días de realizada la siembra.

Debido a que los tratamientos de desinfección se realizaron con diferentes concentraciones de cloro, y varias fueron muy ofensivas para los explantes, es necesario tomar en cuenta los explantes necrosados por las altas concentraciones de cloro, en la tabla 3.2 se cuantifican los explantes necrosados.

TRATAMIENTO	NECROSADOS		
	M1	M2	M3
T1	1	0	0
T2	0	0	0
T3	0	0	0
T4	1	0	0
T5	0	1	0
T6	2	3	0
T7	5	4	3
T8	5	5	5
T9	5	5	5
	M1	M2	M3

Tabla 3.3 Cuantificación de explantes necrosados, donde de T1 a T9 representan a los tratamientos de desinfección y M1 a M3 los ensayos realizados

Los datos arrojados por los análisis determinan que los tratamientos T7 (1' de alcohol al 70% y 15' de cloro al 25%), T8 (1' de alcohol al 70% y 20' de cloro al 25%) y T9 (1' de alcohol al 70% y 25' de cloro al 25%) que provocan necrosis en los explantes. La figura 3.3 presenta los explantes necrosados con los diferentes tratamientos de desinfección.

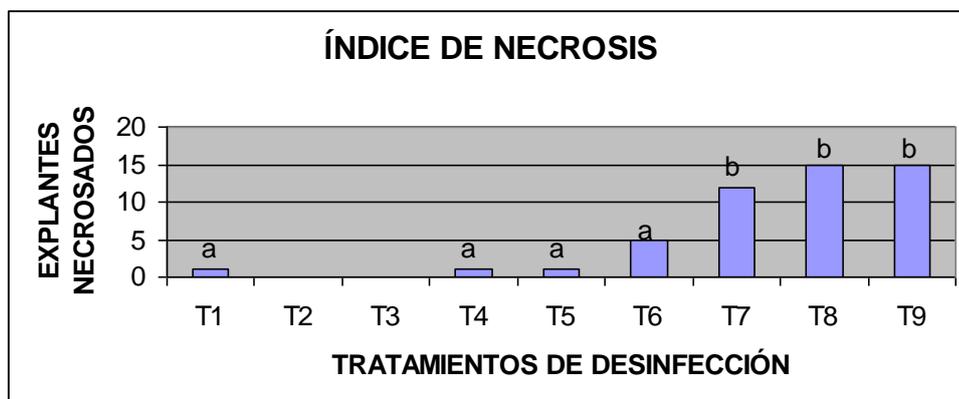


Figura 3.3 Evaluación de los 9 tratamientos de desinfección para determinar el índice de explantes necrosados, donde de T1 a T9 representan los

tratamientos de desinfección y los números representan los explantes necrosados

Los explantes necrosados pierden viabilidad y mueren rápidamente, perdiendo así el material vegetal sometido a los tratamientos con altas concentraciones de cloro (Figura 3.4).

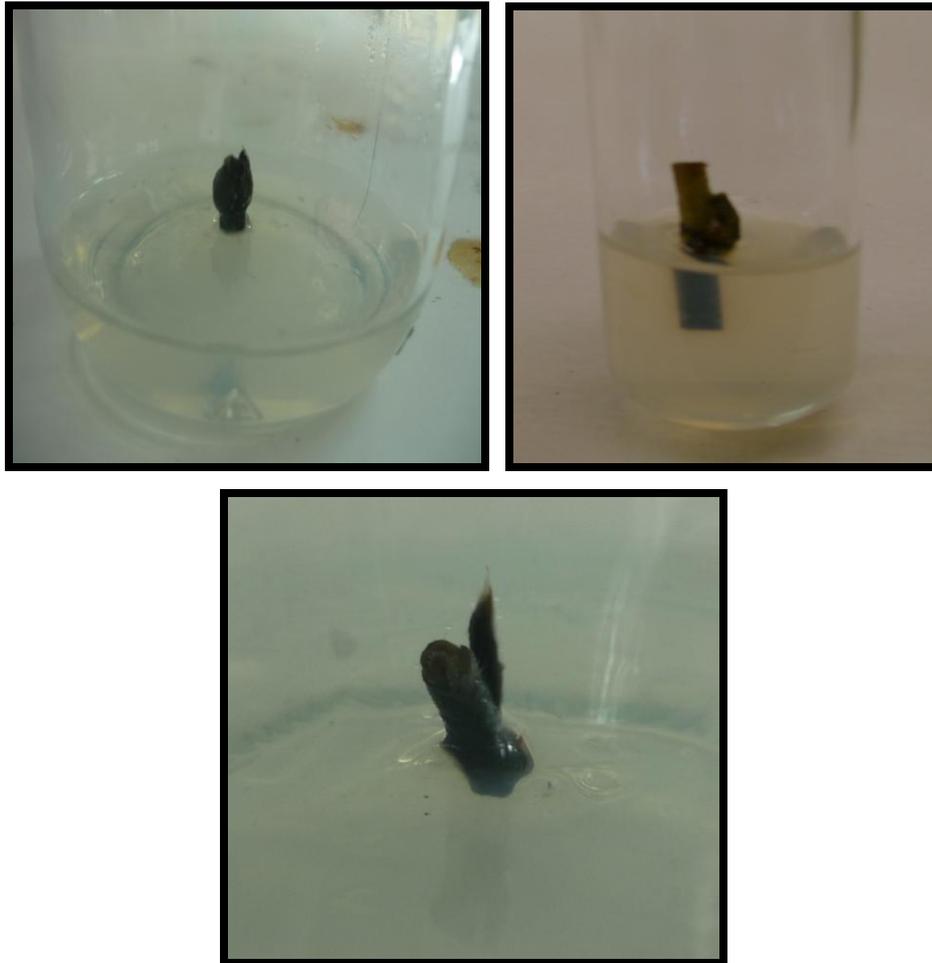


Figura 3.4 Explante necrosado por completo a los 7 días de realizada la siembra.

Es necesario tomar en cuenta el índice de viabilidad de los tratamientos (Anexo F), ya que las concentraciones de cloro y los tiempos de inmersión permitieron la desinfección óptima y la vitalidad necesaria para considerarlos viables (Figuras 3.6), en la tabla 3.3 se cuantifican los explantes viables.

TRATAMIENTO	VIABLES		
T1	1	1	0
T2	0	0	0
T3	0	0	1
T4	1	2	2
T5	4	3	4
T6	1	1	2
T7	0	1	2
T8	0	0	0
T9	0	0	0
	M1	M2	M3

Tabla 3.4 Cuantificación de explantes viables, donde de T1 a T9 representan a los tratamientos de desinfección y M1 a M3 los ensayos realizados

Al comparar los resultados de contaminación y viabilidad de los explantes se determinó que el mejor tratamiento para la desinfección conservando la viabilidad del explante es el tratamiento T5 (1' de alcohol al 70% y 20' de exposición a cloro al 20%) (Figura 3.5), teniendo, el 80% de desinfección y el 73.33% de sobrevivencia, presentando explantes vigorosos, de características óptimas para un crecimiento y futura multiplicación.

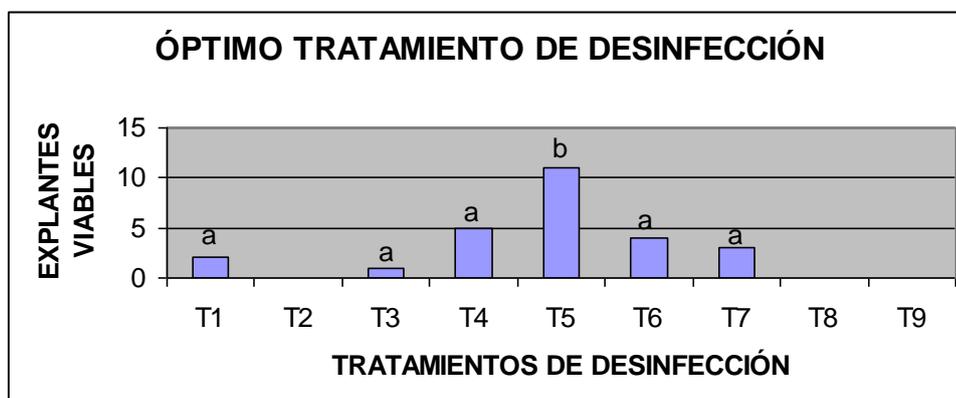


Figura 3.5 Evaluación de los 9 tratamientos de desinfección para determinar el tratamiento óptimo de desinfección, donde de T1 a T9 representan los tratamientos de desinfección y los números representan los explantes viables



Figuras 3.6 Explantes viables en la fase de desinfección, mismos que fueron usados para las fases siguientes debido a sus características como color y vitalidad.

3.6 Tratamiento con Cisteína

Al observar en el período de estabilización a los explantes, éstos presentaban problemas de oxidación, se realizó un tratamiento con cisteína a diferentes concentraciones. Se aplicó cisteína debido a que ésta actúa como un

removedor de quinonas (George y Sherrington, 1983) e impide la oxidación de los explantes. Cada tratamiento tuvo 5 unidades experimentales, y se realizaron 3 ensayos, donde se obtuvo los siguientes resultados (Tabla 3.5).

CISTEÍNA	EXPLANTES VIABLES		
	M1	M2	M3
0.20 mg/L	0	0	1
0.40 mg/L	4	3	4
0.60 mg/L	0	0	1
0.80 mg/L	1	1	1
1.00 mg/L	2	1	2
	M1	M2	M3

Tabla 3.5 Cuantificación de explantes libres de oxidación donde de M1 a M3 representan los ensayos realizados.

Se observa en la tabla 3.5 que el tratamiento de 0.4 mg/L de Cisteína presenta un menor número de explantes oxidados en los tres ensayos realizados.

Resultados que se corroboraron en un análisis de varianza (Tabla 3.6). En el que el F calculado (21.5) es mayor al F crítico (3.48), sabiendo así que por lo menos uno de los tratamientos es estadísticamente diferente.

Fuente de Varianza	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F
Entre grupos	22.93333333	4	5.73333333	21.5
Dentro de los grupos	2.66666667	10	0.26666667	
Total	25.6	14		
* F crítico 3.48				

Tabla 3.6 Análisis de varianza para la variable porcentaje de explantes oxidados en la fase de establecimiento del cultivo.

Al realizar el ensayo se determinó que el mejor tratamiento para evitar la oxidación de los explantes en el período de estabilización es el tratamiento T2 (0.4 mg/L de Cisteína) (Figura 3.8), ya que los explantes se mantienen libres de quinonas y su tejido es viable para las siguientes fases de la propagación *in*

in vitro, mismo que se realiza antes de proceder a la transferencia de los explantes al medio de cultivo, con la ayuda de una jeringuilla de 5 ml y un filtro 2 μm (Figura 3.7)

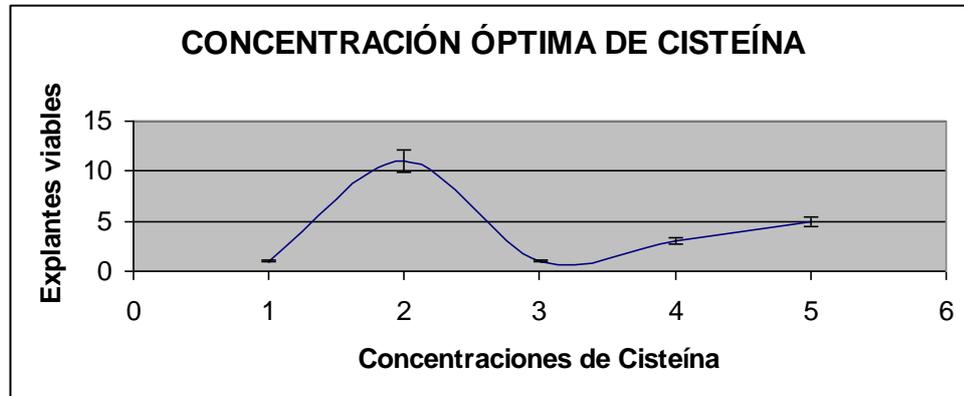


Figura 3.7 Concentración óptima de Cisteína en el período de estabilización, en la fase de desinfección, donde el eje en x representa las 5 concentraciones de cisteína.

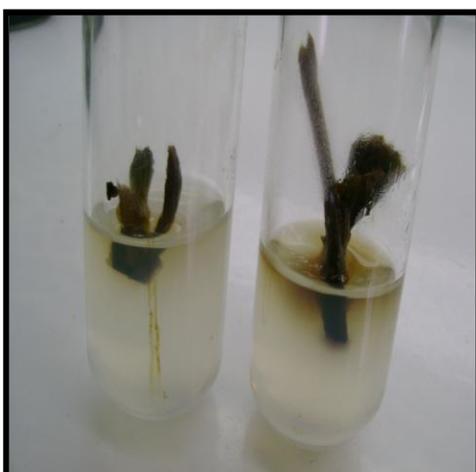


Figura 3.8 Comparación entre un explante libre de oxidación y un explante oxidado que provoca el cambio de coloración del medio de cultivo

3.7 Fase de multiplicación

En esta fase se pretendió obtener el mayor número de explantes viables y vigorosos, para así proceder a la multiplicación de los mismos (Figuras 3.9), por lo que se probaron 3 diferentes tratamientos con diferentes concentraciones de BAP, los mismos que demostraron que no existían diferencias significativas entre ellos, pero el tratamiento 3 que corresponde a 2.0 mg de BAP presentó mejores resultados (Tabla 3.7), sin embargo al observarlos en el laboratorio los explantes sometidos al tratamiento 3 de 2.0 mg de BAP tuvieron dificultad en enraizar, comparados con los explantes sometidos al tratamiento 2 de 1.5 mg de BAP.

Concentración de BAP	Explantes		
1.2 mg/L	1	1	2
1.5 mg/L	3	2	3
2.0 mg/L	4	3	5
	M1	M2	M3

Tabla 3.7 Cuantificación de explantes multiplicados, donde de M1 a M3 representan los ensayos realizados

Es necesario no sólo el óptimo crecimiento del explante sino un desarrollo de raíz para su futura aclimatación, por lo tanto se aplicó 2 tratamientos para inducir el crecimiento de raíz, el tratamiento 1 consistió de sales de Boxus a la mitad de su concentración, suplementado con 30 g/L sacarosa, 7.5 g/L agar, 4g/L de carbón activado y 1mg/L de IBA, mientras que el tratamiento 2 consistió en sales de Boxus a la mitad de su concentración, suplementado con 30 g/L sacarosa, 7.5 g/L agar, 2.5 mg/L de Pantotenato de Ca, 4g/L de carbón activado y 1mg/L de IBA, siendo éste el único en arrojar resultados positivos.



Figuras 3.9 Brotes producidos por el efecto inductor del BAP en la fase de multiplicación sin presencia de raíz



Figura 3.10 *Fragaria chiloensis* var. Huachi, con abundante presencia de raíces, antes de ser sembrada en el sustrato para el proceso de aclimatación

3.8 Fase de aclimatación en invernadero

El crecimiento de las plantas *in vitro* es diferente a su crecimiento normal, ya que en la tierra crecen horizontalmente, mientras que *in vitro* crecen verticalmente, presentando así tallos alargados y delgados (Figuras 3.11) por lo que con el poco material vegetal que se disponía se procedió a llevar a la aclimatación un número reducido de plantas, habiendo así un alto porcentaje de aclimatación.





Figuras 3.11 Proceso de aclimatación de vitroplantas de *Fragaria chiloensis* var. Huachi a condiciones de invernadero

DISCUSIÓN

El objetivo de esta investigación, fue la selección de un protocolo eficiente utilizando la técnica de cultivo *in vitro* para la producción de plantas de *Fragaria chiloensis* var *Huachi*. Esta planta se multiplica vegetativamente por enraizamiento de esquejes, pero se encuentra en peligro de extinción, por ello se ha desarrollado un protocolo para la rápida y eficiente propagación de esta especie.

4.5 Fase de establecimiento del cultivo

Para el cultivo *in vitro* de *Fragaria* los explantes pueden proceder de la corona o de los estolones, pero se facilita la extracción y la desinfección cuando el material vegetal se extrae de los estolones (Villegas, 1990).

La desinfección y el establecimiento *in vitro* de los explantes de *Fragaria chiloensis* var. *Huachi* presentó alta complejidad ya que se obtuvo un alto grado de oxidación en los tejidos de los explantes sembrados y una alta contaminación fúngica y bacteriana, como lo citan Villalobos y Pérez (1979), ésta contaminación se debe a la alta pubescencia de los tejidos de *Fragaria* y su contacto directo con el suelo, más aún cuando la planta madre es proveniente del campo, los contaminantes pueden producir la muerte del material vegetal e incluso tienen la capacidad de modificar el medio de cultivo (Mroginski y Roca, 1991).

Para evitar la contaminación existen varias técnicas a seguir, como el uso de antibióticos y fungicidas en la planta madre o en el medio de cultivo, sin embargo Pierik (1987), señala que el uso de antibióticos para controlar la contaminación bacteriana no es efectiva en la mayoría de casos.

El 43.7% de los explantes de *Fragaria* mostraron contaminación, principalmente por bacterias y hongos que empezaron a crecer en el medio de cultivo a partir del segundo día después de la inoculación. Esta alta tasa de

contaminación se puede atribuir a que la planta madre provino del campo directamente y su posición rastrera facilita el contacto con agentes patógenos (Villalobos y Pérez 1979), así como al mal manejo del material vegetal al momento de la desinfección.

Una de las mayores causas de pérdidas del cultivo *in vitro* es la existencia de bacterias endógenas en las plantas (Enjalric, *et al.*, 1998). Estas bacterias pueden aparecer en cualquier fase de cultivo, éstas se presentan en los medios de cultivo en pequeña porción y luego de permanecer en incubación por períodos prolongados (Krikorian, 1991).

Dentro de la evaluación de la contaminación, se apreció que a medida que la concentración de cloro y sus tiempos de inmersión aumentaban la contaminación disminuía, sin embargo, los tratamientos del 25% de concentración de cloro con 15, 20 y 25 minutos de inmersión, resultaron ser muy tóxicos para los explantes ya que el 99% de éstos murieron, se obtuvo los mejores resultados con el tratamiento T5 (1' de alcohol al 70% y 20' de cloro al 20%), al igual, en estudios similares como los realizados por Sánchez y Salaverría (2004) indican que la mejor concentración para la desinfección de tejido de fresa es 20% de concentración de cloro por 20 minutos de inmersión, sin embargo Dodds y Roberts (1985) utilizaron cloro para la desinfección de tejidos de fresa a una concentración del 10% , y Bhojwani y Razdan (1983) manifiestan que la mejor concentración de cloro para la desinfección es de 0.3 a 0.6 % durante 15 a 30 minutos de inmersión.

Autores como Villalobos y Pérez (1979) manifiestan que otro factor a ser tomado en cuenta para la desinfección de un tejido, es la pubescencia de la planta, misma que es mayor si la planta es proveniente del campo, y para tratarla señalan que debe realizarse un lavado previo en etanol al 70% durante 30 segundos para así romper la tensión artificial y de esta manera hacer la superficie más permeable para la acción de otros agentes desinfectantes.

Para la primera variable analizada, los resultados reflejaron diferencias significativas dando como respuesta que por lo menos uno de los tratamientos

es diferente, manteniendo así que los tratamientos 1, 2 y 3 presentan la mayor cantidad de explantes contaminados y el tratamiento 5 (20' de cloro al 20% de su concentración) reportó los datos más bajos en cuanto a contaminación.

Las concentraciones de cloro y sus tiempos de exposición son factores determinantes al momento de desarrollar un método de desinfección, se debe tener en cuenta el tipo de planta, el explante de la misma y los agentes químicos que se han de usar para la desinfección (Hurtado y Merino, 1988).

Al ser *Fragaria chiloensis* var. Huachi una especie en extinción es importante tomar en cuenta que no se deben aplicar tratamientos que necrosen o dañen el material vegetal, ya que es escaso el material vegetal por su estado de extinción.

Un problema dentro de la propagación *in vitro* es el efecto del empleo de agentes químicos como el alcohol y el cloro a diferentes concentraciones que pueden causar en las plantas el efecto de quemadura o necrosado, razón por la cual se analizó el porcentaje de explantes quemados.

El 36.3% de los explantes de *Fragaria* fueron necrosados por el efecto tóxico de los químicos. Problemas similares en cuanto a la quemadura de explantes se presentaron en el cultivo *in vitro* del Lirio con concentraciones al 3% de NaOCl y tiempos de 15 a 20 minutos (Rodríguez *et al.*, 1999) y (Villalobos, 1982).

La Tabla 3.2 indica que se reportaron diferencias significativas para el factor concentración de cloro. Esto demuestra que la concentración y el tiempo de exposición influyen en la necrosis de los tejidos vegetales. Cuando se aplicó los tratamientos a 25% (T7, T8, y T9) se presentó el 94% de necrosis en los tejidos vegetales.

Un agente de desinfección que facilita este proceso en los explantes es el alcohol, mismo que se usa en concentraciones al 70%, ya que al 90% deshidrata demasiado el material vegetal. Sin embargo, la exposición

prolongada es capaz de disolver la capa epicuticular, dañando así el tejido vegetal (Trujillo, 2004). Es suficiente 30 segundos de exposición del explante en alcohol al 70% para lograr eliminar las grasas de las hojas y permitir la penetración del agente desinfectante (Hurtado y Merino 1988). Pero este período de tiempo no es suficiente para matar todos los microorganismos, razón por la cual se debe combinar otro agente químico, en este caso el cloro, logra una eliminación completa de microorganismos.

Como se puede apreciar en la figura 3.5 la mayor presencia de explantes vivos se obtuvo en el tratamiento 5 (30 segundos el explante en alcohol y luego sumergirlo en cloro al 20% por 20 minutos).

4.5.1 Tratamiento con Cisteína

Se trató a los explantes con 5 diferentes concentraciones de Cisteína el análisis de datos según la Tabla 3.6 indican que hubo diferencias significativas, siendo el tratamiento 2 de 0.4 mg/L de Cisteína el que mejor resultados arrojó, ya que la cisteína actúa como un removedor de quinonas (George y Sherrington, 1983); además por ser un aminoácido pudo haber inducido un rápido desarrollo de los explantes al ofrecer el nitrógeno orgánico disponible para suplir sus requerimientos (Sánchez y Salaverría, 2004).

Por el contrario de lo manifestado por Davies y Creasy, citados por George y Sherrington (1984), la oxidación de fenoles se incrementa con la luz, siendo conveniente mantener los explantes en la oscuridad; sin embargo, para el presente ensayo se mantuvo a los explantes expuestos a luz las 24 horas obteniéndose resultados positivos, al igual que en el estudio realizado en fresa por Sánchez y Salaverría (2004) y Sánchez Cuevas (1984).

4.6 Fase de multiplicación

El número de brotes aumentó a medida que al medio de cultivo se le aumentaba la concentración del regulador de crecimiento BAP (citoquinina).

Las altas concentraciones de citoquininas actúan sobre la elongación de los brotes (Pérez, 1998); además como lo citan Saucedo *et al.*, (2007) los brotes juveniles *in vitro* pueden sintetizar una pequeña cantidad de citoquininas, pero ésta es insuficiente para inducir el crecimiento y desarrollo de los brotes y yemas, por lo tanto es necesario adicionar al medio este regulador de crecimiento a casi el 85% de los medios de cultivo empleados para la micropropagación (Pérez, 1998).

Skoog y Miller (1957), citan que un balance favorable a las citoquininas impulsa el desarrollo de los brotes foliares, al igual Amin y Jaiswal (1988) reportaron que el guayabo al ser suplementado con 1ppm de BAP aportó un efecto positivo para la brotación de yemas.

Las mejores respuestas de crecimiento se obtuvieron a una concentración de 2 mg de BAP y 0.5 mg de IBA, mientras que las que se sometieron al tratamiento 1.5 mg de BAP y 0.5 mg de IBA tenían un tamaño inferior pero en la fase de enraizamiento éstos explantes demostraron tener mayor velocidad para producir raíces. Al adicionar las citoquininas se debe tomar en cuenta también el balance con las auxinas, ya que éste determinará el coeficiente de multiplicación, pudiendo de éste modo alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de propagación (Evans y Bravo, 1985).

4.7 Fase de enraizamiento *in vitro*

Como lo menciona Pérez (1998), el rol de las auxinas en la iniciación de crecimiento de las raíces es fundamental.

Los explantes de *Fragaria* fueron sometidos a 2 tratamientos diferentes en los cuales solamente el tratamiento que contenía 2.5 mg/L de pantotenato de calcio y 4 g/L de carbón activado mostró resultados positivos, permitiendo así que la planta *in vitro* desarrolle y forme raíces que le permitan comenzar la

absorción de nutrientes al momento de ser transplantados a un sustrato autoclavado para aclimatarla.

4.8 Fase de aclimatación en invernadero

Todas las plántulas de *Fragaria* obtenidas *in vitro* se adaptaron a las nuevas condiciones de invernadero obteniendo un porcentaje de sobrevivencia del 100% al tratamiento de aclimatación propuesto, éstos resultados concuerdan con los obtenidos por Oliveira *et al.* (2000), en el cultivo *in vitro* de gerbera.

Como lo menciona Edwin (1993), las citoquininas recibidas en la fase de multiplicación estimulan la síntesis de proteínas, la maduración de protoplastos y retardan la senescencia de las hojas, al igual que Torrey (1976) en el estudio de plantas de *Xanthium* manifiesta que el efecto residual de la citoquininas mantuvo los niveles de proteína y clorofila, prolongando así la supervivencia de *Xanthium*.

El éxito de todo el proceso del cultivo *in vitro* se resume en la adaptación de las plántulas a nuevas condiciones en el invernadero, un alto número de plantas micropropagadas no sobreviven al paso desde el cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro* (Hurtado y Merino, 1988)

La humedad es un factor crítico en el momento del paso de ambiente *in vitro* a *ex vitro*, mismo que determinará la sobrevivencia de las plantas. Estas plántulas son más susceptibles ya que su capacidad de fotosintetizar no se encuentra al 100%, además de no poseer capa cerosa, ni cutícula (Ahuja, 1993).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- 5.1** En la fase de establecimiento del cultivo se presentó un alto nivel de contaminación fúngica y bacteriana en los explantes de *Fragaria chiloensis* var. Huachi generada por su procedencia de las plantas directamente del campo y el contacto directo de las mismas con el suelo, dificultó el proceso de obtención de un método de desinfección.
- 5.2** El tratamiento más adecuado y que arrojó el mayor número de explantes viables, y el menor número de explantes contaminados y oxidados, fue el tratamiento 5 (30" alcohol 70% + 20' cloro 20%), el cual fue óptimo para la desinfección de los explantes de *Fragaria chiloensis* var. Huachi, las concentraciones más altas de cloro y tiempos de inmersión provocaron necrosis en los tejidos.
- 5.3** El medio óptimo para obtener el mayor índice de propagación en la fase de multiplicación de *Fragaria chiloensis* var. Huachi fue sales minerales de Boxus (1962), suplementados con 30 g/L sacarosa, 7.5 g/L agar, 0.5 mg IBA y 0.8 mg de GA3 y 2.0 mg de BAP, que corresponde al tratamiento 3 dentro de la fase de propagación.
- 5.4** Se logró controlar la oxidación fenólica de *Fragaria chiloensis* var. Huachi con la adición de cisteína a la concentración de 0.4 mg/l, directamente al explante siendo éstos sometidos a luz continua.
- 5.5** Durante el proceso de aclimatación todas las plantas de *Fragaria chiloensis* var. Huachi sobrevivieron al trasplante desde las condiciones *in vitro* hacia las condiciones *ex vitro*.
- 5.6** Fue posible delinear metodologías eficaces para la micropropagación *in vitro* de *Fragaria chiloensis* var. Huachi.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

- 6.1** Al ser *Fragaria chiloensis* var. Hachi una planta rastrera y presentar problemas de contaminación, se recomienda sembrar las plantas madres en macetas con sustrato desinfectado y colocarlas sobre algún lugar alto, con el fin de evitar que la planta esté directamente en contacto con el piso y así reducir el nivel de contaminantes exógenos.
- 6.2** Debido al grave problema de oxidación en el proceso de determinar un método factible de propagación *in vitro* de *Fragaria chiloensis* var. Huachi se recomienda probar diferentes tratamientos y diferentes concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico o polivinilpirrolidona en presencia y ausencia de luz.
- 6.3** Se sugiere probar diferentes concentraciones de hormonas, ya que dentro del proceso y al pasar por las diferentes fases, la mayoría de plántulas presentaban raíces adventicias, así se eliminaría la fase de enraizamiento.
- 6.4** Dentro de la fase de aclimatación se recomienda probar diferentes tratamientos y concentraciones de los mismos, para así pretender reducir el tiempo necesario para la aclimatación.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja, M. (1993). Micropropagation. Micropropagation of wood plants. Ahuja, M. (eds). Netherlands: Kluwer Academia Publishers.
- Acosta-Solís, M. (1982). Científicos alemanes que han contribuido a la geografía e historia natural del Ecuador.
- Blackhall, N., Davey, M. y Power, J. (1994). Isolation, Culture and Regeneration of Protoplasts. En: Plant Cell Culture. Dixon, R. y González, R. (eds). IRL Press, Second Edition, Holanda. pp: 27-39.
- Boxus, Ph., Terzi, J. (1988). Control of accidental contamination during mass propagation. Acta Horticulturae 225: 189-191.
- Boxus, P.; M. Quoirin, y M. Iainé. (1977). Large Scale Propagation of Strawberry Plants from Tissue Culture. Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag. New York. P 131-206.
- Cabrera, A. y Willink, A. (1973). *Biogeografía de América Latina*. Monografía 13, Serie de Biología, OEA, Washington D.C.
- Cassells, A. (1991). Problems in tissue culture. Micropropagation: Technology and Application. Debergh, P. y Zimmerman, R. (eds). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp : 31-44.

- Chee, R. y Pool, R. (1982). The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultures in vitro. *Scientia Horticulture*. 16: 17-27.
- Devlin, R. (1980). Fisiología vegetal. Cultivo de tejidos vegetales. Hurtado, D. y Merino, M. (eds). Editorial Trillas, México. pp: 48-65.
- Dixon, R. (1986). Plant Cell Culture A Practical Aproch. Plant cell, tissue and organ culture. 54: 132-138.
- Doods, H. y Bouman, F. (1982). Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press, USA. pp: 305-323.
- Dodds, J. y Roberts, L. (1985). Experiments in Plant Tissue Culture. 2nd ed. Cambridge University Press. London. 232 p.
- Edwin, F. (1993). Components of culture media. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1f.g.edwin (ed.) Second Edition. Exegetics limited. N. Y. pp. 322-326.
- Enjalric, F., Carron, P. y Lardet, L. (1998). Contamination of primary cultura bin tropical areas: The case of *Heveabra siliensis*. *Acta Horticulturae*. 225: 57-66.

- Evans, D. y Bravo, J. (1985). Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. En: Tissue Culture as a Plant Production system for Horticultural Crops. Zimmerman R. H. (ed).: 73-91.
- Gautheret, R. (1983). Plant Tissue Culture: A History. Bot. Mag. Tokyo, no 96, pp. 393 - 410.
- George, E. y Sherrington, P. (1984). Plant and Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics. Eversley, Basingstoke, England. 109 p.
- Harling, G. (1979). Flora of Ecuador No. 10. Berlings. London.
- Hartmann, T. y Kester, V. (1995), Propagación de Plantas. CECOSA. México
- Hurtado, D. y Merino, M. (1988). Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, México. pp: 15-34.
- Izquierdo, H., Disotuar, R. y Quinones (2001), Effectivness of different chemical agents in the disinfection of *Allium sativum* L. to its in vitro implantation. Efectividad de diferentes agentes quimicos en la desinfeccion de (*Allium sativum* L.) para su implantacion in vitro; La Habana (Cuba),

- Jiménez, E. (1995). Propagación in vitro de la caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido). Tesis Doctoral. Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas (UCLV), Cuba.
- King, P. (1984). Induction and maintenance of cell suspension cultures. En: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vasil, I. (eds). Academic Press, USA. v 1, pp: 130-138.
- Kitto, S. (1997). Commercial Micropropagation. Hort Science. 32 (6): 1-3.
- Krikorian, A. (1991). Propagación clonal in vitro. Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Roca, W. y Mroginski, L. (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia. pp: 95-125.
- Kohlembach y Wernicke, (1978); Singha, (1985). Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. Z. Pflanzenphysiol 86:463-472.
- Lorz; Adams; Townsend y Shillito, (1983); Thompson, (1986). Improved protoplast culture and agarose media. Plant Cell Organ Culture 2:217-226
- Montes, C. y Córdoba, F. (2007), Supported Bimetallic Pd-Co Catalysts: Characterization and Catalytic Activity, Journal of Molecular Catalysis. A : Chemical, 228, 267

- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. 15: 473-497.
- Mroginski, L., Sansberro, P. y Flaschland, E. (2006). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. 42: 481-497.
- Oliveira, V., Gutiérrez, M., Gutiérrez, J. y Andrade, M. (2000). Cultivo *in vitro* de Gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro*12(3): 75-80.
- Orellana, P. (1995). Tecnología para la micropropagación in vitro de clones de Musa spp. Tesis Doctoral. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas (UCLV), Cuba.
- Pérez, E., Ramírez, R., Nuñez, H. y Ochoa, N. (1999). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Apoyado por el Fondo para la Modernización de la Educación Superior, FOMES, México. 12: 15-35.
- Pérez, J. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba 391 p.

- Pierik, R. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, España. pp: 15-18, 49-52, 67-80, 109-120.
- Redenbaugh, K. (1991). Applications of micropropagation to Agronomic Crops. Micropropagation: Technology and Application. Debergh, P. y Zimmerman, R. (eds). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp: 285-310.
- Reinert, (1956). Dissociation of Cultures from *Picea glauca* into Small Tissue Fragments and Single Cells. Science 16 March 1956: Vol. 123. no. 3194, pp. 457 – 458 DOI: 10.1126/science.123.3194.457
- Roca, W. y Mroginski, L. (1993). Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia. pp: 128-140.
- Romberger y Tabor, (1971); Bending, (1974); Lorz, (1983). The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. Agar and autoclaving effects. *Amer. J. Bot.* 58:131-140.
- Sánchez-Cuevas y Salaverría, (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in Vitro* de fresa. *Revista UDO Agrícola* 4 (1): 21 – 26.

- Saucedo, S., Ramos, L. y Reyes, T, (2007). Efecto de Reguladores de Crecimiento para la propagación *in vitro* de la Malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott), Ciencia y Tecnología 1: 17-21. 2008
- Skoog, F. y Miller C. (1975). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symposium Society Exposition Biological. 11: 118-131.
- Street, H. (1997). Plant tissue and cell culture. Academic Press, USA. pp: 1-10.
- Styer, D. y Chin, C. (1983). Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm conservation. Horticultural Reviews. 5: 221-227.
- Torres, K. (1997). Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Van Nostrand Reinhold Editorial, USA. pp: 285.
- Trujillo, R. (2004). Micropropagación: Fundamentos del cultivo de tejidos. Centro de Bioplasmas, Cuba. pp: 13-16.
- Villalobos, A. (1980). Plantas libres de virus. Ciencia y Desarrollo, CONACYT. 33: 35-49.

- Villalobos, A. (1982). Tissue culture applied to ornamental species. En: Micropropagation of selected root crop, ornamental species. Rome, J. (eds). pp: 155-164.
- Villalobos, A. y García, V. (1982). Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo in vitro de meristemas y ápices vegetativos. *Agrociencia*. 48: 107-118.
- Villalobos, A. y Thorpe, T. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones*. Roca, W. y Mroginski, L. (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia. pp: 970.
- Wareing, R. y Phillips, I. (1973). The control of growth and differentiation in plants. Pergamon Press, Reino Unido. pp: 256-270.
- Ziv, G. y Halevy, J. (1983). Tissue Culture: Applications and Limitations. *Plant Tissue Culture*. 21: 56-59.

