

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

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

**Establecimiento del cultivo *IN VITRO*
y aclimatación en invernadero de
nepeta hederacea variegata,
Tabacundo – Pedro Moncayo, 2006**

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

Cristina Alexandra Recalde Bastidas

SANGOLQUÍ, 18 DE JUNIO DEL 2007

AGRADECIMIENTOS

“Una actitud de agradecimiento tiene el poder de convertir las dificultades en oportunidades, los problemas en soluciones, las pérdidas en ganancias y además expande nuestra visión y nos permite descubrir todo aquello que era invisible para nosotros debido a nuestra actitud limitadora”

Louise L. Hay

Desde estas líneas quiero agradecer a todos aquellos que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo.

A Pierre Landázuri Wietts, asesor principal de mi tesis, por su valioso aporte en el diseño y elaboración del presente trabajo. Además por sus constantes sugerencias durante el desarrollo de la experimentación, pero sobretodo por su gran insistencia.

A la M.Sc. Mónica Jadán, directora de mi trabajo, por sus consejos, su ayuda y por el tiempo dedicado a este trabajo, pero sobretodo por su amistad y cariño.

Al Ing. Marco Taipe, codirector de mi tesis, por su acertada colaboración en la parte estadística de la investigación.

A la empresa Nuevo Sol Plantas Cía. Ltda. por su cortesía al dejarme utilizar las instalaciones del laboratorio e invernaderos para realizar este trabajo.

A todos aquellos que a lo largo de la realización de este trabajo me han ayudado compartiendo sus conocimientos y su experiencia.

A mi familia y amigos por estar a mi lado en todo momento y no perder la esperanza en mí.

A todos muchas gracias.

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. CRISTINA ALEXANDRA RECALDE BASTIDAS 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

Ing.Marco Taipe
Codirector de Tesis

REVISADO POR

M.Sc. Mónica Jadán
Coordinador de la carrera

DEDICATORIA

A mi familia, especialmente a mis padres y hermanos, quienes han estado a mi lado en todo momento.

A mis compañeros y amigos de la primera promoción de Ingenieros en Biotecnología, por todos los momentos compartidos, porque aunque el camino fue difícil todos supimos llegar a la meta.

Con mucho cariño para ustedes.

Cristina Recalde B.

GLOSARIO

ACLIMATACIÓN: adaptación de un ser vivo a un cambio climático o a nuevas condiciones de vida. Adaptación de las plantas cultivadas *in vitro* a las nuevas condiciones del ambiente exterior.

ADVENTICIO: estructura producida en una posición anormal o no común.

ÁPICE: extremo terminal de un órgano.

ASEPCIA: conjunto de métodos destinados a preservar de gérmenes infecciosos el material biológico, el instrumental y el equipo.

AUXINA: sustancia reguladora del crecimiento que tiene la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular y promover el enraizamiento.

AXÉNICO: cultivo que presenta únicamente un organismo. Cultivo puro.

AXILA: ángulo formado por la superficie adaxial de una rama u hoja y el tallo que la sostiene; en la axila de una hoja se pueden producir una o varias yemas axilares, y es señalado como el único sitio normal para el desarrollo de las yemas laterales.

BROTE: ápice aéreo vegetativo.

CALLO: tejido tumoral, no organizado, formado por células diferenciadas, que generalmente surge sobre heridas de órganos y tejidos diferenciados.

CÉLULAS EN SUSPENSIÓN: cultivo de células, tejidos u órganos sumergidos en un medio nutritivo líquido que requiere agitación.

CITOQUININA: sustancia reguladora del crecimiento que tiene la capacidad de estimular la división celular e inhibir el enraizamiento.

CLON: organismo genéticamente idéntico a su progenitor que ha sido producido por algún tipo de reproducción asexual. Población de células que descienden de una sola célula madre.

CULTIVO *IN VITRO*: cultivo de un explante bajo condiciones estériles, en un medio de composición química definida y que se incuba en condiciones ambientales controladas.

DIFERENCIACIÓN: fase de crecimiento durante la cual las células no especializadas se especializan en funciones particulares.

EMBRIOGÉNESIS: capacidad de las plantas con flores para producir embriones. No se reduce al desarrollo del huevo fertilizado, sino también puede ser inducido en cultivo de tejidos vegetales (embriogénesis somática).

ENDÓGENO: que se origina en tejidos internos del órgano.

ESQUEJE: brote separado de una planta que se utiliza para su propagación.

EXÓGENO: que se forma en el exterior de otro.

EXPLANTE: parte separada de un vegetal utilizado para iniciar el cultivo de tejidos, que puede ser hojas, raíces, anteras, brotes de yemas, embriones, segmentos de tallos, etc.

FOTOPERÍODO: número de horas de luz en cada ciclo de 24 horas; duración relativa del día y la noche (luz u oscuridad).

GIBERELINA: sustancia reguladora del crecimiento que estimula el alargamiento de las regiones subapicales y la elongación de los entrenudos.

HÍBRIDO: producto de dos padres genéticamente diferentes. Primera generación de la descendencia de una cruce entre dos individuos que difieren en uno o más genes.

IN VITRO: designa a los procesos biológicos o a las investigaciones que se realizan fuera de los organismos vivos, generalmente dentro de recipientes de vidrio.

MEDIO BÁSICO: medio de cultivo formulado con macro y micro nutrientes, sin reguladores de crecimiento.

MEDIO NUTRITIVO: medio de cultivo empleado para iniciar, desarrollar o enraizar diferentes inóculos, formado por macro y micro nutriente, azúcar y reguladores de crecimiento.

MERISTEMO: domo apical que se encuentra en el ápice de un brote o raíz.

NUDO: parte del tallo donde está o ha estado implantada una hoja o rama.

ORGANOGENÉISIS: formación de órganos a partir de células somáticas de los tejidos de los órganos aislados.

OXIDACIÓN FENÓLICA: producción de compuestos fenólicos cuando las plantas se exponen a situaciones de estrés.

PLANTA MADRE: planta que será utilizada para iniciar el cultivo *in vitro*.

PROLIFERACIÓN: crecimiento por multiplicación rápida de nuevas células.

PROPAGACIÓN VEGETATIVA: producción a partir de partes vegetativas. Se utilizan tejidos vegetales que conserven la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular para generar nuevos tallos y raíces a partir de cúmulos celulares presentes en diversos órganos.

PROTOPLASTO: célula vegetal desprovista de su pared celular.

REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL: compuestos orgánicos, distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

SUBCULTIVO: transferencia del inóculo a un medio de cultivo nuevo.

TOTIPOTENCIA CELULAR: capacidad de una célula vegetal de dar lugar al desarrollo de una planta completa.

VARIACION SOMACLONAL: son modificaciones genéticas en las células y los tejidos y que se caracterizan por la aparición de nuevos caracteres diferentes a los de las plantas madres debidos al cultivo *in vitro*.

VASTAGO: renuevo, rama tierna de un árbol o planta. Conjunto del tallo o eje caulinar y las hojas.

VITRIFICACIÓN: aparición de características atípicas en las plantas cultivadas *in vitro* a nivel anatómico, morfológico y fisiológico. Exceso de humedad en los tejidos de las hojas y tallos.

YEMA: pequeño abultamiento en el tallo de una planta que da origen a una rama, a una flor o a varias hojas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULOS

PÁGINAS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1	Formulación del problema.....	1
1.2	Justificación.....	2
1.3	Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1	Objetivo general.....	3
1.3.2	Objetivos específicos.....	3
1.4	Marco teórico.....	4
1.4.1	Características generales de <i>Nepeta hederacea variegata</i>	4
1.4.1.1	Descripción botánica.....	4
1.4.1.2	Distribución geográfica.....	5
1.4.1.3	Hábitat.....	6
1.4.1.4	Sustrato.....	6
1.4.1.5	Formas de propagación.....	6
1.4.1.6	Enfermedades de la planta.....	7
1.4.1.7	Importancia económica.....	7
1.4.2	Cultivo <i>in vitro</i>	8
1.4.3	Revisión histórica del cultivo <i>in vitro</i>	9
1.4.4	Ventajas y limitaciones del cultivo <i>in vitro</i>	12
1.4.5	Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	15
1.4.5.1	Etapa 0: Preparación y selección de plantas madres.....	16
1.4.5.2	Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico.....	16
1.4.5.3	Etapa II: Multiplicación.....	17
1.4.5.4	Etapa III: Enraizamiento y elongación.....	17
1.4.5.5	Etapa IV: Aclimatación.....	18
1.4.6	Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	19
1.4.6.1	Material vegetal.....	19
1.4.6.1.1	Planta madre.....	19
1.4.6.1.2	El explante.....	20
1.4.6.2	Factores físicos.....	20
1.4.6.3	Factores químicos.....	22
1.4.6.3.1	Sales inorgánicas.....	23
1.4.6.3.2	Carbohidratos.....	24
1.4.6.3.3	Vitaminas y aminoácidos.....	24

1.4.6.3.4	Agente gelificante.....	25
1.4.6.3.5	Reguladores de crecimiento vegetal.....	25
1.4.7	Principales problemas en el cultivo <i>in vitro</i>	29
1.4.7.1	Contaminación.....	29
1.4.7.2	Oxidación fenólica.....	30
1.4.7.3	Vitrificación.....	30
1.4.7.4	Variación somaclonal.....	30
1.4.8	Métodos de propagación <i>in vitro</i>	30
1.4.8.1	Cultivo de segmentos nodales.....	31
1.4.8.2	Cultivo de yemas axilares.....	32
1.5	Hipótesis.....	32
1.5.1	Hipótesis alternativa.....	32
1.5.2	Hipótesis nula.....	32

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Localización del ensayo.....	33
2.2	Condiciones de cultivo.....	33
2.2.1	Plantas donantes o madres.....	33
2.2.2	Plantas <i>in vitro</i> (cuarto de cultivo).....	33
2.2.3	Plantas en invernadero (área de aclimatación).....	34
2.3	Fase de establecimiento del cultivo.....	35
2.3.1	Selección del material vegetal.....	35
2.3.2	Desinfección del material vegetal.....	35
2.3.3	Inoculación del material vegetal.....	36
2.4	Fase de multiplicación.....	36
2.5	Fase de enraizamiento <i>in vitro</i>	37
2.6	Fase de aclimatación en invernadero.....	38
2.7	Análisis estadístico.....	38

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1	Fase de establecimiento del cultivo.....	41
3.1.1	Porcentaje de explantes contaminados.....	41
3.1.2	Porcentaje de explantes quemados.....	43

3.1.3	Número de explantes sanos.....	46
3.2	Fase de multiplicación.....	47
3.2.1	Índice de propagación.....	47
3.2.2	Porcentaje de presencia de raíz.....	49
3.3	Fase de aclimatación en invernadero.....	50
3.3.1	Porcentaje de sobrevivencia.....	50
3.3.2	Altura de la planta.....	50
3.3.3	Formación de raíz.....	51

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1	Fase de establecimiento del cultivo.....	54
4.1.1	Porcentaje de explantes contaminados.....	54
4.1.2	Porcentaje de explantes quemados.....	56
4.1.3	Número de explantes sanos.....	57
4.2	Fase de multiplicación.....	57
4.2.1	Índice de propagación.....	57
4.2.2	Porcentaje de presencia de raíz.....	59
4.3	Fase de enraizamiento <i>in vitro</i>	59
4.4	Fase de aclimatación en invernadero.....	61
4.4.1	Porcentaje de sobrevivencia.....	61
4.4.2	Altura de la planta.....	62
4.4.3	Formación de raíz.....	62

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....63

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....65

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....67

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.6 Formulación del problema

En un mercado de novedades como el de las flores y de las plantas ornamentales, en el que constantemente se están desarrollando y ofreciendo nuevos productos, es importante la aplicación de técnicas de propagación que permitan generar productos nuevos y homogéneos de la forma más rápida posible.

La propagación vegetativa o asexual permite producir plantas que poseen el mismo genotipo que la planta madre, lo que es posible gracias a que todas las células de una planta poseen la información necesaria y/o suficiente para reproducirla completamente. Esta capacidad se denomina totipotencia celular.

Entre los métodos de propagación vegetativa más utilizados en las plantas, se encuentran los métodos de propagación por esquejes, injertos y últimamente el método de cultivo *in vitro*. La elección del método de propagación dependerá de la velocidad con la que las nuevas plantas se desarrollen, el costo de la producción y la calidad del producto final.

El cultivo *in vitro* ha revolucionado la producción agrícola en los últimos años, ya que gracias a esta técnica se pueden generar clones de variedades élite en grandes cantidades y en un tiempo menor, con un conjunto de beneficios adicionales respecto a la propagación tradicional. Además, esta técnica permite producir plantas durante todo el año, independientemente del factor climático (temperatura, luz, humedad) porque las condiciones de laboratorio en las que se realizan pueden ser controladas según la necesidad del cultivo. Este procedimiento también permite obtener plantas libres de enfermedades y patógenos, incluso libres de virus y de esta forma obtener

plantas certificadas a nivel internacional para la exportación, que cumplan con todas las normas fitosanitarias requeridas.

Actualmente se piensa que el cultivo *in vitro* es práctico sólo para la propagación de aquellos cultivos que son difíciles de reproducir por los métodos convencionales, y no es sólo esto. La micropropagación es beneficiosa para este tipo de cultivos y además para aquellos que son fáciles de propagar por métodos convencionales pero que con el cultivo *in vitro* adquieren algunas características que los hacen ventajosos. Las plantas con estas características adquieren un alto valor en el mercado y son altamente demandadas a pesar de su costo.

1.7 Justificación

Nepeta (*Nepeta hederacea variegata*) es una planta ornamental perteneciente a la familia de las *Lamiaceae* que tiene un alto valor comercial especialmente en los países del Reino Unido y Estados Unidos por su profuso follaje, sus vistosas flores y por la posibilidad de poder adaptarlo como planta de maceta o como cubresuelos.

Esta planta se propaga tradicionalmente por esquejes en los invernaderos de la empresa, pero con esta técnica se presenta un alto porcentaje de contaminación tanto bacteriana como fúngica; es por esta razón, que el presente proyecto propone una alternativa para propagar *in vitro* plantas de *Nepeta hederacea variegata* que cumplan con un mejor estado fitosanitario y de esta forma generar clones de variedades élite garantizando un nivel de rejuvenecimiento y vigorosidad.

Por otro lado, esta variedad es de gran importancia comercial para la empresa por ser una de las más representativas económicamente dentro de las exportaciones (el 20% de las exportaciones totales se le atribuye a nepeta). Anualmente se exportan 150.000 esquejes enraizados y más de 40.000 sin enraizar de esta variedad. Además esta planta es única en su género y especie dentro de los invernaderos de la empresa, por lo que es importante, cuidar y mantener su germoplasma para asegurar así su producción durante todo el

año, razón por la cual se propone la producción mediante la técnica de cultivo *in vitro*.

La información disponible sobre la multiplicación *in vitro* de nepeta es limitada (Hutchings y Price, 1999). Debido a ello, es altamente deseable disponer de un método de propagación a gran escala y bajo condiciones controladas. El mismo permitirá la obtención de plántulas durante todo el año que podrán ser utilizadas como material élite para la producción de plantas madres y su subsecuente producción de esquejes.

En esta investigación se presenta el desarrollo de un protocolo de multiplicación *in vitro*, de fácil aplicación, para la variedad propuesta.

Además, el conocimiento que puede entregar el presente trabajo de investigación con respecto al comportamiento de diversas variables como: hormonas, nutrientes, medios y factores externos, puede llevar también, a establecer metodologías de micropropagación para diferentes especies vegetales. Además, la información que se obtendrá de los resultados del proyecto, servirá para apoyar la idea de que todo cultivo que tiene importancia económica puede ser producido en el laboratorio, a través de la técnica de cultivo *in vitro* y que estos resultados pueden servir de referencia para otros cultivos de interés.

1.8 Objetivos de la investigación

1.8.1 Objetivo general:

- Establecer el protocolo de cultivo *in vitro* para la variedad *Nepeta hederacea variegata* y lograr su aclimatación en invernadero.

1.8.2 Objetivos específicos:

- Introducir *in vitro* yemas, utilizadas como explantes, de la variedad *Nepeta hederacea variegata*, utilizando diferentes protocolos de desinfección con el fin de obtener una vitroplanta aparentemente libre de contaminantes exógenos.

- Establecer el protocolo óptimo de multiplicación *in vitro* para la variedad *Nepeta hederacea variegata* con el fin de obtener el mayor índice de propagación.
- Determinar las concentraciones óptimas de hormonas para inducir el enraizamiento y fortalecimiento *in vitro* previo al paso de la vitroplanta a la fase de aclimatación.
- Aclimatar vitroplantas de *Nepeta hederacea variegata* en invernadero.

1.9 Marco teórico

1.9.1 Características generales de *Nepeta hederacea variegata*

1.9.1.1 Descripción botánica

Nepeta es un género de plantas florecientes (angiospermas) pertenecientes a la familia *Lamiaceae*, originaria de Europa y del sur oeste de Asia, pero actualmente introducida en Norte América. Su profuso follaje, sus vistosas flores y la posibilidad de poder adaptarlo como cubresuelos en los jardines, le otorgan un considerable valor como planta ornamental (Hutchings y Price, 1999). En la Tabla 1.1 se indica la clasificación científica de *Nepeta hederacea variegata*.

Tabla 1.1 Clasificación científica de *Nepeta hederacea variegata*

Clasificación científica	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Labiales
Familia:	Lamiaceae
Género:	<i>Nepeta</i>
Especie:	<i>N. hederacea</i>
Variedad:	variegata

Los miembros de este grupo de plantas también son conocidos como catnips, catmints o menta de los gatos porque inducen un estado delirante, estimulante en felinos (Hutchings y Price, 1999). Su olor y sabor son parecidos a los de la menta y sus hojas y flores se usan con fines medicinales (Chevallier, 1996).

La familia *Lamiaceae*, antes llamada Labiadas, está representada por 3000 especies distribuidas por todo el mundo, y particularmente en la región mediterránea. Son hierbas perennes, algunos subarbustos y raramente árboles o trepadoras, que contienen aceites esenciales en todas las partes de la planta (Bouman y Meeuse, 1992). El nombre original de esta familia era labiadas debido a la peculiar forma de la flor, 5 pétalos fusionados en forma de boca con un labio superior, generalmente bilobulado y más corto, y uno inferior, trilobulado, los 5 sépalos también están unidos. Las flores son bisexuales y surgen en ramilletes terminales de 5 ó 6 (a veces más o menos) florecillas cada uno. Los tallos son generalmente cuadrangulares con hojas aovadas, opuestas y decusadas. Incluye varias especies muy utilizadas como condimento en alimentación, como la menta, albahaca, orégano o la nepeta (Lawrence, 1992).

Botánicamente las plantas del género *Nepeta* están formadas por plantas aromáticas, herbáceas y perennes. El aparato vegetativo está caracterizado por el tallo de forma cuadrangular, debido a la presencia de engrosamientos de colénquima en los ángulos; las hojas que son opuestas se caracterizan por ser festonadas, perennes y peludas, además presentan glándulas con aceites volátiles de aromas característicos. Es una especie de tamaño variable que está influenciado por condiciones ambientales, crece desde 5cm. hasta 50cm. de alto. Las flores son bilaterales simétricas, en forma de embudo, de colores azul, violeta y lavanda, que crecen en racimos opuestos de 2 a 3 flores. Florece generalmente en primavera. El fruto es en pequeña semilla (Bouman y Meeuse, 1992).

1.9.1.2 Distribución geográfica

Los miembros de la familia *Lamiaceae* se distribuyen por todo el mundo encontrándose particularmente en la zona del Mediterráneo, que representa el

principal centro de diferenciación de la familia (Bouman y Meeuse, 1992). En lo que se refiere al género *Nepeta*, es nativo de las Islas Británicas encontrándose desde zonas frías hasta zonas tropicales: Europa, noreste de Asia, Japón, Nueva Zelanda, Norte América, Centro América y actualmente Suramérica (Grime *et al.*, 1988).

1.9.1.3 Hábitat

Esta planta generalmente se halla en los lugares sombríos y húmedos, entre las ruinas, los muros y los bosques; aunque también tolera el sol muy bien. Es una planta rastrera muy común en jardines usada como cubresuelo que puede reemplazar exitosamente al césped por la belleza de su follaje y su olor característico muy llamativo para los gatos (Hutchings y Price, 1999).

1.9.1.4 Sustrato

El género *Nepeta* responde bien en suelos húmedos y calcáreos. El pH óptimo debe ser levemente ácido a levemente alcalino (pH 5.5 – 5.7), aunque también crece en suelos con un pH bajo (pH 4.0) (Grime *et al.*, 1988). El mejor sustrato que se ha reportado son suelos no salinos y muy porosos; los suelos con arcilla han dado muy buenos resultados (Grime *et al.*, 1981). Kreutzer y Seibert (1984) y Sinker *et al.* (1985) afirman que el mejor sustrato para el cultivo de *Nepeta* es un suelo rico en nitratos y fosfatos con un moderado suplemento de cationes incluyendo Ca^{2+} .

1.9.1.5 Formas de propagación

Comercialmente la variedad *Nepeta hederacea variegata* se produce de forma tradicional mediante esquejes, aunque también se puede propagar a partir de semillas.

Los cultivares reproducidos vegetativamente, mediante esqueje, pueden ser diploides o tetraploides y este tipo de multiplicación permite mantener las características ornamentales de interés. Sin embargo, este tipo de producción requiere mucha mano de obra, mantener en el invernadero un gran número de plantas madres y, además, la recolección de esquejes puede causar la transmisión de virus, bacterias y hongos de una planta a otra

(Marsolais *et al.*, 1991). Estos patógenos se transmiten mediante los esquejes infectados, a través del medio de enraizamiento, las tijeras de podar, el riego, el contacto físico directo y por insectos. Por este motivo es importante adquirir el material vegetal de plantas madres sanas que pueden ser obtenidas y garantizadas mediante *cultivo in vitro*.

En conclusión, los métodos de producción más utilizados para el género *Nepeta* son: la producción de plantas directamente a partir de esquejes de cultivares conocidos enraizados o no, cultivo de esquejes de plantas sanas que se utilizan como plantas madres y de las cuales se toman esquejes para la producción, cultivo *in vitro* o propagación a partir de semillas.

1.9.1.6 Enfermedades de la planta

Las pérdidas masivas que se producen en los cultivos del género *Nepeta* son ocasionadas por bacterias y hongos. Según Ellis y Ellis (1985), dos expertos británicos, cuatro hongos parásitos han sido encontrados en estas plantas: *Puccinia glechomatis* DC., *Erysiphe galeopsidis*, *Ramularia calcea* y *Leptostroma glechomatis*, todos estos hongos infectan las hojas de las plantas, produciendo manchas como el minador en las hojas. Estos organismos también bloquean el tejido conductivo y hacen que la traslocación de agua y nutrientes sea prácticamente imposible (Ellis y Ellis, 1985).

La multiplicación *in vitro* de las plantas de *Nepeta* sería una alternativa muy llamativa para evitar problemas de contaminación con este tipo de microorganismos. Aun cuando la propagación vegetativa ha sido la forma de multiplicación tradicional de esta especie, este método no ha eliminado los patógenos que la atacan. La información disponible sobre la multiplicación *in vitro* de *Nepeta* es limitada. Debido a ello, es deseable disponer de un método para multiplicarla bajo condiciones controladas e higiénicas a gran escala.

1.9.1.7 Importancia económica

El género *Nepeta* es un cultivo muy popular sobre todo en Europa y en el norte de América (Hutchings y Price, 1999). Es uno de los principales

cultivos ornamentales a nivel europeo utilizado como cubresuelos en casi todos los jardines.

La evolución del mercado en los últimos diez años se encuentra en un constante crecimiento del 5% anual. El 95% de la producción se destina al mercado nacional, mientras que el 5% restante se destina a la exportación, básicamente a Holanda (Hutchings y Price, 1999).

Además de ser usado como ornamental, la *Nepeta* es también utilizada como planta medicinal. Es un excelente expectorante y antiséptico. Se utiliza en afecciones respiratorias: bronquitis, catarros, etc. En uso externo en caso de heridas (Mascolo *et al.*, 1987).

Con fines medicinales se recoge la hierba con flor, sin raíces y se seca a una temperatura no superior a los 35 °C. Contiene principios amargos, taninos, vitamina C, minerales (sobre todo potasio) y aceites esenciales (Zieba, 1973).

Se utiliza mucho en infusiones porque tiene propiedades expectorantes y antiasmáticas. También se utiliza para estimular el apetito y para mejorar los intercambios metabólicos. Las hojas frescas se consumen en ensalada.

Externamente se utiliza en gargarismos para combatir inflamaciones de garganta y para cubrir las heridas por sus propiedades antisépticas (Stahl y Datta, 1972).

Contiene un principio amargo, la marrubina que es una lactona diterpénica semejante a la del manrubio, pero aquí está en menor cantidad. También posee trazas de aceite esencial, colina, taninos y ácidos-fenoles (cafeíco, clorogénico, etc.) (Henry *et al.*, 1987).

1.9.2 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se define como el cultivo de un explante (parte aislada de la planta, que puede ser células, tejidos, órganos o

protoplastos) bajo condiciones estériles, en un medio artificial de composición química definida y que se incuba en condiciones ambientales controladas (temperatura, luz y humedad) (Mroginski *et al.*, 2006). Así, se cultiva una determinada parte de la planta original, se induce la formación de brotes, se multiplican, se enraizan, y las plantas o brotes obtenidos se someten a un proceso de aclimatación para adaptarlas de nuevo a las condiciones *in vivo* (Estopá, 2005). El nombre de cultivo *in vitro* proviene del hecho de que todo cultivo se realiza habitualmente en recipientes de vidrio, aunque actualmente también se utilizan otros materiales como el polipropileno (Qureshi y Saxena, 1992).

Esta técnica 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). De esta forma se obtiene la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original (clones) a partir de cualquier parte aislada de la planta.

Las principales aplicaciones del cultivo *in vitro* se basan en la propagación masiva, obtención de plantas libres de patógenos, la conservación de germoplasma, el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones, la hibridación somática, la introducción de nuevas características en las plantas mediante ingeniería genética y la propagación masiva de plantas (Alonso, 2002).

El cultivo de tejidos es una alternativa importante a la propagación de plantas convencional. Esta técnica puede abordarse cuando los métodos convencionales no son factibles debido a dificultades técnicas, tiempo de multiplicación muy largo, y/o costo de producción elevado (Alonso, 2002).

1.9.3 Revisión histórica del cultivo *in vitro*

La historia del cultivo de tejidos vegetales se remonta a los años 1800, cuando Schwann y Schleiden introdujeron el concepto fundamental de la totipotencia, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas de cultivo *in vitro*. (Gautheret, 1983).

Los primeros intentos de cultivar *in vitro* células de tejidos vegetales empezaron en el año 1902, cuando Haberlandt intentó cultivar células aisladas de plantas. Desafortunadamente sus trabajos no fueron exitosos debido a que utilizó un medio de cultivo relativamente simple y por otra parte, tejidos vegetales demasiado diferenciados (Street, 1997).

White (1989) logró el primer cultivo *in vitro* estable utilizando en sus experimentos ápices de raíces de tomate. Los tejidos meristemáticos del ápice radical propiciaron crecimiento en longitud de los mismos en el medio de cultivo. El logro de White dio un buen impulso al desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro*; sin embargo en sus trabajos realizados hasta entonces no obtuvo proliferación celular en forma, los ápices de raíz solo crecieron en longitud como lo harían normalmente como parte de la raíz de la planta intacta. (Doods y Bouman, 1982).

Desde 1934 hasta 1939, Gautheret, Nobecourt y White, desarrollaron trabajos de investigación cultivando puntas de raíz de tomate y zanahoria utilizando medios de cultivo enriquecidos con vitaminas, azúcares y extracto de levadura. Gautheret (1983) logró proliferación celular *in vitro* en tejidos cambiales provenientes de plantas adultas, Gautheret, Nobecourt (1939) en tejidos de zanahoria y White (1939) en tejidos de tabaco (Dixon, 1986).

Un factor importante en el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, fue el descubrimiento de los reguladores de crecimiento. Overbeek (1941) observó el efecto de una sustancia presente en el agua de coco que estimulaba la división celular (efecto citocinínico). Cuando el agua de coco se combinó con 2,4-D, tuvo un efecto positivo en el desarrollo de tejidos de zanahoria y papa (Doods y Bouman, 1982).

En los años 50`s ocurrieron importantes descubrimientos, como el de Morel y Martin (1952) quienes fueron los primeros investigadores que lograron obtener plantas libres de virus en dalia a partir de meristemas apicales (Hurtado y Merino, 1988). Skoog (1955) identificó un compuesto de naturaleza purínica denominado 6- furfural-aminopurina o Kinetina, observando la habilidad

de este regulador de crecimiento vegetal para iniciar la división celular (George, 1993). Skoog y Miller (1975), usando combinaciones de auxinas y citoquininas, controlaron más detalladamente la formación de brotes y raíces en cultivos de callos de tabaco. Muir (1958), reportó que fragmentos de tejidos desorganizados (callos) de tabaco cultivados en medio líquido daban origen a células en suspensión (Hurtado y Merino, 1988).

En lo que a protoplastos se refiere, Cocking (1960) logró remover la pared de la célula vegetal empleando una enzima fúngica (celulasa) para dar origen a los protoplastos (Blackhall *et al.*, 1994).

Murashige y Skoog (1962) desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco (Murashige, 1974). En la actualidad, las sales inorgánicas de este medio de cultivo se usan con bastante éxito en casi todas las especies.

En 1965 se creó el primer laboratorio comercial de propagación masiva de vitroplantas (Debergh y Zimmerman, 1991).

Durante los años 70`s se realizaron un gran número de investigaciones enfocadas a estudios de embriogénesis y organogénesis fundamentalmente. En estos años se publicaron gran número de artículos sobre hibridación somática mediante el uso del aislamiento y cultivo de protoplastos, obtención de haploides, cultivo y aislamiento de microesporas, estudios de polinización y fertilización *in vitro*, estudios fitopatológicos y producción de metabolitos secundarios (Hurtado y Merino, 1988).

En el período comprendido entre los años 80`s la mayoría de trabajos se enfocaron hacia estudios de mutagénesis, morfogénesis, embriogénesis, citogénesis e histogénesis; además, se dio una particular importancia a la detección, identificación, síntesis y producción de metabolitos secundarios, así como al uso de técnicas para la selección y mejoramiento de las plantas (Hurtado y Merino, 1988). También se encontraron trabajos de propagación, aunque en menor número que en los años anteriores (Debergh y Zimmerman,

1991). Durante estos años se dio bastante importancia a lo relacionado con los aspectos legales del cultivo de tejidos vegetales y sus patentes (George, 1993).

En 1990 los primeros países productores de vitroplantas eran los Estados Unidos y Holanda (Debergh y Zimmerman, 1991). En 1994 la producción mundial de vitroplantas se estimó que era aproximadamente de 500 millones de unidades en más de 550 laboratorios, concentrados mayoritariamente en Europa Occidental, Norteamérica, Israel y en los denominados países de Europa del Este (Arias, 1996). América Latina es después de África la región que menos vitroplantas produce. En 1998 se reportaron 404 instalaciones de las cuales más de 150 se estima que se dedican a la propagación de plantas, con estimado de producción de alrededor de 39 millones de USD, sin incluir Cuba (REDBIO, 1998).

La proyección del mercado mundial de vitroplantas para los años comprendidos entre el 2000 y el 2010, ascenderá a 6000 millones de USD, concentrándose principalmente en vitroplantas de ornamentales y flores (Kitto, 1997). Las producciones actuales indican que de las plantas agrícolas (no más del 5% del total de especies), los plátanos y la papa han sido los más propagados (Orellana, 1995); mientras que en los cultivos agroindustriales, la caña de azúcar y la palma de aceite ocupan los primeros lugares (Redenbaugh, 1991 y Jiménez, 1995).

1.9.4 Ventajas y limitaciones del cultivo *in vitro*

La técnica del cultivo *in vitro* presenta grandes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, algunas de las cuales se citan a continuación (Pierik, 1990; Gebhard *et al.*, 1983; Murashige, 1974):

- La multiplicación *in vitro* es más rápida que la multiplicación *in vivo*.
- Es posible propagar especies *in vitro*, que no pueden ser multiplicadas *in vivo*; esto es posible en muchos casos debido al fenómeno del rejuvenecimiento, que sólo es posible realizarlo *in vitro*.

- Utilizando el cultivo *in vitro* es posible, en principio, conseguir una multiplicación libre de enfermedades, bien por una rigurosa selección del material inicial, o bien liberando el material inicial de enfermedades.
- Es posible multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie considerablemente reducida.
- Debido a la existencia de condiciones perfectamente controladas (medio nutritivo y medio físico), que permiten una gran precisión en la producción, se puede eliminar el efecto estacional y conseguir una producción homogénea a lo largo del año.
- Por medio del cultivo *in vitro* es frecuentemente posible llegar a obtener pequeños clones de forma rápida, que pueden luego utilizarse como parentales para la producción de híbridos (F1).
- El cultivo *in vitro* es especialmente útil para el establecimiento de bancos de genes (el material se almacena libre de enfermedades a bajas temperaturas).
- Con respecto al aislamiento y cultivo de protoplastos, esta técnica permite la transferencia de una cantidad limitada de información genética de una especie a otra, a diferencia de la mejora genética tradicional, con el fin de obtener híbridos somáticos interespecíficos e intergenéricos (Blackhall *et al.*, 1994).
- Frente a otros sistemas de propagación, la embriogénesis somática permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente (Lindsey y Topping 1993).

Con todas estas ventajas, parecería totalmente idóneo aplicar el cultivo *in vitro* a las especies vegetales; sin embargo, en algunas ocasiones el cultivo

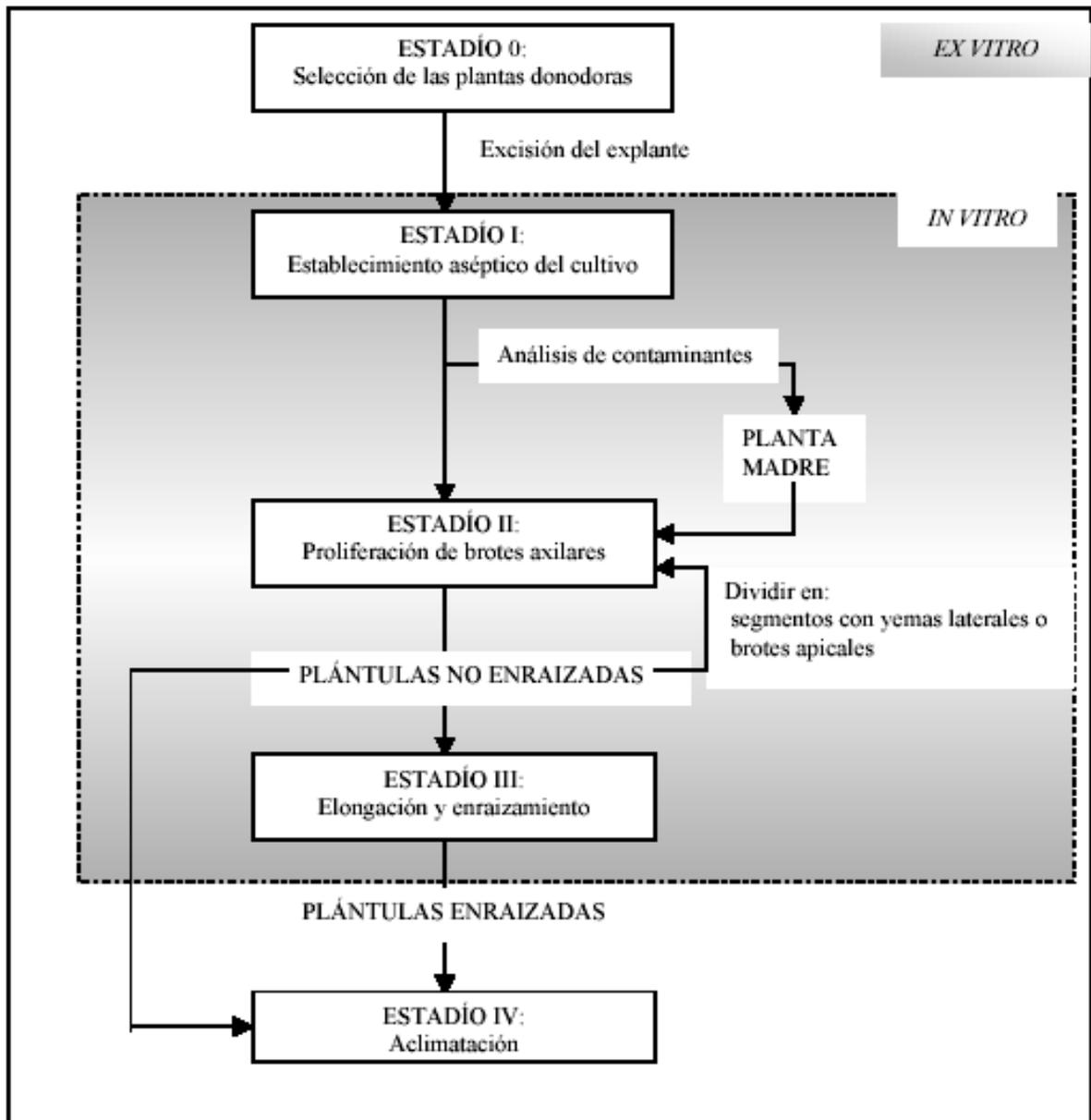
in vitro puede presentar algunas desventajas (Pierik, 1990; Gebhard *et al.*, 1983; Murashige, 1974; Kozai, 1991; Trujillo, 2004):

- Bajas tasas de supervivencia de algunas plántulas durante la aclimatación.
- En algunos sistemas de propagación *in vitro* la estabilidad genética es débil.
- Las plantas producidas *in vitro* pueden mostrar características poco convenientes *in vivo*: excesiva producción de ramas laterales y paso total a la fase juvenil.
- Se puede perder la capacidad de regeneración por cultivos de callos o de células en suspensión, repetidos.
- En algunos casos el aislamiento estéril es extremadamente difícil de realizar.
- Los protocolos de micropropagación disponibles están limitados para algunas especies.
- La fusión de protoplastos es limitada para ciertas especies por lo poco controlable que es la transferencia de material genético, además de la clara competencia con otros métodos de transformación genética (*Agrobacterium tumefaciens*), técnicamente más sencillos, rápidos y dirigibles (Blackhall *et al.*, 1994).
- La embriogénesis somática *in vitro* no garantiza la estabilidad genética de la progenie debido a la alta probabilidad de que aparezcan cambios genéticos. Además, la obtención de plantas completas en algunas especies no siempre resulta un proceso exitoso (Lindsey y Topping 1993).

1.9.5 Etapas del cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de cualquier especie vegetal consta de cinco etapas básicas definidas por Debergh y Maene (1981). Las etapas I a III, definidas inicialmente por Murashige (1974), son las que transcurren propiamente *in vitro*, mientras que la etapa 0 y IV se desarrollan en el invernadero. En el Cuadro 1.1 se resumen dichas etapas.

Cuadro 1.1 Esquema de micropropagación mediante el uso de meristemos o brotes apicales (Alonso, 2002, modificado)



1.9.5.1 Etapa 0: Preparación y selección de plantas madres

Esta es una etapa preparativa en la cual se seleccionan y acondicionan las plantas madres que serán utilizadas para iniciar los cultivos *in vitro* (Pérez *et al.*, 1999).

En esta fase es recomendable mantener a las plantas bajo condiciones cuarentenarias. Además, se puede controlar el estado fisiológico de las plantas o de los explantes mediante la modificación de la luz, la temperatura y los reguladores de crecimiento (Orellana, 1997).

La Etapa 0 se ideó inicialmente como una forma de prevenir los problemas de contaminación reduciendo los patógenos que, de forma natural, se encuentran en la superficie de la planta. Es especialmente efectivo en el caso de contaminaciones relacionadas con hongos (Trujillo, 2004). En el caso de las contaminaciones bacterianas es más complicado de precisar los efectos debido a la dificultad para distinguir las contaminaciones producidas por bacterias endógenas y exógenas (Olivera *et al.*, 2000).

1.9.5.2 Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico

Esta etapa consiste en la selección del explante y la asepsia del mismo para iniciar el cultivo. El objetivo es establecer cultivos axénicos y todavía viables. El éxito del procedimiento depende de la edad de la planta madre, el estado fisiológico, el tamaño de los explantes y su estado de desarrollo (Pérez *et al.*, 1999).

En esta etapa es muy común emplear medios de cultivos diluidos y libres de reguladores de crecimiento (Roca y Mroginski, 1993).

Los principales problemas que aparecen en esta etapa son las contaminaciones tanto endógenas como exógenas y la oxidación fenólica (Orellana, 1997).

El cultivo se considera establecido cuando el explante y/o tejido están vivos y aparentemente libre de contaminación.

1.9.5.3 Etapa II: Multiplicación

También llamada etapa de propagación o ahijamiento. El objetivo en esta fase es lograr el mayor número de plantas posibles, en el menor tiempo, a partir de las vitroplantas establecidas (Alonso, 2002). Existen tres vías para la multiplicación *in vitro*: organogénesis (formación de órganos), embriogénesis (formación de embriones) y la multiplicación por yemas, ápices o meristemos (Krikorian, 1991). Para favorecer esta etapa se emplean medios de cultivos con reguladores de crecimiento, generalmente las citoquininas (Godoy, 2004).

La técnica de multiplicación que se utilice y el rendimiento de la propagación pueden tener consecuencias en las siguientes etapas y en su comportamiento *ex vitro*. Una de las posibles consecuencias de una técnica inapropiada de multiplicación es la variabilidad genética que puede estar ocasionada por el uso de citoquininas inapropiadas o un alto nivel de las mismas (Trujillo, 2004). La eficiencia del método de propagación aumenta cuando los cultivos son homogéneos ya que hacen más sencilla su manipulación a la hora de repicarlos (Toro, 2004).

Los principales problemas que pueden aparecer en esta etapa son la vitrificación y la presencia de contaminantes, generalmente por causa de contaminaciones endógenas que no se han eliminado en la Etapa I, o por mal manejo del material.

1.9.5.4 Etapa III: Enraizamiento y elongación

La fase de enraizamiento tiene como objetivo producir una planta que pueda sobrevivir a las condiciones del trasplante (Krikorian, 1991). El enraizamiento de brotes es con frecuencia inducido *in vitro*, y tiene la ventaja de obtener plántulas asépticas con mayor probabilidad de sobrevivir al ambiente *ex vitro*. Sin embargo, es una labor más intensa que la realizada durante el enraizamiento *ex vitro* (Bonga y Aderkas, 1992).

En general, lo que se obtiene en la Etapa II, son pequeños brotes, en la mayoría de los casos carentes de raíz y con poca probabilidad de adaptarse con éxito a las condiciones ambientales externas. Esta etapa consiste en lograr

que los brotes se elonguen y formen su sistema radical al mismo tiempo, para facilitar su adaptación al medio externo.

Existen muchos factores químicos y físicos que favorecen el enraizamiento *in vitro*. El estrés hídrico, la alta temperatura, la baja intensidad de luz y el uso de carbón activado son factores físicos que estimulan el enraizamiento (Orellana, 1997). Mientras que un ambiente químico favorable al desarrollo de raíces puede lograrse mediante la reducción en la concentración de sales minerales del medio de cultivo, o bien, mediante el incremento de ciertos elementos menores (Br, Ca y Mn) o por la adición de algunos fenoles y vitamina D (Bonga y Aderkas, 1992). Así mismo, se requiere un balance hormonal adecuado dirigido al aumento en auxinas exógenas (Villalobos y Thorpe, 1991).

1.9.5.5 Etapa IV: Aclimatación

La aclimatación consiste en la adaptación de las plántulas cultivadas *in vitro* a las nuevas condiciones del ambiente exterior (Segovia y Laing, 1991).

Las plantas enraizadas *in vitro* presentan varias características peculiares que dificultan su adaptación al medio externo una vez concluido el período de cultivo. Entre estas características se encuentran: la alta humedad relativa dentro de los recipientes que provoca que las plantas generadas *in vitro* carezcan de algunos de los sistemas normales para evitar la pérdida de agua (la cutícula está poco desarrollada y el mecanismo de cierre de los estomas está atrofiado) (Bonga y Aderkas, 1992). Las plantas generadas no realizan una fotosíntesis normal, ya que sus requerimientos de carbono son satisfechos por el medio de cultivo, por lo que la anatomía de las hojas difieren de las plantas que crecen *in vivo*, siendo más delgadas y con menor contenido de clorofila. Por lo tanto, es necesario desarrollar en forma paulatina su autotrofia, para adaptarlas al medio externo con éxito. Como son cultivos libres de patógenos, las plantas no han activado sus mecanismos de resistencia naturales, por lo que es recomendable trabajar en las condiciones más higiénicas posibles (Olivera *et al.*, 2000).

Según Bonga y Aderkas (1992), las plantas micropropagadas generalmente son susceptibles al trasplante debido a que en condiciones *in vitro* ellas son mixotróficas en su modo de nutrición, aparentemente alternan entre el uso de carbohidratos y la fijación de CO₂. El uso de carbohidratos es estimulado por la presencia de altas concentraciones de azúcar y de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo y las bajas intensidades de luz durante el período de incubación (Donnelly *et al.*, 1993). En estas condiciones, el control de la humedad y la necesidad de irrigación es mucho más exigente (Dunstan y Turner, 1984). Es por esto que cuando un gran número de plantas es aclimatado, es necesario establecer un buen sistema de nebulización; pero cuando son pequeños grupos, pueden utilizarse los “mini invernaderos”, o el uso de bolsas plásticas. En algunos casos se han utilizado antitranspirantes (Bonga y Aderkas, 1992), los cuales no han sido exitosos debido a problemas de fitotoxicidad e interferencia con la fotosíntesis (Donnelly *et al.*, 1993). También se ha hecho uso de micorrizas para promover el enraizamiento (Bonga y Aderkas, 1992).

1.9.6 Factores que influyen en el cultivo *in vitro*

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por el material vegetal y las condiciones físicas y químicas que se crean *in vitro* (Pierik, 1990; George, 1993).

1.9.6.1 Material vegetal

1.9.6.1.1 Planta madre

La edad y el estado fisiológico de la planta que dona el explante (planta madre) influye significativamente en su capacidad morfogénica. Los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Styer *et al.*, 1983). Se ha concluido que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos *et al.*, 1982).

La posición relativa de las yemas es otro factor importante. Se ha observado, por ejemplo, que las yemas axilares de rosa, obtenidas de la parte

media del tallo, se desarrollan más rápidamente que aquellas obtenidas de la base o la porción apical (Bressan *et al.*, 1982). Sin embargo, en el espárrago y la grosella las yemas apicales son las únicas que producen plantas *in vitro* (Styer *et al.*, 1983).

El estado fitosanitario de la planta madre influye también en el establecimiento de un cultivo *in vitro*. Si se debe elegir 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).

1.9.6.1.2 El explante

El explante se define como la parte separada de un vegetal utilizado para iniciar el cultivo de tejidos (hojas, raíces, anteras, brotes de yemas, embriones, segmentos de tallos, etc.).

La selección del explante puede hacerse teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta. Si las plantas que se van a micropropagar tienen reproducción por semilla, las partes embrionales de la plántula son las fuentes más comunes de explantes; las semillas pueden ser desinfectadas superficialmente y germinar en condiciones de asepsia (Villalobos *et al.*, 1982). En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente del explante (Villalobos, 1980).

1.9.6.2 Factores físicos

Los factores físicos que influyen en el desarrollo *in vitro* de una planta son principalmente la luz (intensidad y fotoperiodo), la temperatura, la humedad relativa y la concentración de O₂ y CO₂ (Villalobos *et al.*, 1982).

- **Luz:** es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de las plantas y que está influenciado por la intensidad y el fotoperiodo. La intensidad puede variar en dependencia del fenómeno morfogénético que se busca, de forma general la intensidad usada se sitúa entre 5 y 25

w/m₂ o sea 1000-5000 lux. Con respecto al fotoperiodo este será distinto dependiendo del tipo de cultivo con el que se esté trabajando. Generalmente se eligen días de 14-16 horas. En casos muy especiales el cultivo se realiza en completa oscuridad (por ejemplo, las semillas de orquídea que requieren oscuridad y el cultivo de polen) (Chee *et al.*, 1982). En principio, el mejor fotoperiodo *in vivo* será también el mejor fotoperiodo *in vitro* (Pierik, 1990).

- **Temperatura:** la temperatura se mantiene generalmente constante de 24 a 26°C. A veces, dependiendo de la especie experimental, se elige una temperatura más baja (18°C para las especies bulbosas), o una temperatura más alta (28 – 29°C para las especies tropicales). La temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, es generalmente 3-4°C más alta que la correspondiente para el crecimiento *in vivo* (Pierik, 1990).
- **Humedad relativa:** teniendo en cuenta que la humedad dentro del recipiente de cultivo es alta (debido al efecto invernadero que crean las paredes del plástico o vidrio del recipiente), la humedad del cuarto de crecimiento probablemente sólo influirá en la pérdida de agua desde el frasco de cultivo. Sin embargo, una elevada humedad en el cuarto produce como resultado una mayor cantidad de infecciones (Chee *et al.*, 1982).
- **Concentración de O₂ y CO₂:** para mejorar el suministro de oxígeno es recomendable utilizar medios líquidos con agitación constante para proporcionar una buena aireación (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).

1.9.6.3 Factores químicos

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Los ingredientes del medio de cultivo se muestran en el Cuadro 1.2 y se pueden clasificar en (Roca y Mroginski, 1993):

- a) Sales inorgánicas
- b) Carbohidratos
- c) Vitaminas y aminoácidos
- d) Agente gelificante (en el caso de medios sólidos)
- e) Sustancias reguladoras de crecimiento
- f) Otros compuestos

Cuadro 1.2 Conjunto de sustancias que pueden formar parte de los medios nutritivos, para inducir el crecimiento y desarrollo (Pierik, 1990, modificado).

Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales		
Agua		
Sustancias orgánicas	Macro	Micro
	Elementos	
Azúcares Aminoácidos Vitaminas Auxinas Citoquininas Giberelinas Acido abcísico 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 Ni Co Al Mo I
Mezclas de sustancias poco definidas:		
Extracto de levadura Leche de coco Extractos vegetales Hidrolizados de caseína Peptona y tristona		

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in vitro* ni *in vivo*. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas

(o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones (Hurtado y Merino, 1988).

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y a la respuesta que se desea obtener. Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado varias formulaciones para los medios de cultivo (Debergh y Read, 1991).

El medio MS o de Murashige y Skoog (1962), es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas; existen numerosas variaciones comerciales de este medio. El medio B5 o de Gamborg *et al.* (1968), o sus varios derivados, ha sido de un gran valor en el cultivo de células y protoplastos, y también es utilizado eficazmente en regeneración de plantas. La diferencia principal entre los medios MS y B5 es la menor concentración de nitratos en B5. El medio WPM (1980) de baja concentración de sales está especialmente indicado para especies leñosas (Roca y Mroginski, 1993) En el Anexo A se detalla la composición de cuatro medios básicos para el cultivo *in vitro*.

1.9.6.3.1 Sales inorgánicas

Los elementos minerales son muy importantes para la vida de las plantas. Por ejemplo: el magnesio es parte de la molécula de clorofila, el calcio es constituyente de la pared celular, el nitrógeno forma parte de aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos. En forma similar, el hierro, zinc y molibdeno son parte de ciertas enzimas (Hurtado y Merino, 1988). 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. Los 6 primeros son requeridos en cantidades relativamente grandes y se los conoce como macroelementos, los 6 últimos son requeridos en cantidades pequeñas (< de 0,5 mmol/L) y se les denomina microelementos (Pierik, 1990).

Cuando se elige una mezcla de macro y micro sales, se deben tener en cuenta los siguientes aspectos (White, 1989):

- La concentración total de sales puede ser importante. Existen medios "ricos" en sales (por ejemplo, MS) y medios "pobres" en sales (por ejemplo, White).
- La forma más frecuente de añadir nitrógeno (N) es en forma de iones NH_4^+ y NO_3^- . Las necesidades totales de N, varían entre 12-60 mmol/L. La mayor parte de las plantas prefieren el NO_3^- al NH_4^+ .

1.9.6.3.2 Carbohidratos

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono (White, 1989). La sacarosa es la más utilizada, en concentraciones de 2% a 5%, y puede ser reemplazada por glucosa y en menor medida por fructosa; en general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas (Roca y Mroginski, 1993). La incorporación de mioinositol al medio (100 mg/L) generalmente da como resultados un mejor crecimiento de los callos y suspensiones celulares (King, 1984).

1.9.6.3.3 Vitaminas y aminoácidos

La mayor parte de las plantas sintetizan casi todas las vitaminas esenciales, pero aparentemente lo hacen en cantidades mínimas. Para lograr un buen crecimiento es necesario a menudo suplementar al medio con una o más vitaminas. La tiamina (B1) es la que más se utiliza y se la considera un ingrediente esencial. Otras vitaminas también han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro*, como son: piroxina (B6), ácido nicotínico (B3), pantotenato cálcico (B5) (Trujillo, 2004).

Aunque las células cultivadas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos necesarios, la adición de L-glutamina (2 - 8 mM) o una mezcla de aminoácidos es a menudo beneficiosa. Esto es particularmente importante en cultivo de células y protoplastos (White, 1989).

1.9.6.3.4 Agente gelificante

El agar es el material de soporte más ampliamente usado en el cultivo de tejidos, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo (Hurtado y Merino, 1988). En los medios sólidos comúnmente se adiciona agar en una concentración de 0.6% a 1.0% (Roca y Mroginski, 1993). Se debe considerar especialmente la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y las concentraciones del agar utilizado pueden alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos (Debergh, 1982).

Otros agentes gelificantes usados algunas veces en lugar del agar son la poliacrilamida y la silicagel. Cuando se usa medio líquido, el papel filtro usado como puente o plataforma es muy frecuente, así como la fibra de vidrio (Hurtado y Merino, 1988).

1.9.6.3.5 Reguladores de crecimiento vegetal

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo, actúan generalmente en un lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades (Pierik, 1990). En sentido estricto, las sustancias del crecimiento extraídas de los tejidos vegetales y las sustancias sintéticas con efectos reguladores no pueden ser llamadas hormonas (Bidwell, 1979). Por lo anterior, fue creado el término “regulador de crecimiento vegetal”, que define a los compuestos orgánicos, distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas (Hurtado y Merino, 1988).

Los reguladores de crecimiento juegan un papel principal en el control del crecimiento, no únicamente dentro de las plantas, sino también a nivel de órgano, tejido y célula (Wareing y Phillips, 1973), pues se conoce que la mayor parte de la actividad fisiológica de las plantas está mediada por los reguladores de crecimiento (Devlin, 1980).

Actualmente se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal (Leopold y Kriedemann, 1975), divididos en tres grupos principales:

- a) Promotores del crecimiento: auxinas, citoquininas y giberelinas
- b) Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico
- c) Etileno

1.9.6.3.5.1 Auxinas

El nombre auxina (del griego *auxein*, crecer) fue dado a la sustancia reguladora del crecimiento producida en el ápice del coleótilo de avena (Wareing y Phillips, 1973). Estas sustancias tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos (Trujillo, 2004).

Las auxinas más utilizadas son: IBA (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) (Pierik, 1990). El IAA, que se produce de forma natural en las plantas, se añade en concentraciones de 0,01-10 mg/L. Las auxinas sintéticas, y relativamente más activas (IBA, ANA y 2,4-D), se utilizan en concentraciones de 0,001-10 mg/L (Pierik, 1990). Las auxinas generalmente producen: elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión (Pierik, 1990).

En el cultivo *in vitro* las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo (Murashige, 1974). Con una baja concentración de auxina predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxina no se producen raíces, y tiene lugar, en cambio, la formación de callo. El IBA y el ANA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos (Murashige y Tucker, 1969); sin embargo, se debe limitar al máximo

su uso ya que puede inducir mutaciones (Pierik, 1990). Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio (White, 1989).

1.9.6.3.5.2 Citoquininas

El nombre genérico de las citoquininas es empleado para aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis. Casi todas las citoquininas conocidas, tanto naturales como sintéticas, son derivados de la adenina (Hurtado y Merino, 1988).

Las citoquininas más usadas son: BAP (bencil amino purina), kinetina, 2-ip (isopentenil-adenina) y zeatina (extraída del endospermo del maíz) (Gamborg *et al.*, 1968). Generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. En concentraciones elevadas (1-10 mg/L) pueden inducir la formación de vástagos adventicios; sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces (Murashige y Tucker, 1969). Las citoquininas promueven la formación de vástagos axilares porque disminuyen la dominancia apical; también retardan el envejecimiento (Wareing y Phillips, 1973).

En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical (Murashige y Skoog, 1962). Generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (Pierik, 1990).

1.9.6.3.5.3 Relación auxina/ citoquinina

Alterando ligeramente las concentraciones relativas de auxina y citoquinina, los investigadores han podido modificar el desarrollo de las células indiferenciadas de los cultivos de tejidos (Wareing y Phillips, 1973) como se muestra en la Figura 1.1:



Figura 1.1 Relación entre auxinas y citoquininas

(Wareing y Phillips, 1973, modificado).

- Una concentración más o menos igual de las dos hormonas, hace que las células sigan indiferenciadas, formando masas de tejido llamadas callos.
- Con una concentración superior de citoquinina, se forman yemas.
- Cuando la concentración de auxina es superior, el tejido indiferenciado forma raíces.

1.9.6.3.5.4 Otros reguladores

Las giberelinas son otro grupo de reguladores del crecimiento, formadas de diterpenos y que fueron aisladas a partir del hongo *Gibberella fujikuroi* (Hurtado y Merino, 1988). Comparado con las auxinas y citoquininas, las giberelinas se utilizan raramente en el cultivo de tejidos. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas (Bonga, 1992). Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo, su función principal es el alargamiento de las regiones subapicales, 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). Las giberelinas generalmente inhiben la formación de raíces adventicias, y también la formación de vástagos adventicios (Thorpe y Murashige, 1968).

El ácido abscísico (ABA) en la mayor parte de los casos produce un efecto negativo en los cultivos *in vitro*, pero en determinados casos promueve la maduración de embriones, y en cultivos de células en suspensión facilita la sincronización de la división celular (Pierik, 1990).

1.9.7 Principales problemas en el cultivo *in vitro*

Cada uno de los pasos necesarios en el proceso de cultivo *in vitro* tiene sus problemas específicos, aunque algunos de ellos se pueden implicar en dos o más etapas (Debergh y Read, 1991). Los principales problemas son: la contaminación de los explantes, la oxidación fenólica, la vitrificación y la variación somaclonal (Alonso, 2002).

1.9.7.1 Contaminación

Las contaminaciones pueden causar pérdidas económicas muy importantes dentro de la técnica de cultivo *in vitro*. La contaminación más que matar a los explantes directamente invade el cultivo haciendo que el explante no sea apto para su micropropagación (Cassells, 1991).

La mayor parte de los contaminantes en el cultivo de tejidos proceden de la planta donadora. Al establecer los cultivos y dependiendo del explante que se utilice, se pueden transmitir microorganismos de la superficie del explante o de su interior. Con el cultivo de meristemos se pueden eliminar la mayoría de los organismos; sin embargo, en el caso de hojas, peciolo y tallos casi todos los microorganismos en el tejido pueden transmitirse (Bhojwani, 1996). Por lo tanto, es conveniente analizar las plantas madres de las cuales proceden los explantes en búsqueda de individuos limpios.

Los principales microorganismos asociados a las superficies de las plantas son hongos, levaduras, bacterias y mollicutes (fitoplasmas, espiroplasma y organismos relacionados). Muchos de estos microorganismos se pueden eliminar mediante esterilizaciones superficiales. Los microorganismos endófitos que se pueden desarrollar en las plantas pueden ser virus, viroides, bacterias, micoplasmas y hongos y pueden afectar de forma inter o intracelular (Toro, 2004).

Las plantas contaminadas pueden tratarse mediante termoterapia y/o cultivo de meristemos o también aplicando productos antifúngicos, antibióticos y antivíricos a las plantas durante la desinfección del material vegetal, aunque

en ocasiones estos compuestos químicos pueden tener efectos bioestáticos más que biocidas (Trujillo, 2004).

1.9.7.2 Oxidación fenólica

La producción de compuestos fenólicos se estimula cuando las plantas se exponen a situaciones de estrés como pueden ser los daños mecánicos que se producen al aislar los explantes de la planta madre (Debergh y Read, 1991). Las superficies de corte de muchos explantes comienzan a decolorarse justo después de cortarlas. Los explantes completos o partes de ellos frecuentemente continúan oscureciéndose cuando se introducen en el recipiente de cultivo y exudan sustancias que producen a su vez el oscurecimiento del medio (George, 1996).

1.9.7.3 Vitrificación

La vitrificación se denomina también hiperhidricidad, translucidez, transformación hiperhídrica, glaucosidad, encaramiento y vitrosidad (Pierik, 1990). La vitrificación es fundamentalmente el resultado de un exceso de humedad en el recipiente de crecimiento, escasa concentración de agar en el medio sólido, o crecimiento en medio líquido (Ziv y Halevy, 1983).

1.9.7.4 Variación somaclonal

La variación somaclonal son modificaciones genéticas en las células y los tejidos y que se caracterizan por la aparición de nuevos caracteres diferentes a los de las plantas madres debidos al cultivo *in vitro* (Roca y Mroginski, 1993). Suelen consistir en la aparición de plantas más pequeñas, cambios de color o mosaicos (clorosis), cambios en el hábito de crecimiento (vigor, forma de las hojas, porte erecto) y cambios en la productividad (esterilidad, juvenilidad más prolongada). En ocasiones estos cambios pueden llegar a crear nuevas variedades (Toro, 2004).

1.9.8 Métodos de propagación *in vitro*

La propagación *in vitro* permite la regeneración de plantas a partir del uso de yemas, meristemas, callos, órganos, embriones, cultivo de células y protoplastos (Orellana, 1997). Los métodos de propagación vegetativa que se

seleccionen en la multiplicación *in vitro* dependen de la planta que se vaya a multiplicar y de los objetivos finales del esquema de micropropagación. Se debe elegir el tejido del que se quiere partir, así como la forma de diferenciación y de regeneración de órganos (Alonso, 2002).

Los métodos de propagación vegetativa en función del tejido que se ponga en cultivo se pueden clasificar en (Pierik, 1990; Roca y Mroginski, 1993):

- a) Cultivo de segmentos nodales
- b) Cultivo de yemas axilares
- c) Organogénesis: directa e indirecta
- d) Embriogénesis somática
- e) Cultivo de callos
- f) Cultivo de meristemas
- g) Cultivo de protoplastos
- h) Cultivo de células en suspensión
- i) Microinjerto

1.9.8.1 Cultivo de segmentos nodales

Con este nombre se conoce al 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). Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas (semejantes a las del ápice del tallo) pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo *in vitro* (Pierik, 1990). La yema apical continuará su crecimiento dando lugar a una nueva planta, pero en el caso de las yemas nodales, depende del número de yemas que se encuentren en los nudos; por ejemplo, aquellas plantas que tienen hojas opuestas tienen una yema en cada base de la hoja que la une al tallo. Puede darse el caso que las dos yemas se activen al mismo tiempo, dando lugar a dos vástagos que, posteriormente darán lugar a dos plántulas (durante su desarrollo una puede crecer más que la otra producto de la dominancia apical) (Trujillo, 2004). Cuando se obtiene un número suficientemente grande de vástagos, éstos son enraizados y finalmente

se realiza la transferencia al suelo. 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).

1.9.8.2 Cultivo de yemas axilares

Este es un método muy similar al cultivo de segmentos nodales, con la diferencia que en este último caso se utilizan explantes más pequeños y se hace necesario el empleo de altas concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo (Trujillo, 2004).

Cuando se utiliza el método de las yemas axilares, se aísla un ápice del vástago, a partir del cual se desarrollan las yemas axilares, de las axilas de las hojas, bajo la influencia de una concentración relativamente alta de citoquininas. Esta elevada concentración de citoquininas frena la dominancia apical y permite el desarrollo de las yemas axilares (Pierik, 1990).

En la práctica el método de explantes nodales se usa generalmente en combinación con el método de las yemas axilares; se permite a una yema que se desarrolle y posteriormente se añade citoquinina para inducir la formación de vástagos axilares (Pierik, 1990).

1.10 Hipótesis

1.10.1 Hipótesis alternativa:

- Existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados para el establecimiento del cultivo *in vitro* y aclimatación en invernadero de *Nepeta hederacea variegata*.

1.10.2 Hipótesis nula:

- No existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados para el establecimiento del cultivo *in vitro* y aclimatación en invernadero de *Nepeta hederacea variegata*.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.8 Localización del ensayo

La presente investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y en uno de los invernaderos pertenecientes a la empresa Nuevo Sol Plantas Cía. Ltda., ubicados en el kilómetro 1 vía San José Chico, sector La Playita, Tabacundo – Ecuador; cuya realización se llevó a cabo desde mayo del 2006 a mayo del 2007.

2.9 Condiciones de cultivo

2.9.1 Plantas donantes o madres

Las plantas madres se cultivaron en baldes de 12 litros de capacidad bajo condiciones controladas en un sistema forzado (invernadero), en un sustrato compuesto de 50% coco + 30% turba + 20% cascajo. Las plantas fueron expuestas semanalmente a tratamientos de fertilización utilizando una fórmula general elaborada por la empresa (Anexo B y C); manejo de plagas y enfermedades mediante una rotación y frecuencia de agroquímicos ya establecidos (Anexo D) y manejo de plantas y labores culturales mediante cortes regulares a través de podas tanto para la producción de esquejes como para el mantenimiento del material vegetal.

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 $70\pm 3\%$ y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad con una intensidad lumínica de 2000 lux emitida por tubos fluorescentes blancos. Los recipientes de cultivo consistieron en tubos de ensayo y frascos de cristal. Los tubos, utilizados exclusivamente para la fase de introducción, tienen una capacidad de 20 ml. (1.5 cm. de diámetro y 12 cm. de altura) sellados con tapones de algodón y

'Parafilm'[®] en donde se dispensaron 5 ml. de medio de cultivo y se sembró un explante por tubo. Los frascos de cristal utilizados, tipo compota de bebé, tienen una capacidad de 100 ml. (4.5 cm. de diámetro y 6 cm. de altura) con tapa de plástico transparente selladas con 'Parafilm'[®] en donde se dispensaron 20 ml. de medio de cultivo y se sembró cinco explantes por frasco.

2.9.3 Plantas en invernadero (área de aclimatación)

El invernadero de la empresa cuenta con dos áreas de aclimatación: la primera, llamada propagación tiene una temperatura entre 28–30 °C y humedad relativa entre 50-80 %, el sistema de riego es mediante un sistema computarizado de nebulizadores con una frecuencia de 3 segundos cada 5 minutos. La segunda, llamada área de aclimatación tiene una temperatura de 25-28 °C y humedad relativa entre 40-60 %, el sistema de riego en esta área es por microaspersores. Para la presente investigación se creó una tercera área dentro del invernadero, llamada túnel con temperaturas entre 29-31 °C y humedad relativa del 99 % con un sistema de riego manual a través de bomba de mochila cada 5 minutos con el fin de mantener la alta humedad relativa. Las condiciones de estas áreas se encuentran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Condiciones de las áreas de aclimatación dentro de los invernaderos de NuevoSol Plantas Cía. Ltda.

Área	TÚNEL	PROPAGACIÓN	ACLIMATACIÓN
Temperatura (°C)	29-31	28-30	25-28
Humedad relativa (%)	99	50-80	40-60
Intensidad lumínica (%)	Plástico 60%	Sarán 65%	Sarán 33%
Frecuencia riegos	Cada 5 minutos	Cada 5 minutos	Cada hora
Fertilización	Agua	Agua	Normal*
Fumigación	Normal**	Normal**	Normal**

Normal* = Anexo B

Normal** = Anexo D

2.10 Fase de establecimiento del cultivo

2.10.1 Selección del material vegetal

El material vegetal de partida consistió en esquejes de plantas de *Nepeta hederacea variegata* de un año de edad, provenientes de plantas madres mantenidas en los invernaderos de la empresa.

En el laboratorio, los esquejes fueron deshojados y cortados hasta obtener segmentos nodales de 3 cm de longitud aproximadamente, con dos pares de yemas axilares y la yema apical. Bajo condiciones asépticas (cámara de flujo laminar) se cortaron los explantes que consistieron exclusivamente en yemas con uno o dos primordios foliares de 0.5 cm de longitud aproximadamente, dejando ligeramente más larga la sección basal para introducirlo en el medio de cultivo.

2.10.2 Desinfección del material vegetal

En el laboratorio, la desinfección del material vegetal consistió en un lavado previo de los esquejes antes de procesar el explante y en una desinfección posterior del explante bajo condiciones asépticas (cámara de flujo laminar).

Los cortes de los esquejes deshojados con yemas laterales y apicales de *Nepeta hederacea variegata* se colocaron en frascos de vidrio para lavarlos varias veces con agua del grifo con el fin de eliminar las impurezas. Luego, se adicionó a cada frasco aproximadamente 50 ml de una solución jabonosa (agua + detergente comercial). Tras agitar por 10 minutos, se enjuagó con agua del grifo hasta que no hubiera evidencias de jabón. A cada frasco se le añadió Euparen[®] 1g/L (fungicida de contacto que contiene Tolyfluanid como elemento activo a una dosis de 500 gr/Kg) por 3 minutos en agitación constante y se enjuagó con agua estéril. Posteriormente, se sumergieron los explantes en Tego 51[®] 1% (solución de amonio cuaternario comercial) por 5 minutos. Finalmente, se dejó a los esquejes en agua estéril hasta su utilización en la cámara de flujo laminar.

Bajo condiciones asépticas (cámara de flujo laminar), empleando pinzas y bisturís esterilizados mediante mechero, se procedió a cortar los explantes (yemas con uno o dos primordios foliares) y a colocar en nuevos frascos de vidrio con agua estéril. A partir de este momento se aplicaron los 6 diferentes tratamientos de desinfección utilizando soluciones de alcohol etílico al 70%, hipoclorito de sodio al 20% más 5 gotas de Tween[®] 80 y lavados continuos en agua estéril, los cuales se resumen en la Tabla 2.2. El Anexo E detalla los respectivos protocolos de desinfección del material vegetal.

Tabla 2.2 Diferentes tiempos de exposición a agentes desinfectantes en la fase de establecimiento del cultivo

Tratamiento	Codificación	alcohol 70%		cloro 20%	
		(seg.)		(min.)	
T1	a1c1	a1	30	c1	0
T2	a1c2	a1	30	c2	2
T3	a1c3	a1	30	c3	4
T4	a2c1	a2	0	c1	0
T5	a2c2	a2	0	c2	2
T6	a2c3	a2	0	c3	4

2.10.3 Inoculación del material vegetal

Después de la desinfección, los explantes fueron sembrados en tubos de ensayo con medio de cultivo provisto de las sales de Murashige y Skoog (MS, 1962) (Anexo F), suplementado con 1 ppm ANA, 30 g/L sacarosa y 7 g/L agar, luego se procedió a ajustar el pH a un valor de 5,7 mediante la utilización de HCl y NaOH 1N. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 psi de presión por 15 minutos. El Anexo G detalla el procedimiento para la preparación del medio de cultivo. La transferencia de los explantes al medio de cultivo fue efectuada bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar, empleando pinzas y bisturís esterilizados mediante mechero. Los explantes fueron mantenidos en el cuarto de cultivo por 3 semanas.

2.11 Fase de multiplicación

A las tres semanas de haber obtenido plántulas vivas y liberadas aparentemente de contaminantes exógenos, estas fueron repicadas mediante diferentes cortes obteniendo explantes de aproximadamente 0.5 cm de

longitud, dejando ligeramente más larga la sección basal para introducirlos en el medio de cultivo.

Los explantes repicados fueron sembrados en cinco diferentes medios de propagación que corresponden a los cinco tratamientos aplicados en esta fase; todos los medios tienen como base en su composición las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962) (Anexo F), suplementados con 30 g/L sacarosa, 7 g/L agar y 0.1 ppm ANA y como variantes para cada medio de cultivo, BAP en cinco diferentes concentraciones (0, 0.5, 1, 1.5 y 2 ppm). La Tabla 2.3 detalla la composición de los cinco medios de cultivo empleados para la multiplicación de los explantes. El medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5,7 y dispensado en frascos de cristal con tapas de plástico transparente; al igual que el medio anterior, se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 psi de presión por 15 minutos. Los brotes multiplicados fueron mantenidos en el cuarto de cultivo por 4 semanas.

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

Tratamiento	Sales minerales	Sacarosa (gr/L)	Agar (gr/L)	ANA (ppm)	BAP (ppm)
T1	MS	30	7	0,1	0,0
T2	MS	30	7	0,1	0,5
T3	MS	30	7	0,1	1,0
T4	MS	30	7	0,1	1,5
T5	MS	30	7	0,1	2,0

2.12 Fase de enraizamiento *in vitro*

Para la fase de enraizamiento *in vitro* se utilizaron brotes de 0.5 cm de longitud aproximadamente y se inocularon en un medio de cultivo provisto de las sales de Murashige y Skoog (MS, 1962) (Anexo F), suplementado con 30 g/L sacarosa, 7 g/L agar y 1 ppm ANA. El medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5,7 y dispensado en frascos de cristal con tapas de plástico transparente; al igual que el medio anterior, se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 psi de presión por 15 minutos. Las plántulas fueron mantenidas 4 semanas en el cuarto de cultivo.

2.13 Fase de aclimatación en invernadero

Para la fase de aclimatación, las plántulas enraizadas se transfirieron a bandejas de 30 celdas que contenían sustrato compuesto de 50% coco + 50% turba. El procedimiento consistió en eliminar con abundante agua los residuos del medio de cultivo de las raíces y sumergir las plántulas en una solución de Euparen[®] 1g/L. Para asegurar el enraizamiento se aplicó Hormonagro #1[®] (fitohormona promotora de formación de raíces que contiene ANA como elemento activo a una dosis de 0.4%). Una vez sembradas las plántulas en las bandejas se colocaron en 3 diferentes áreas de aclimatación, aplicando los 3 tratamientos propuestos en esta investigación, los cuales se detallan en la Tabla 2.4. Después de 4 semanas se contabilizaron el número de plantas vivas en relación a los diferentes tratamientos aplicados. El Anexo H detalla el protocolo utilizado en esta fase de aclimatación.

Tabla 2.4 Diferentes áreas y tiempos aplicados en la fase de aclimatación en invernadero

Tratamiento	Área Túnel	Área Propagación	Área Aclimatación
T1	2 semanas	2 semanas	
T2		2 semanas	2 semanas
T3			4 semanas

2.14 Análisis estadístico

Los explantes se asignaron a cada tratamiento de forma completamente aleatoria y el análisis de los tratamientos se realizó con un diseño completamente al azar (DCA), excepto para la fase de establecimiento del cultivo en donde se utilizó un arreglo factorial en un DCA.

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 separación de promedios mediante la prueba de Tukey al 5% de significación. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System), versión 8.0.

Para todas las fases de la investigación se realizaron 3 repeticiones del ensayo 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 6 tratamientos aplicados.
- Porcentaje de explantes quemados (%): medición del porcentaje de explantes quemados (tejido necrosado) a las 3 semanas del establecimiento del cultivo en relación a los 6 tratamientos aplicados.

Unidad experimental = 1 tubo con 1 explante y 30 observaciones

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 5 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 4 semanas de cultivo en relación a los 5 tratamientos hormonales.

Unidad experimental = 1 frasco con 5 plántulas y 6 observaciones

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 a los 3 tratamientos de aclimatación.

- Altura de la planta (cm): se midió la altura de la planta en centímetros desde la base hasta su extremo apical después de 4 semanas en relación a los 3 tratamientos de aclimatación.
- Formación de raíz (puntos): se evaluó el sistema radicular de las plantas aclimatadas clasificando los resultados en 3 categorías: 1 = baja, 2 = media y 3 = alta cantidad de raíz, a las 4 semanas de siembra en relación a los 3 tratamientos de aclimatación aplicados.

Unidad experimental = 1 bandeja con 1 plántula y 30 observaciones

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.4 Fase de establecimiento del cultivo

3.4.1 Porcentaje de explantes contaminados

El análisis de varianza para la variable porcentaje de explantes contaminados indica que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados para los factores alcohol (a) y cloro (c), ni tampoco para la interacción alcohol x cloro (a_xc). El coeficiente de variación fue bajo y el promedio general de los explantes contaminados fue de 53.33% (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Análisis de varianza para la variable porcentaje de explantes contaminados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F calculada	Pr > F.
Total	17	1900,00			
Tratamientos	5	900,00	180,00	2.16 ^{ns}	0,13
alcohol	1	5,55	5,55	0.07 ^{ns}	0,80
cloro	2	475,00	237,50	2.85 ^{ns}	0,10
alcohol x cloro	2	419,44	209,72	2.52 ^{ns}	0,12
Error	12	1000,00	83,33		

CV = 17,11 %
 Promedio = 53,33% de explantes contaminados

Sin embargo, la tabla de promedios para la interacción alcohol x cloro indica que los tratamientos 2 (30" alcohol 70% + 2' cloro 20%) y 6 (0" alcohol 70% + 4' cloro 20%) fueron los que mejor respuesta presentaron porque se obtuvo el menor porcentaje de explantes contaminados (41.66% y 46.66% respectivamente), mientras que con el tratamiento 4 (0" alcohol 70% + 0' cloro 20%) se presentó el mayor porcentaje de contaminación (61.66%) (Tabla 3.2 y Figura 3.1).

Tabla 3.2 Promedios para la interacción alcohol x cloro en la evaluación del porcentaje de explantes contaminados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.

Tratamiento	Interacción	alcohol 70%	cloro 20%	Promedio (%)
T4	a2c1	0"	0'	61,66
T1	a1c1	30"	0'	58,33
T3	a1c3	30"	4'	58,33
T5	a2c2	0"	2'	53,33
T6	a2c3	0"	4'	46,66
T2	a1c2	30"	2'	41,66

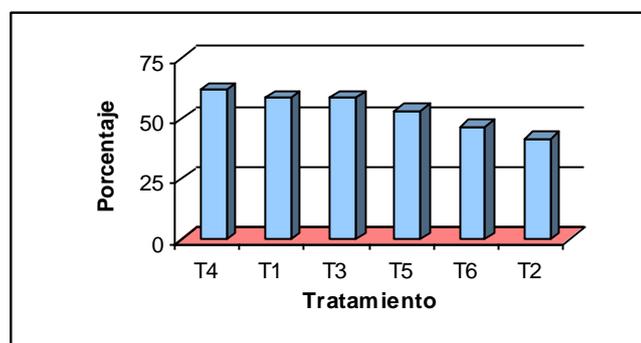


Figura 3.1 Porcentaje de explantes contaminados para la interacción alcohol x cloro, Tabacundo, 2007

La tabla de promedios para el factor alcohol indica que el mayor porcentaje de explantes contaminados se presentó cuando no se aplicó alcohol, a pesar de que la diferencia entre a1 (alcohol 30") y a2 (alcohol 0") es mínima (Tabla 3.3 y Figura 3.2). De igual manera, en el caso del factor cloro, se observó mayor índice de contaminación de los explantes cuando no se aplicó cloro y el menor índice de contaminación se presentó con el factor c2 (cloro 2') (Tabla 3.4 y Figura 3.3).

Tabla 3.3 Promedios para el factor alcohol en la evaluación del porcentaje de explantes contaminados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.

Factor alcohol	Descripción	Promedio (%)
a2	alcohol 0"	53,89
a1	alcohol 30"	52,78

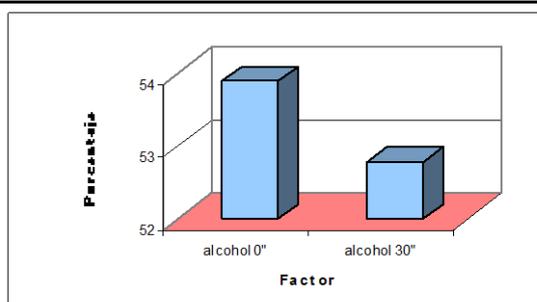


Figura 3.2 Porcentaje de explantes contaminados para el factor alcohol, Tabacundo, 2007

Tabla 3.4 Promedios para el factor cloro en la evaluación del porcentaje de explantes contaminados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.

Factor cloro	Descripción	Promedio (%)
c1	cloro 0'	60,00
c3	cloro 4'	52,50
c2	cloro 2'	47,50

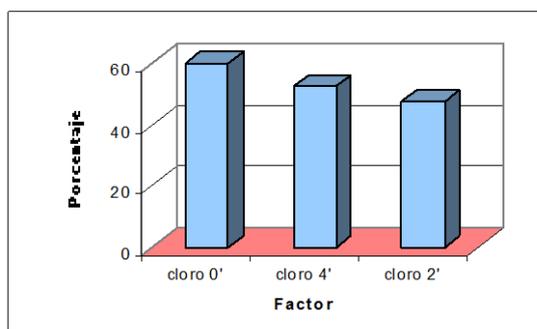


Figura 3.3 Porcentaje de explantes contaminados para el factor cloro, Tabacundo, 2007

3.4.2 Porcentaje de explantes quemados

Para la variable porcentaje de explantes quemados se reportaron diferencias significativas para el factor alcohol (a), no así para el factor cloro (c), ni tampoco para la interacción alcohol x cloro (axc); es decir estadísticamente el factor alcohol si contribuye en la quemazón de los explantes (tejido necrosado). El coeficiente de variación fue relativamente alto pero se acepta en esta investigación y el promedio general de los explantes quemados fue de 58.61% (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Análisis de varianza para la variable porcentaje de explantes quemados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F calculada	Pr > F.
Total	17	8590,27			
Tratamientos	5	3690,27	738,05	1,81 ^{ns}	0,19
alcohol	1	2812,50	2812,50	6,89**	0,02
cloro	2	844,44	422,22	1,03 ^{ns}	0,39
alcohol x cloro	2	33,33	16,66	0,04 ^{ns}	0,96
Error	12	4900,00	408,33		

CV = 34,47 %
 Promedio = 58,61% de explantes quemados

La tabla de promedios para la interacción alcohol x cloro indica que con los tratamientos 5 (0" alcohol 70% + 2' cloro 20%) y 6 (0" alcohol 70% + 4' cloro 20%) se quemaron el menor número de explantes; no así con el tratamiento 1 (30" alcohol 70% + 0' cloro 20%) en el cual se presentó el mayor porcentaje de explantes quemados (Tabla 3.6 y Figura 3.4).

Tabla 3.6 Promedios para la interacción alcohol x cloro en la evaluación del porcentaje de explantes quemados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.

Tratamiento	Interacción	alcohol 70%	cloro 20%	Promedio (%)
T1	a1c1	30"	0'	78,33
T3	a1c3	30"	4'	71,66
T2	a1c2	30"	2'	63,33
T4	a2c1	0"	0'	56,66
T6	a2c3	0"	4'	43,33
T5	a2c2	0"	2'	38,33

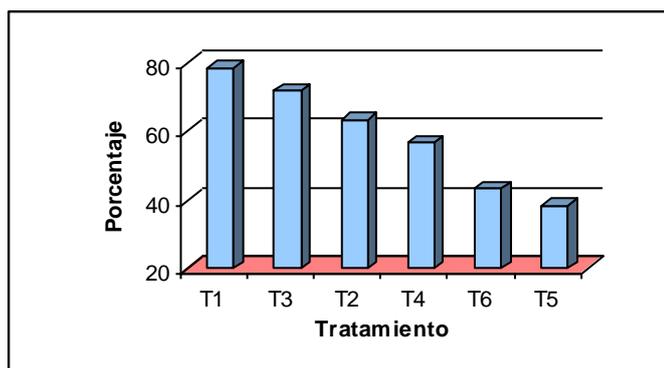


Figura 3.4 Porcentaje de explantes quemados para la interacción alcohol x cloro, Tabacundo, 2007

Para el factor alcohol en la variable del porcentaje de explantes quemados se presenta la prueba de Tukey al 5% con dos rangos de significancia, en el cual se indica que con el nivel a1 (alcohol 30") se queman mayormente los explantes que con el nivel a2 (alcohol 0") (Tabla 3.7 y Figura 3.5). Para el caso del factor cloro, los promedios son estadísticamente iguales (Tabla 3.8 y Figura 3.6).

Tabla 3.7 Prueba de Tukey al 5% para el factor alcohol en la evaluación del porcentaje de explantes quemados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.

Factor alcohol	Descripción	Promedio (%)	Rangos de significancia
a1	alcohol 30"	71,11	a
a2	alcohol 0"	46,11	b

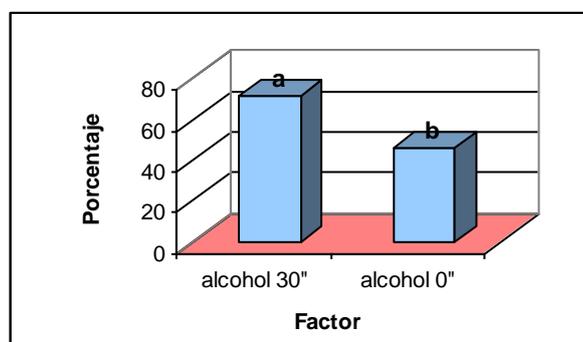


Figura 3.5 Porcentaje de explantes quemados para el factor alcohol, Tabacundo, 2007

Tabla 3.8 Promedios para el factor cloro en la evaluación del porcentaje de explantes quemados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.

Factor cloro	Descripción	Promedio (%)
c1	cloro 0'	67,50
c3	cloro 4'	57,50
c2	cloro 2'	50,83

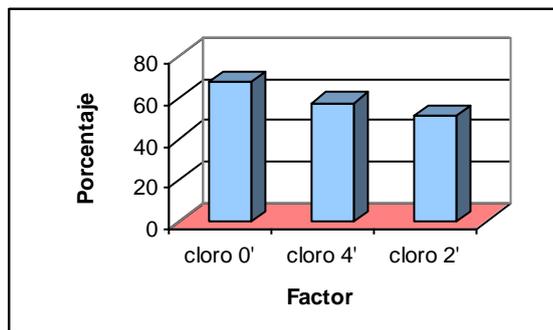


Figura 3.6 Porcentaje de explantes quemados para el factor cloro, Tabacundo, 2007

En la Figura 3.7 se resume el porcentaje de explantes contaminados y quemados por tratamiento.

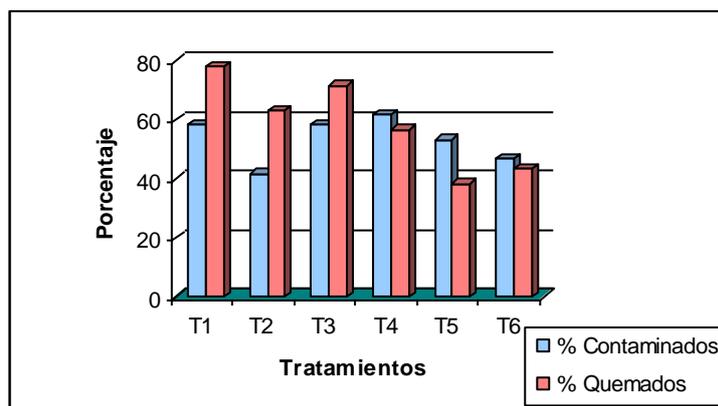


Figura 3.7 Porcentaje de explantes contaminados y quemados obtenidos en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007

3.4.3 Número de explantes sanos

En lo que respecta a la sobrevivencia de los explantes al proceso de desinfección (explantes sanos) después de la aplicación de los seis tratamientos propuestos en esta investigación podemos observar en la tabla de promedios que con la aplicación de los tratamientos 5 (0" alcohol 70% + 2' cloro 20%) y 6 (0" alcohol 70% + 4' cloro 20%) se obtuvieron el mayor número de explantes vivos por lo que se podría pensar que estos tratamientos de desinfección son los mejores para la fase de establecimiento del cultivo (Tabla 3.9 y Figura 3.8).

Tabla 3.9 Promedios para la evaluación del número de explantes sanos en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.

Tratamiento	Interacción	alcohol 70%	cloro 20%	Promedio (# explantes)
T5	a2c2	0"	2'	8,33
T6	a2c3	0"	4'	8,00
T2	a1c2	30"	2'	5,66
T4	a2c1	0"	0'	4,66
T3	a1c3	30"	4'	4,33
T1	a1c1	30"	0'	3,33

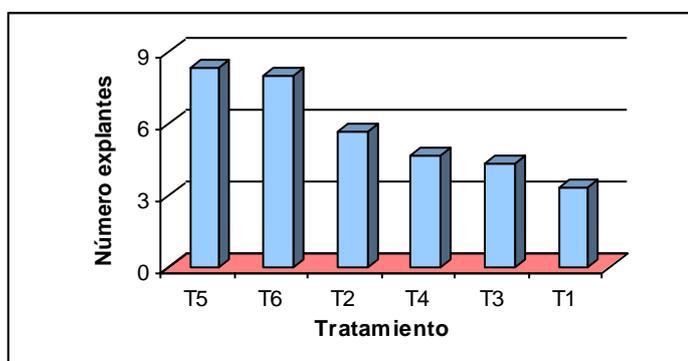


Figura 3.8 Número de explantes sanos obtenidos en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007

3.5 Fase de multiplicación

3.5.1 Índice de propagación

El análisis de varianza para la variable índice de propagación (IP) indica que se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos

evaluados. Se realizaron tres réplicas del ensayo (R1, R2 y R3) para confirmar resultados y en las tres ocasiones se obtuvieron resultados similares, con coeficientes de variación de 18.04, 14.02 y 14.26%, respectivamente. Los promedios de brotes por explante (IP) fueron de 4.64 (R1), 5.32 (R2) y 4.51 (R3) (Tabla 3.10).

El promedio general del coeficiente de variación para las tres réplicas realizadas en esta fase es de 15.44%, porcentaje aceptable en esta investigación.

Tabla 3.10 Análisis de varianza para la variable índice de propagación (IP) en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007.

		R1		R2		R3	
F. de V.	G.L.	C.M.	F calculada	C.M.	F calculada	C.M.	F calculada
Total	29						
Tratamientos	4	32,33	45,99**	34,21	61,45**	26,99	65,01**
Error	25	0,70		0,55		0,41	
CV			18,04%		14,02%		14,26%
Promedio			4,64 IP		5,32 IP		4,51 IP

IP = Índice de propagación (brotes/explante)

La Tabla 3.11, resume las pruebas de Tukey y los promedios del IP. Se observan tres rangos de significancia para las tres réplicas del ensayo. En las tres ocasiones, los tratamientos 4 (1.5 ppm BAP) y 5 (2 ppm BAP) comparten el mismo rango de significancia (a), lo que demuestra que son estadísticamente iguales y superiores que los demás tratamientos. Por el contrario, el tratamiento 1 (0 ppm BAP) siempre está ubicándose en el último rango de significancia (c) por lo que se considera el tratamiento menos óptimo (Figura 3.9).

Tabla 3.11 Prueba de Tukey al 5% para la variable índice de propagación en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007.

R1			R2			R3		
Trata.	Prom.	R. de S.	Trata.	Prom.	R. de S.	Trata.	Prom.	R. de S.
T4	7.03	a	T5	7.58	a	T4	7.07	a
T5	6.84	a	T3	6.72	a	T5	6.37	a
T3	4.57	b	T4	6.70	a	T3	3.99	b
T2	3.08	c	T2	3.60	b	T2	2.96	bc
T1	1.72	c	T1	2.02	c	T1	2.20	c

T1 = 0 ppm BAP T2 = 0.5 ppm BAP T3 = 1 ppm BAP T4 = 1.5 ppm BAP T5 = 2 ppm BAP

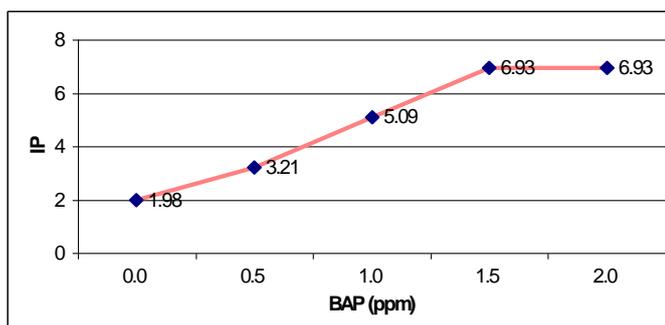


Figura 3.9 Promedio del índice de propagación para las tres réplicas del ensayo en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007

3.5.2 Porcentaje de presencia de raíz

El análisis de varianza para la variable porcentaje de presencia de raíz, reporta diferencias significativas en las tres réplicas del ensayo realizadas. Los valores del coeficiente de variación se encuentran entre 18 y 48%. Los promedios para R1, R2 y R3 son de 67.16, 70.33 y 40.00%, respectivamente. (Tabla 3.12).

Tabla 3.12 Análisis de varianza para la variable porcentaje de presencia de raíz en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007.

F. de V.	G.L.	R1		R2		R3	
		C.M.	F calculada	C.M.	F calculada	C.M.	F calculada
Total	29						
Tratamientos	4	2259,58	7,85**	4128,33	23,82**	2727,08	7,30**
Error	25	287,83		173,33		373,66	
CV		25,25%		18,71%		48,32%	
Promedio		67,16%		70,33%		40,00%	

La Tabla 3.13, resume las pruebas de Tukey y los promedios del porcentaje presencia de raíz. Para las tres réplicas del ensayo, se presentaron dos rangos de significancia. Los tratamientos 1 (0 ppm BAP), 2 (0.5 ppm BAP) y 3 (1 ppm BAP) no difieren estadísticamente porque comparten el mismo rango (a), ubicándose como los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de presencia de raíz. Pero sí difieren de los tratamientos 4 (1.5 ppm BAP) y 5 (2 ppm BAP) en donde se obtuvo una escasa formación de raíces (Figura 3.10).

Tabla 3.13 Prueba de Tukey al 5% para la variable del porcentaje de presencia de raíz en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007

R1			R2			R3		
Trata.	Prom.	R. de S.	Trata.	Prom.	R. de S.	Trata.	Prom.	R. de S.
T1	89.17	a	T2	96.67	a	T2	62.50	a
T2	74.17	a	T1	89.17	a	T1	50.00	a
T3	72.50	a	T3	79.17	a	T3	47.50	a
T4	63.33	ab	T4	52.50	b	T4	33.33	ab
T5	36.67	b	T5	34.17	b	T5	6.67	b

T1 = 0 ppm BAP T2 = 0.5 ppm BAP T3 = 1 ppm BAP T4 = 1.5 ppm BAP T5 = 2 ppm BAP

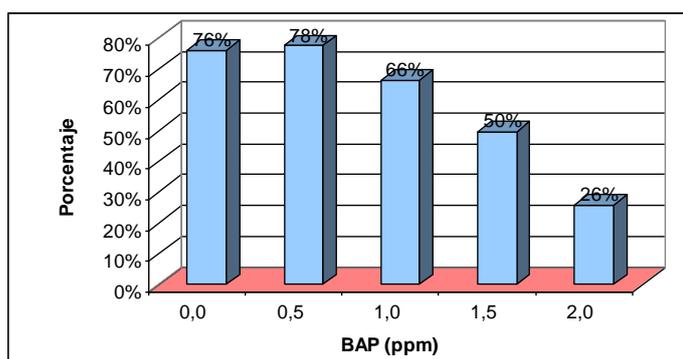


Figura 3.10 Promedio del porcentaje de presencia de raíz para las tres réplicas del ensayo en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007

3.6 Fase de aclimatación en invernadero

3.6.1 Porcentaje de sobrevivencia

El 100% de las plantas sobrevivieron a los tres tratamientos aplicados en la fase de aclimatación en invernadero, por lo que esta variable no fue estudiada estadísticamente.

3.6.2 Altura de la planta

De acuerdo al análisis estadístico se reportó una alta diferencia significativa en el análisis de varianza para la variable altura de la planta; es decir los tres tratamientos aplicados difieren significativamente en la obtención de una planta más alta o más baja. El coeficiente de variación fue relativamente bajo (18.03%) y se obtuvo un promedio de altura de la planta de 3.38 cm. (Tabla 3.14).

Tabla 3.14 Análisis de varianza para la variable altura de la planta en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F calculada	Pr > F.
Total	269	218,09			
Tratamientos	2	119,12	59,56	160,67**	<,0001
Error	267	98,98	0,37		

CV = 18,03%
Promedio = 3,38 cm.

Según la prueba de Tukey (Tabla 3.15) aplicada para la separación de promedios se obtuvo distintos rangos de significancia para los tres tratamientos evaluados; es decir cada tratamiento difiere significativamente el uno del otro, obteniéndose mayor altura de las plantas cuando se aplica el tratamiento 1 (2 semanas en el área de túnel + 2 semanas en el área de propagación) con un promedio de 4.26 cm.; mientras que las plantas más bajas se obtuvieron al aplicar el tratamiento 3 (4 semanas en el área de aclimatación) (Figura 3.11).

Tabla 3.15 Prueba de Tukey al 5% para la variable de altura de la planta en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.

Tratamiento	Área Túnel	Área Propagación	Área Aclimatación	Promedio	Rangos de Significancia
T1	2 semanas	2 semanas		4,26	a
T2		2 semanas	2 semanas	3,20	b
T3			4 semanas	2,66	c

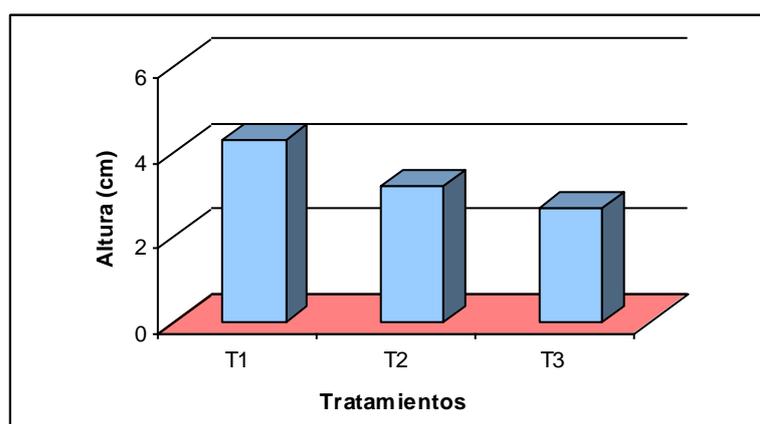


Figura 3.11 Promedio de la variable altura de la planta en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007

3.6.3 Formación de raíz

El análisis de varianza también reportó diferencias significativas para la variable formación de raíz con un coeficiente de variación de 19.61% y un promedio general de enraizamiento de 2.25 puntos, considerados subjetivamente de acuerdo a valores categóricos (1 = bajo, 2 = medio y 3 = alto) (Tabla 3.16).

Tabla 3.16 Análisis de varianza para la variable formación de raíz en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F calculada	Pr > F.
Total	269	68,87			
Tratamientos	2	16,81	8,40	43,09**	<,0001
Error	267	52,07	0,20		

CV = 19,61%
Promedio = 2,25 puntos

Los rangos de significancia según la prueba de Tukey (Tabla 3.17) reportan una diferencia altamente significativa para los tres tratamientos evaluados; obteniéndose mayor enraizamiento con el tratamiento 2 (2 semanas en el área de propagación + 2 semanas en el área de aclimatación) con un promedio de 2.56 puntos y un enraizamiento pobre con el tratamiento 1 (2 semanas en el área de túnel + 2 semanas en el área de propagación) con un promedio de 1.94 (Figura 3.12).

Tabla 3.17 Prueba de Tukey al 5% para la variable formación de raíz en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.

Tratamiento	Área Túnel	Área Propagación	Área Aclimatación	Promedio	Rangos de Significancia
T2		2 semanas	2 semanas	2,56	a
T3			4 semanas	2,26	b
T1	2 semanas	2 semanas		1,94	c

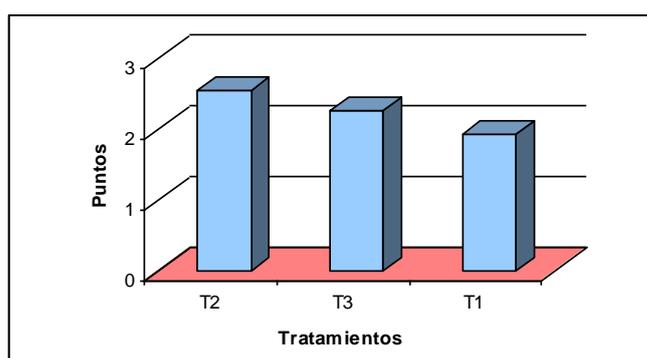


Figura 3.12 Promedio de la variable porcentaje de formación de raíz en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007

Analizando las frecuencias de formación de raíces (Tabla 3.18), podemos observar que el tratamiento 2 (2 semanas en el área de propagación + 2 semanas en el área de aclimatación) prácticamente tiene un buen sistema radicular formado solo por raíces de categorías 2 y 3 (media y alta), y que está en relación con el primer puesto de ubicación en la prueba de Tukey. Para el tratamiento 1 (2 semanas en el área de túnel + 2 semanas en el área de propagación) indica que se presentaron en mayor cantidad raíces de categoría media (90%), mientras que las proporciones de enraizamiento bajo y alto fueron mucho menores (7.8 y 2.2%, respectivamente). De igual manera, para el tratamiento 3 (4 semanas en el área de aclimatación) se presentaron raíces de categoría media en mayor proporción (70%) que las de categoría alta (27.8%) y baja (2.2) (Figura 3.13).

Tabla 3.18 Porcentajes de frecuencias de formación de raíz por cada tratamiento en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.

Enraizamiento	T1	T2	T3
Bajo	7.8%	0.0%	2.2%
Medio	90.0%	44.4%	70.0%
Alto	2.2%	55.6%	27.8%

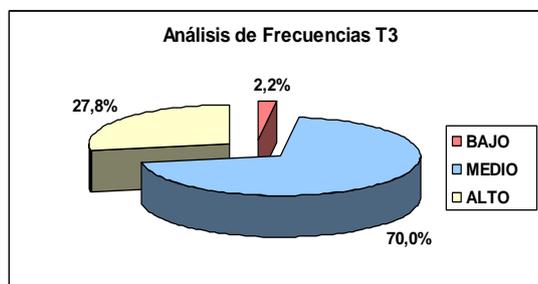
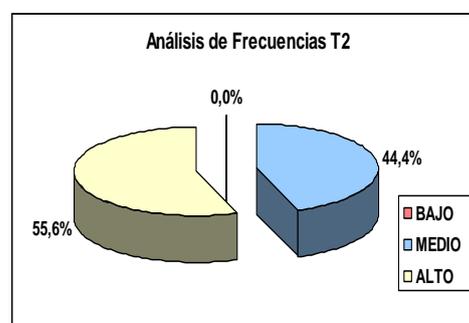
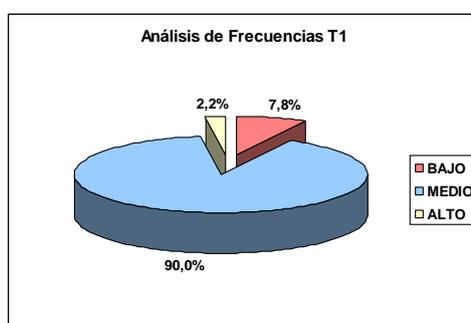


Figura 3.13 Análisis de frecuencias para la variable formación de raíz en la fase de aclimatación en invernadero

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo de investigación, fue la búsqueda de un protocolo eficiente mediante *cultivo in vitro* para la producción de plantas de *Nepeta hederacea variegata*, una especie de relevancia ornamental. Esta planta se multiplica vegetativamente por enraizamiento de esquejes. Este sistema, si bien es económico, sólo permite la producción de una planta por esqueje plantado. Para superar esta desventaja se ha desarrollado un protocolo para la propagación de esta especie, en el cual se combinan las ventajas de la micropropagación (sanidad, tasa de multiplicación y rejuvenecimiento, entre otras) con la capacidad de enraizamiento de la especie.

4.5 Fase de establecimiento del cultivo

La desinfección y el establecimiento *in vitro* de los explantes de *Nepeta* mostraron cierto grado de dificultad, ya que se presentó una alta contaminación fúngica y bacteriana y una marcada sensibilidad de los tejidos vegetales a los agentes desinfectantes.

4.5.1 Porcentaje de explantes contaminados

El 53.33% de los explantes de *Nepeta* mostraron contaminación, principalmente por bacterias y hongos que empezaron a crecer en el medio de cultivo a la primera semana de su inoculación. Esta alta tasa de contaminación se puede atribuir a tres aspectos importantes: mal manejo de la planta donante o planta madre, probabilidad de que existan agentes endógenos que no son fácilmente eliminados con una desinfección superficial y a la posición rastrera que tiene la planta.

Como se había indicado al inicio de esta investigación, uno de los mayores problemas en la propagación vegetativa de *Nepeta* es el nivel de contaminantes que presenta. Al ser una planta rastrera facilita las infecciones bacterianas y fúngicas, por lo que es necesario prestar atención al manejo de la planta madre desde un origen, por ejemplo, mantener a las plantas en condiciones cuarentenarias, bajo condiciones higiénicas y con un nivel fitosanitario estricto.

Las plantas madres bajo condiciones más higiénicas pueden reducir algunos problemas de contaminación, especialmente lo relacionado con hongos. Sin embargo, es más difícil interpretar los resultados con respecto a la contaminación con bacterias endógenas y exógenas (Ramírez y Salazar, 1997 y Ramírez *et al.*, 1999).

La existencia de poblaciones bacterianas endógenas en las plantas es un hecho real (Cassells, 1991; Debergh, 1982.) y está considerado el factor más importante, responsable de las mayores pérdidas del cultivo *in vitro* (Enjalric, *et al.*, 1998). Las mismas pueden aparecer en cualquier fase del cultivo y su detección es difícil de realizar, pues la mayoría de estas bacterias normalmente crecen muy poco en los medios de cultivo o crecen solo después de largos períodos de incubación (Krikorian, 1991).

Para la primera variable analizada, porcentaje de explantes contaminados, no se reportaron diferencias significativas tanto para los tratamientos como para el factor alcohol y cloro; es decir, estadísticamente no influye la aplicación de dichos productos químicos en el proceso de desinfección de los explantes en esta investigación. Esto no concuerda con lo expuesto por Pelacho *et al.* (2007) quien asegura que el paso previo y obligado para obtener material vegetal libre de microorganismos es la esterilización de la superficie de éste utilizando algún tipo de agente desinfectante.

Sin embargo, a pesar de no haber encontrado diferencias significativas en los tratamientos aplicados en el proceso de desinfección, los resultados de

la Tabla 3.2 indican que con el tratamiento 2 se obtuvieron el menor número de explantes contaminados (41.66%). Este tratamiento emplea alcohol y cloro en concentraciones y tiempos de 70%, 30" y 20%, 2', respectivamente.

Cuando no se incluyó en el proceso de desinfección ninguno de los dos agentes químicos en estudio (tratamiento 4), se obtuvo el mayor promedio de explantes contaminados (61.66%), lo cual nos confirma la necesidad de emplear algún tipo de agente biocida tales como: hipoclorito de sodio o calcio, alcohol, cloruro de mercurio y otros productos con una actividad más selectiva como son: fungicidas, insecticidas y antibióticos (Trujillo, 2004).

El tiempo de exposición y las concentraciones adecuadas del desinfectante son aspectos necesarios para lograr una buena desinfección de los explantes. Esto varía en dependencia del tipo de explante, de la planta con la que se trabaje y del tipo de sustancia química empleada (Hurtado y Merino, 1988). En la práctica esto se establece experimentalmente por ensayo y error.

4.5.2 Porcentaje de explantes quemados

El impacto de la fase de establecimiento del cultivo no está limitado solamente al aspecto sanitario de los explantes sino también a la supervivencia de los mismos. Por tal razón, en esta investigación se estudió el porcentaje de explantes quemados, efecto del empleo del alcohol y cloro como agentes desinfectantes.

El 58.61% de los explantes de *Nepeta* presentaron necrosis en los tejidos, posiblemente producto del efecto tóxico del compuesto químico sobre los tejidos vegetales debido a la fragilidad del tejido epidérmico del material vegetal. Resultados similares han sido observados por diversos autores como Rodríguez *et al.* (1999) y Villalobos (1982) en el cultivo del Lirio con concentraciones al 3% de NaOCl y tiempos de 15 a 20 minutos.

La Tabla 3.5 indica que se reportaron diferencias significativas para el factor alcohol, no así para el factor cloro ni tampoco para la interacción alcohol x cloro (tratamientos). Esto demuestra que el alcohol si influye en la necrosis

del tejido celular. Cuando se aplicó alcohol al 70% por 30" se obtuvo un porcentaje de explantes quemados del 71%, mientras que cuando no se aplicó dicha solución el promedio de explante quemados disminuyó al 46%.

El alcohol (etanol) como agente desinfectante tiene un gran poder de penetración, lo que facilita una correcta desinfección de los explantes, se usa en concentraciones del 70%, ya que el alcohol al 90% deshidrata demasiado. Sin embargo, la exposición prolongada es capaz de disolver la capa epicuticular, dañando así el tejido vegetal (Trujillo, 2004). Según Hurtado y Merino (1988) basta sumergir el material vegetal en alcohol etílico al 70% durante 30 segundos para eliminar las grasas de las hojas y permitir una mejor penetración del agente desinfectante en el material. Por otro lado, unos cuantos segundos de alcohol no son suficientes para matar a todos los microorganismos, por lo que generalmente se combina esta desinfección con el tratamiento con hipoclorito (sodio o calcio).

En la Tabla 3.6 se puede observar que con el tratamiento 5 se obtuvo el menor porcentaje de explantes quemados (38.33%), este tratamiento no utiliza alcohol, únicamente cloro 20% por 2', lo que ratifica lo expuesto anteriormente. Por el contrario, cuando se aplicó 30" de alcohol 70% y 0' cloro 20% se obtuvo el mayor porcentaje de muerte de los explantes (78.33%).

4.5.3 Número de explantes sanos

En la Tabla 3.9 podemos observar que el mayor número de explantes sanos se obtuvieron con el tratamiento 5 (0" alcohol 70% + 2' cloro 20%), es decir sin la aplicación de alcohol. Al aplicar este tratamiento se obtuvo el menor porcentaje de explantes quemados (38%), a pesar de haber obtenido una contaminación del 53%. Los explantes que no están quemados aunque sí contaminados, son todavía viables porque sus tejidos están vivos y se seguirán desarrollando, posiblemente para bajar la carga microbiana sea necesario realizar otros lavados incorporando en la desinfección algún tipo de agente biocida.

4.6 Fase de multiplicación

4.6.1 Índice de propagación

Cuando en el medio de cultivo se añadió como regulador de crecimiento BAP, el número de brotes aumentó a medida que aumentaba la concentración de la citoquinina (Figura 3.9), a pesar de que el tamaño de los brotes iba disminuyendo. Se pudo observar el efecto inductor en la brotación al adicionar de 1 a 2 ppm de la citoquinina. Las concentraciones por debajo de 0.5 ppm no fueron suficientes para impulsar la brotación de las yemas porque se observó una respuesta más baja; con esta concentración a las cuatro semanas del cultivo *in vitro*, se obtuvo un promedio general de 2.6 brotes por explante; mientras que con la concentración de 2 ppm se logró triplicar la respuesta.

Estos resultados concuerdan con lo establecido por Skoog y Miller (1957), quienes plantearon que un balance favorable a las citoquininas impulsa el desarrollo de los brotes foliares. Del mismo modo, se observa que los resultados coinciden con los reportados en otras experiencias similares. Papadatau *et al.* (1990) obtuvieron la mayor tasa de regeneración de brotes foliares al cultivar material juvenil en el medio Rugini para olivo con 2 ppm de BAP. Amin y Jaiswal (1988) reportaron la brotación de yemas de plantas adultas de guayabo al suplementar al medio de cultivo con 1 ppm de BAP, mientras que Loh y Rao (1989) determinaron un efecto óptimo de BAP en la brotación de yemas al suplementar al medio con 0.1 ppm de la misma citoquinina. Lo anterior indica que el nivel de requerimiento de BAP podría estar estrictamente relacionado con la edad de la planta progenitora, constitución genética de las plantas y el efecto del medio ambiente en donde se desarrolla el individuo.

Estadísticamente se reportaron diferencias significativas para la variable índice de propagación. En la Tabla 3.11 se puede observar que los tratamientos 4 (1.5 ppm BAP) y 5 (2 ppm BAP) están ocupando el mismo rango de significancia y se ubican como los mejores en las tres réplicas del ensayo realizadas. Es decir, para esta investigación el mayor índice de propagación se obtuvo con la adición de 1 o 2 ppm de BAP al medio de cultivo.

Las altas concentraciones de BAP (2 ppm) estimularon una mayor formación de brotes; sin embargo, los brotes producidos se caracterizaron por ser de poca longitud con entrenudos demasiado cortos. Mientras que con una concentración más baja de BAP (1 ppm), se produjo menor número de brotes pero con alturas que permiten continuar con la multiplicación por presentar entrenudos más largos.

4.6.2 Porcentaje de presencia de raíz

Cabe destacar que para esta variable no se analizó la cantidad ni la calidad de raíz, únicamente se cuantificó la presencia de raíz en los explantes.

Estadísticamente se reportaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados para la variable porcentaje de presencia de raíz. En todos los medios de cultivo se desarrollaron raíces con un promedio general de enraizamiento del 68%; sin embargo la relación citoquinina (BAP) – porcentaje de enraizamiento fue inversamente proporcional; es decir mientras menos BAP tenía el medio de cultivo mayor presencia de raíces se manifestaba, esto concuerda parcialmente con Parraguez (1991) respecto a que las citoquininas anulan la rizogénesis.

La presencia de ANA (0.1 ppm) en el medio de cultivo no tuvo efectos significativos, posiblemente debido a la baja cantidad de auxina utilizada en relación al BAP, lo que explica parcialmente lo afirmado por Parraguez (1991), respecto al antagonismo hormonal, como se puede apreciar en la Figura 3.10 disminuyó el número de raíces por explante mientras la concentración de la citoquinina aumentaba, independientemente de la concentración de ANA que siempre se mantuvo constante. Esto ratifica una vez más el poder de enraizamiento de la especie como tal y no la influencia de la auxina en el medio de cultivo; es decir, aún sin nada de auxinas la planta sería capaz de emitir sus propias raíces.

4.7 Fase de enraizamiento *in vitro*

En esta investigación no se estudió estadísticamente la fase de enraizamiento *in vitro*, porque la planta emitió sus propias raíces tanto en el medio de introducción (MS, suplementado con 1 ppm ANA, 30 g/L sacarosa y 7 g/L agar), como en el medio de propagación (MS, suplementado con 30 g/L sacarosa, 7 g/L agar, 0.1 ppm ANA y BAP en cinco diferentes concentraciones: 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 ppm).

Sin embargo, cabe destacar que los explantes de *Nepeta* después de ser multiplicados pasaron por una fase de preparación del explante para la siguiente fase de aclimatación. Para este propósito se utilizó el mismo medio de cultivo empleado en la fase de introducción (MS, suplementado con 1 ppm ANA, 30 g/L sacarosa y 7 g/L agar) porque como se mencionó anteriormente, en este medio de cultivo la plántula emitió gran cantidad de raíz, suficiente para que la planta pueda ser aclimatada bajo condiciones de invernadero.

Este procedimiento coincide con lo expuesto por Pelacho *et al.* (2007) quienes aseguran que para la fase de enraizamiento *in vitro* es necesario transferir los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contengan auxinas.

Varios autores concuerdan con el hecho de que algunas especies de plantas no necesitan pasar por la etapa de enraizamiento *in vitro* porque emiten sus propias raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo, 2006).

Cuando Murashige (1974) propuso las tres etapas del cultivo *in vitro* (establecimiento, multiplicación y enraizamiento), ya había anticipado que la etapa de enraizamiento se podría o no realizar, dependiendo del nivel de enraizamiento de la especie y que se la podía hacer *in vitro* o *ex vitro*.

Para Pelacho *et al.* (2007) en la fase de enraizamiento *in vitro* se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas; esto guarda

relación con lo observado por Escandón *et al.* (2003), quienes obtuvieron una mayor tasa de enraizamiento en los medios libres de hormonas en la fase de enraizamiento en el cultivo *in vitro* de *Santa Rita* híbrida. Además, los mismos autores mencionan que en los tratamientos que contenían ANA (5 mg/L) se observó un efecto negativo sobre los brotes. Las yemas no sólo no mostraron ningún tipo de desarrollo sino que se hizo notorio un estado de deterioro generalizado, principalmente en las hojas.

De igual manera en otro trabajo de investigación realizado por Carrasco (2003) la adición de auxina (0.1 y 1 ppm de ANA) al medio de cultivo no provocó diferencias significativas en la respuesta obtenida frente al testigo (0 ppm de ANA) en la fase de enraizamiento en el cultivo *in vitro* de Murtilla. Lo cual ratifica una vez más que no todas las especies necesitan de un medio con auxinas para la proliferación de raíces.

4.8 Fase de aclimatación en invernadero

4.8.1 Porcentaje de sobrevivencia

Todas las plántulas de *Nepeta* obtenidas *in vitro* se adaptaron a las nuevas condiciones de invernadero obteniendo un porcentaje de sobrevivencia del 100% para los tres tratamientos de aclimatación propuestos.

Estos resultados indican que la aplicación del cultivo *in vitro* en la propagación masiva de plantas de *Nepeta* produjo resultados favorables al mantener una alta capacidad de éstas para sobrevivir al período de transición que ocurre desde las condiciones de cultivo *in vitro* hasta las de invernadero.

Según Hurtado y Merino (1988) la culminación y el éxito de todo el proceso del cultivo *in vitro* consiste en la adaptación de las plántulas a las nuevas condiciones en el invernadero, puesto que un gran número de plantas micropropagadas no sobreviven al paso desde el cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro*.

La transición entre el ambiente *in vitro*, con un 100% de humedad relativa, a un ambiente *ex vitro* con un porcentaje de humedad menor, es un factor crítico para la sobrevivencia de las plántulas. Además las plántulas *in vitro* viven en un ambiente heterótrofo, donde el medio de cultivo supe los azúcares y otros nutrientes para su desarrollo. Las hojas de éstas plántulas, a pesar de ser verdes, probablemente no son completamente activas para fotosintetizar, no poseen capa cerosa, ni cutícula, lo que las hace más susceptibles durante la fase de aclimatación (Ahuja, 1993).

4.8.2 Altura de la planta

La variable altura de la planta reportó diferencias significativas y según la Tabla 3.15 se presentaron tres rangos de significancia para los tratamientos evaluados. Con el tratamiento 1 (2 semanas en el área de túnel + 2 semanas en el área de propagación) se obtuvieron las plantas más altas, con un promedio de 4.26 cm, que se caracterizaron por ser plantas elongadas, con entrenudos y hojas grandes y pocos brotes. Con el tratamiento 2 (semanas en el área de propagación + 2 semanas en el área de aclimatación) se obtuvieron plantas con un promedio de altura de 3.20 cm que se caracterizaron por ser plantas compactas, con entrenudos cortos, hojas grandes y con mayor número de brotes. El tratamiento 3 (4 semanas en el área de aclimatación) no reportó resultados favorables para esta variable porque las plantas se presentaron bajas (2.66 cm), con entrenudos cortos y hojas pequeñas y cloróticas posiblemente por el exceso de luz que recibieron las plantas al permanecer por cuatro semanas en esta área.

4.8.3 Formación de raíz

Según la Tabla 3.16 la variable formación de raíz reportó diferencias en sus tratamientos con tres rangos de significancia. Con el tratamiento 2 (semanas en el área de propagación + 2 semanas en el área de aclimatación) se obtuvo la mayor formación de raíz, con un promedio de 2.56%, esto es conveniente a la hora de aclimatar la planta porque un sistema radicular bien formado permite que la planta adsorba de mejor manera el agua y los nutrientes que están presentes en el sustrato permitiendo la supervivencia y una mejor adaptación de la planta a las nuevas condiciones en el invernadero.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- 5.1** Se presentó un alto nivel de contaminación fúngica y bacteriana en los explantes de *Nepeta hederacea variegata* lo que dificultó la fase de establecimiento del cultivo.
- 5.2** El tratamiento 5 (0" alcohol 70% + 2' cloro 20%) es el tratamiento óptimo para la desinfección de los explantes de *Nepeta hederacea variegata* en la fase de establecimiento del cultivo porque es el tratamiento con el cual se obtuvieron el mayor número de explantes sanos, vivos y libres de contaminantes exógenos.
- 5.3** Para obtener el mayor índice de propagación en la fase de multiplicación de *Nepeta hederacea variegata* es necesario cultivar los brotes en un medio de cultivo que contenga como base en su composición las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), suplementados con 30 g/L sacarosa, 7 g/L agar, 0.1 ppm ANA y 1.5 ppm BAP, que corresponde al tratamiento 4 en esta investigación.
- 5.4** En esta investigación no fue necesario el estudio de la fase de enraizamiento *in vitro* porque la planta tuvo la capacidad de emitir sus propias raíces en los dos medios de cultivo propuestos.
- 5.5** Antes de que la vitroplanta sea aclimatada en invernadero es necesario pasar por una fase de separación y elongación de los brotes. Para este propósito se debe usar el mismo medio empleado en la fase de establecimiento del cultivo.

5.6 Durante el proceso de aclimatación todas las plantas de *Nepeta hederacea variegata* sobrevivieron al trasplante desde las condiciones *in vitro* hacia las condiciones *ex vitro*.

5.7 El tratamiento óptimo de aclimatación para plantas de *Nepeta hederacea variegata* es el número 2 (semanas en el área de propagación + 2 semanas en el área de aclimatación) porque es con el cual se obtuvo una planta con características superiores que las demás.

5.8 Con la presente investigación se estableció un protocolo de cultivo *in vitro* para *Nepeta hederacea variegata* y se alcanzó satisfactoriamente su aclimatación en invernadero.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

6.1 Se recomienda hacer un seguimiento de la preparación de la planta madre o planta donante en el invernadero, evaluando el programa de fumigación y fertilización que se aplica.

6.2 Al ser 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.

6.3 Los explantes, que se sembraron en el medio de cultivo y que presentaron crecimiento de hongos y bacterias, si es posible se recomienda desinfectarlos nuevamente y volverlos a sembrar en un medio de cultivo limpio para evitar una excesiva pérdida de los explantes en la fase de establecimiento del cultivo.

- 6.4** Esta especie mostró alta sensibilidad a los tratamientos de desinfección propuestos en esta investigación, por lo que se recomienda probar estrategias de desinfección alternativas, combinando biocidas químicos como el PPM (Plant Preservative Mixture).
- 6.5** En los tejidos, los contaminantes de la superficie se eliminan con la desinfección; si se encuentran dentro del tejido su eliminación es muy difícil, por lo que se recomienda probar la inclusión de antibióticos en el medio de cultivo.
- 6.6** En este estudio no se investigó la influencia del tamaño de los explantes. Se conoce que la probabilidad de aislar un tejido limpio, o sea, un explante libre de todo microorganismo es proporcional a su tamaño inicial por lo que se recomienda este tipo de estudio para futuras investigaciones.
- 6.7** Por la buena cantidad de raíz que produce la planta, se recomienda disminuir la concentración de agar a 6 gr/L en la fase de enraizamiento *in vitro* para evitar ruptura de las raíces en el transplante.
- 6.8** En la fase de aclimatación, se recomienda seguir con un estudio de producción de plantas madres formadas en las diferentes áreas de aclimatación, con el fin de evaluar la influencia del área en el número de brotes.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja, M. (1993). Micropropagation. En: Micropropagation of wood plants. Ahuja, M. (eds). Netherlands: Kluwer Academia Publishers.
- Alonso, M. (2002). Biotecnología aplicada a la mejora de Pelargonium. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Amin, M. y Jaiswal V. (1988). Rapid clonal propagation of through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of matures trees. Plant Cell Tissue Organ Culture. **9**: 235-243.
- Arias, O. (1996). Tendencias actuales en la utilización de vitroplantas. En: Resúmenes IV Coloquio de Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba. pp: 12.
- Bhojawani, S. y Razdab, M. (1996). Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a revised edition. Elsevier Editorial, Alemania. pp: 767.
- Bidwell, R. (1979). Fisiología vegetal de las plantas superiores. Ediciones Omega, México. pp: 145-150.
- 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.
- Bonga, J. (1992). Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. En: Tissue culture in forestry. Bonga, J. y Durzan, S. (eds). Martinus Nijhoff, Holanda. pp: 387.
- Bonga, J. y Aderkas, P. (1992). *In vitro* culture of trees. Forestry Sciences. **38**: 236- 240.

- Bouman, F., y Meeuse, A. (1992). Dispersal in Labiatae. En: Advances in Labiate Science. Harley, R. y Reynolds, T. (eds). Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido. pp: 193-202.
- Bressan, P., Kim, Y., Hyndman, S., Hasegawa, P. y Bressan, R. (1982). Factors affecting in vitro propagation of rose. American Society Horticulture Science. **107**: 979-990.
- Carrasco, I. (2003). Multiplicación *in vitro*, enraizamiento y aclimatación en Murtilla (*Ugni molinae* Turcz.). Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Temuco, Chile.
- Cassells, A. (1991). Problems in tissue culture. En: Micropropagation: Technology and Application. Debergh, P. y Zimmerman, R. (eds). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp : 31-44.
- Castillo, A. (2006). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Bioagro. **12**: 32-38.
- 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.
- Chevallier, A. (1996). The Encyclopedia of Medicinal Plants. Dorling Kindersley. Reino Unido. pp: 156-160.
- Debergh, P. (1982). Physical properties of culture media. En: Plant tissue culture. Fujiwara, A. (eds). Japanese Association Plant Tissue Culture, Japón. pp: 135-136.
- Debergh, P. y Maene, L. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae. **14**: 335-345.

- Debergh, P. y Read, P. (1991). Micropropagation. En: Micropropagation: Technology and Application. Debergh, P. y Zimmerman, R. (eds). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp: 1-13.
- Debergh, P. y Zimmerman, R. (1991). Evolution and Automation in Micropropagation and Artificial seed production. En: Micropropagation: Technology and Application. Debergh, P. y Zimmerman, R. (eds). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp : 473.
- Devlin, R. (1980). Fisiología vegetal. En: 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.
- Donnelly, D., Tisdall, L. y Heuser, C. (1993). Acclimatization strategies for micropropagated plants. En : Micropropagation of wood plants. Ahuja, M. (eds). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp: 153-166.
- Doods, H. y Bouman, F. (1982). Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press, USA. pp: 305-323.
- Dustan, D. y Turner, K. (1984). The acclimatization of micropropagated plants. En: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vasil, I. (eds). Academic Press, USA. v 1, pp: 123-129.
- Ellis, M., y Ellis, J. (1985). Microfungi on Land Plants: an Identification Handbook. Croom Helm, Reino Unido. pp: 266-270.
- 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.

- Escandón, A., Ferrari, P., Facciuto, G., Soto, S., Hagiwara, J. y Acevedo, A. (2003). Combinación de técnicas *in vitro* y *ex vitro* para la micropropagación de Santa Rita (hibr.) una arbustiva de relevancia ornamental. RIA. **32** (1): 111-122.
- Estopá, M. (2005). El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. Bioagro. **3**: 75-80.
- Gamborg, U., Miller, R. y Ojeina, K. (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Plant Cell Reports. **50**: 151-158.
- Gautheret, R. (1983). The nutrition of plant tissue culture. Physiology Plant. **6**: 433-484.
- Gebhard, L., Rodríguez, J., Mafla, G. y Phatak, S. (1983). Plant propagation by tissue culture. Eversley Editorial. Academic Press, Inglaterra. pp : 1-13.
- George, E. (1993). Plant propagation by tissue culture. Everley Editorial. Academic Press, Inglaterra. pp: 25-29.
- George, E. (1996). Problems in initiating and maintaining cultures. En: Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practice. Gill, R. (eds). Exegenetics Ltda, Inglaterra. pp: 638-669.
- Godoy, G. (2004). Micropropagación de plantas. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. **3**: 10-20.
- Grime, J., Hodgson, J., y Hunt, R. (1988). Comparative Plant Ecology: a Functional Approach to Common British Species. Unwin Hyman, Reino Unido. pp: 213-220.

- Grime, J., Mason, G., Curtis, A., Rodman, J., Band, S., Mowforth, M., Neal, A., y Shaw, S. (1981). A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology*. **69**: 1017-1059.
- Henry, D., Gueritte-Voegelein, F., Insel, P., Ferry, N., Bouguet, P., Potier, P., Sevenet, T. y Hanoune, J. (1987). Isolation and characterization of 9-hydroxy-10-trans, -12-cis-octadecadienoic acid, a novel regulator of platelet adenylate cy-clase from *Glechoma hederacea* L. Labiatae. *European Journal of Biochemistry*. **170**: 389-394.
- Hurtado, D. y Merino, M. (1988). Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, México. pp: 15-34.
- Hutchings, M., y Price, E. (1999). *Glechoma hederacea* L. (*Nepeta glechoma* Benth., *N. hederacea* (L.) Trev.). *Biological Flora of the British Isles*. **87**: 347-364.
- 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.
- Kozai, T. (1991). Micropropagation under photoautotrophic conditions. En: Micropropagation: Technology and Application. Azcón, J. y Talón, M. (eds). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp : 447-469.

- Kreutzer, K., y Seibert, P. (1984). Differences in supply of phosphorus and other nutrient elements in the ash lowlands of southern Bavaria. *Journal of Ecology*. **103**: 139-149.
- Krikorian, A. (1991). Propagación clonal *in vitro*. En: 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.
- Lawrence, B. (1992). Chemical components of Labiatae oils and their exploitation. En: Advances in Labiate Science. Harley, R. y Reynolds, T. (eds). Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido. pp: 399-436.
- Leopold, C. y Kriedemann, A. (1975). Plant growth and development. McGraw Hill, USA. pp: 45-58.
- Lindsey, K. y Topping, J. (1993). Embriogénesis: a question of pattern. *Journal of Experimental Botany*. **44**: 359-374.
- Loh, C. y Rao, A. (1989). Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoots formation *in vitro*. *Scientia Horticulturae*. **39** (1): 31-39.
- Marsolais, A., Wilson, D., Tsujita, M. y Seneratna, T. (1991). Somatic embryogenesis and artificial seed production in ornamental plants. *Canadian Journal of Botany*. **69**: 113-120.
- Mascolo, N., Autore, G., Capasso, F., Menghini, A. y Fasulo, M. (1987). Biological screening of italian medicinal plants for antiinflammatory activity. *Phytotherapy Research*. **1**: 28-31.
- Mroginski, L., Sansberro, P. y Flaschland, E. (2006). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. **42**: 481-497.

- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Physiology Plant*. **25**: 135-165.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*. **15**: 473-497.
- Murashige, T. y Tucker, U. (1969). Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Physiology Plantarum*. **87**: 279-285.
- Olivera, 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**: 75-80.
- Orellana, M. (1997). Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla*. King). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica.
- 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.
- Papadatau, P., Pontikis, C., Ephtimiadou, E. y Lydaki, M. (1990). Rapid multiplication of guava seedlings by *in vitro* shoot tip culture. *Scientia Horticulturae*. **45**: 99-103.
- Parraguez, L. (1991). Micropropagación e inducción de variación somaclonal en mora cultivada. *Revista Universidad Católica de Chile*. **12**: 33-35.
- Pelacho, A., Closa, L., Cueva, R., Sanfeliu, J., Badía, J. y Alins, G. Cultivo *in vitro* [en línea]. Unidad de Fisiología Vegetal del Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería de la Escuela Técnica Superior de

Ingeniería Agrícola de Lleida. <http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm>>
[Consulta: 24 mayo, 2007].

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.

Pierik, R. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, España. pp: 15-18, 49-52, 67-80, 109-120.

Qureshi, J. y Saxena, P. (1992). Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium varieties. *Plant Cell Reports*. 11: 443-448.

Ramírez, M. y Salazar, E. (1997). Establecimiento "*in vitro*" de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista Agronómica (Luz)*. **14**: 497-506.

Ramírez, M., León, S. y Urdaneta, A. (1999). Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento "*in vitro*" de *Psidium guajava* L. y *Psidium riedrich thalianum* (Berg) Nierdz. *Revista Agronómica*. **16**: 243-255.

REDBIO. (1998). Informe Red Latinoamericana de Biotecnología. Circular Palacio de las Convenciones Junio 16-20 de 1998, Cuba.

Redenbaugh, K. (1991). Applications of micropropagation to Agronomic Crops. En: *Micropropagation: Technology and Application*. Debergh, P. y Zimmerman, R. (eds). Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp: 285-310.

- 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.
- Rodríguez, J., Vegas, R., Penichet, M., Guerra, I. y Núñez, R. (1999). Caracterización de extractos de *M. royoc* L. para posible uso como materia prima en la elaboración de suplementos dietéticos. Revista Alimentaria de Tecnología e Higiene de los Alimentos. Cuba. **302**: 47-52.
- Segovia, R. y Laing, D. (1991). Casa de malla de tipo II para adaptación de las plantas. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Roca, W. y Mroginski, L. (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia. pp: 130.
- Sinker, C., Packham, J., Trueman, I., Oswald, P. Perring, F. y Prestwood, W. (1985). Ecological Flora of the Shropshire Region. Shropshire Trust for Nature Conservation. **25**: 593-597.
- 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.
- Stahl, E., Datta, S. (1972). Identifications of sesquiterpenoides from *Glechoma hederacea*. Liebigs Society Chemistry. **757**: 23-32.
- 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.

- Thorpe, T. y Murashige, T. (1968). Starch accumulation in shoot forming tobacco callus culture. *Science*. **160**: 421-422.
- Toro, M. (2004). Establecimiento de protocolos para la regeneración *in vitro* de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) variedad Lambert. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Temuco, Chile.
- 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 Bioplantitas, 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.

White, P. (1989). Culture media in plant tissue culture. En: Plant Tissue Culture: methods and applications in agriculture. Thorpe, T. (eds). Academic Press, USA. pp: 1-20.

Zieba, J. (1973). Isolation and identification of flavonoids from *Glechoma hederacea* L.. Journal of Pharmacology. **25**: 593-597.

Ziv, G. y Halevy, J. (1983). Tissue Culture: Applications and Limitations. Plant Tissue Culture. **21**: 56-59.

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Cristina Alexandra Recalde Bastidas

COORDINADOR DE LA CARRERA

M.Sc. Mónica Jadán

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Vinicio Zabala

Sangolquí, 18 de Junio del 2007

LISTADO DE ANEXOS

PÁGINAS

ANEXO A. Composición de cuatro medios básicos para el cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	78
ANEXO B. Programa de Fertilización NuevoSol Plantas Cía. Ltda.....	79
ANEXO C. Programa de Aplicación de Fertilizantes NuevoSol Plantas Cía. Ltda.....	80
ANEXO D. Rotación y frecuencia de agroquímicos para manejo de plagas y enfermedades NuevoSol Plantas Cía. Ltda.....	81
ANEXO E. Protocolo de desinfección del material vegetal.....	82
ANEXO F. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog MS.....	84
ANEXO G. Preparación del medio de cultivo de Murashige y Skoog, MS.....	84
ANEXO H. Protocolo de aclimatación de vitroplantas a condiciones de invernadero.....	85
ANEXO I. Resultados de la evaluación del porcentaje de explantes contaminados obtenidos de los diferentes tratamientos de desinfección aplicados a los explantes de <i>Nepeta hederacea variegata</i> en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	86
ANEXO J. Resultados de la evaluación del porcentaje de explantes quemados obtenidos de los diferentes tratamientos de desinfección aplicados a los explantes de <i>Nepeta hederacea variegata</i> en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	87
ANEXO K. Resultados de la evaluación del porcentaje de presencia de raíz e índice de propagación en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007.....	88
ANEXO L. Resultados de la evaluación del porcentaje de sobrevivencia, altura de la planta y formación de raíz en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.....	91
ANEXO M. Fase de establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	94
ANEXO N. Fase de multiplicación.....	95
ANEXO O. Proceso de aclimatación de vitroplantas a condiciones de invernadero.....	96

ANEXO P. Resultados de los tratamientos de aclimatación en las variables de la altura y formación de raíces en las plantas.....97

LISTADO DE CUADROS

PÁGINAS

Cuadro 1.1 Esquema de micropropagación mediante el uso de meristemas o brotes apicales.....	15
Cuadro 1.2 Conjunto de sustancias que pueden formar parte de los medios nutritivos, para inducir el crecimiento y desarrollo.....	22

LISTADO DE FIGURAS

PÁGINAS

Figura 1.1 Relación entre auxinas y citoquininas.....	28
Figura 3.1 Porcentaje de explantes contaminados para la interacción alcohol x cloro, Tabacundo, 2007.....	42
Figura 3.2 Porcentaje de explantes contaminados para el factor alcohol, Tabacundo, 2007.....	43
Figura 3.3 Porcentaje de explantes contaminados para el factor cloro, Tabacundo, 2007.....	43
Figura 3.4 Porcentaje de explantes quemados para la interacción alcohol x cloro, Tabacundo, 2007.....	44
Figura 3.5 Porcentaje de explantes quemados para el factor alcohol, Tabacundo, 2007.....	45
Figura 3.6 Porcentaje de explantes quemados para el factor cloro, Tabacundo, 2007.....	46
Figura 3.7 Porcentaje de explantes contaminados y quemados obtenidos en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	46
Figura 3.8 Número de explantes sanos obtenidos en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	47
Figura 3.9 Promedio del índice de propagación para las tres réplicas del ensayo en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007.....	48
Figura 3.10 Promedio del porcentaje de presencia de raíz para las tres réplicas del ensayo en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007.....	50
Figura 3.11 Promedio de la variable altura de la planta en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.....	51
Figura 3.12 Promedio de la variable porcentaje de formación de raíz en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.....	52
Figura 3.13 Análisis de frecuencias para la variable formación de raíz en la fase de aclimatación en invernadero.....	53

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Clasificación científica de <i>Nepeta hederacea variegata</i>	4
Tabla 2.1 Condiciones de las áreas de aclimatación dentro de los invernaderos de NuevoSol Plantas Cía. Ltda.....	34
Tabla 2.2 Diferentes tiempos de exposición a agentes desinfectantes en la fase de establecimiento del cultivo.....	36
Tabla 2.3 Diferentes concentraciones de BAP aplicadas en la fase de multiplicación de los brotes.....	37
Tabla 2.4 Diferentes áreas y tiempos aplicados en la fase de aclimatación en invernadero.....	38
Tabla 3.1 Análisis de varianza para la variable porcentaje de explantes contaminados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	41
Tabla 3.2 Promedios para la interacción alcohol x cloro en la evaluación del porcentaje de explantes contaminados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	42
Tabla 3.3 Promedios para el factor alcohol en la evaluación del porcentaje de explantes contaminados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	42
Tabla 3.4 Promedios para el factor cloro en la evaluación del porcentaje de explantes contaminados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	43
Tabla 3.5 Análisis de varianza para la variable porcentaje de explantes quemados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	44
Tabla 3.6 Promedios para la interacción alcohol x cloro en la evaluación del porcentaje de explantes quemados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	44
Tabla 3.7 Prueba de Tukey al 5% para el factor alcohol en la evaluación del porcentaje de explantes quemados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	45
Tabla 3.8 Promedios para el factor cloro en la evaluación del porcentaje de explantes quemados en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	45

Tabla 3.9 Promedios para la evaluación del número de explantes sanos en la fase de establecimiento del cultivo, Tabacundo, 2007.....	47
Tabla 3.10 Análisis de varianza para la variable índice de propagación (IP) en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007.....	48
Tabla 3.11 Prueba de Tukey al 5% para la variable índice de propagación en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007.....	48
Tabla 3.12 Análisis de varianza para la variable porcentaje de presencia de raíz en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007.....	49
Tabla 3.13 Prueba de Tukey al 5% para la variable del porcentaje de presencia de raíz en la fase de multiplicación, Tabacundo, 2007.....	49
Tabla 3.14 Análisis de varianza para la variable altura de la planta en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.....	50
Tabla 3.15 Prueba de Tukey al 5% para la variable de altura de la planta en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.....	51
Tabla 3.16 Análisis de varianza para la variable formación de raíz en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.....	52
Tabla 3.17 Prueba de Tukey al 5% para la variable formación de raíz en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.....	52
Tabla 3.18 Porcentajes de frecuencias de formación de raíz por cada tratamiento en la fase de aclimatación en invernadero, Tabacundo, 2007.....	53