

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**MICROPROPAGACIÓN *in vitro* DE LA ESPECIE
ENDÉMICA: JIGUERÓN (*Aegiphila ferruginea*), PARA
LA PRODUCCIÓN MASIVA Y CONSERVACIÓN DE
ESTA ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ADRIANA SOLEDAD JÁCOME TABANGO

SANGOLQUÍ, 19 de Abril de 2011

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

Adriana Soledad Jácome Tabango

**DIRECTOR DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA**

Ing. Rafael Vargas

DELEGADO UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

Ab. Laura López

Sangolquí, 19 de Abril 2011

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo titulado “Micropropagación *in vitro* de la especie endémica: Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción”, fue realizado en su totalidad por la Srta. ADRIANA SOLEDAD JÁCOME TABANGO como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Salgolquí, 19 de Abril de 2011

MSc. Norman Soria

Ing. Marco Taipe

REVISADO POR:

Ab. Laura López

DEDICATORIA

A mi Madre, quien ha sido siempre un modelo de valentía y entrega en mi vida. A mi Padre, por su confianza y apoyo. A mi querida Hermana y a mi amado Patricio.

Adriana Jácome

AGRADECIMIENTO

A Dios por el regalo de la vida,

A mi familia, por su amor incondicional,

A todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la EPMMOP, por abrirme las puertas del laboratorio para la realización de este proyecto, en especial a los ingenieros Cristian Reyes, Fabián Díaz y Segundo Aguilar,

A mis queridas amigas y amigos por su cariño y apoyo,

A mis compañeras de laboratorio por su inapreciable colaboración en todo momento,

Al MSc. Norman Soria y al Ing. Marco Taipe por su tiempo y paciencia durante el desarrollo de este proyecto.

Adriana Jácome

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE CUADROS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE ANEXOS	xx
RESUMEN	xxi
ABSTRACT	xxii
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	6
1.3 Objetivos de la investigación	8
1.3.1 Objetivo General	8
1.3.2 Objetivos Específicos.....	8
1.4 Marco Teórico	8
1.4.1 La extinción de especies y sus causas	8
1.4.2 El hombre como agente causante de la extinción	9
1.4.3 Indicadores de riesgo de extinción	10
1.4.3.1 Lista roja de la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN).....	10
1.4.3.2 Criterios de clasificación de la UICN	10
1.4.3.3 Especies amenazadas en Ecuador	12
1.4.4 Técnicas utilizadas para la conservación de especies amenazadas ..	16
1.4.4.1 Conservación <i>in situ</i>	16
1.4.4.2 Conservación <i>ex situ</i>	17
1.4.5 Micropropagación de especies amenazadas	26
1.4.6 Fases de la Micropropagación	27
1.4.6.1 Fase 1: Establecimiento del cultivo	28

1.4.6.2 Fase 2: Proliferación o Multiplicación	28
1.4.6.3 Fase 3: Enraizamiento de los brotes	29
1.4.7 Factores que influyen en la Micropropagación	30
1.4.7.1 El explante	30
1.4.7.2 La Planta donadora o Planta Madre	31
1.4.7.3 Composición de los medios de cultivo	32
1.4.7.4 Factores físicos	36
1.4.7.5 Ventajas y desventajas de la micropropagación	36
1.5 Hipótesis	37
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.1 Ubicación Geográfica	38
2.2 Plantas Madres	38
2.3 Recolección del material vegetal de partida	39
2.4 Desinfección de explantes (Fase 0)	40
2.5 Fase de establecimiento del cultivo (Fase 1)	43
2.6 Fase de multiplicación o proliferación de brotes (Fase 2)	47
2.7 Fase de enraizamiento de <i>in vitro</i> plántulas regeneradas (Fase 3).....	50
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	53
3.1 Desinfección de explantes (Fase 0)	53
3.1.1 Contaminación y sobrevivencia	53
3.1.2 Agentes causales para el descarte de explantes	54
3.2 Fase de establecimiento <i>in vitro</i> del cultivo (Fase 1).....	55
3.2.1 Contaminación y sobrevivencia	55
3.2.2 Longitud del brote uno (BRO 1)	56
3.2.3 Longitud del brote dos (BRO 2).....	57
3.2.4 Promedio de longitud de brotes uno y dos (BRO1 y BRO2)	59
3.2.5 Número de brotes	60
3.2.6 Longitud del brotes adicionales	62
3.2.7 Número de nudos	63
3.2.8 Análisis de Componentes Principales (ACP) para la Fase de Establecimiento <i>in vitro</i> de Jiguerón	65
3.2.8.1 Total de la Varianza Explicada	66
3.3 Fase de Multiplicación o proliferación <i>in vitro</i> de brotes (Fase 2).....	66

3.3.1 Primer ensayo de multiplicación	66
3.3.1.1 Contaminación y sobrevivencia	66
3.3.1.2 Longitud de brote uno (BRO1).....	67
3.3.1.3 Longitud de brote dos (BRO 2).....	68
3.3.1.4 Longitud promedio de los brotes uno y dos	69
3.3.1.5 Número de brotes	71
3.3.1.6 Tasa de Multiplicación	72
3.3.1.7 Índice de Brotación	73
3.3.1.8 Análisis de Componentes Principales (ACP) para el primer ensayo de Multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	74
3.3.2 Segundo ensayo de multiplicación	75
3.3.2.1 Contaminación y sobrevivencia	75
3.3.2.2 Longitud de brote uno (BRO1).....	76
3.3.2.3 Longitud de brote dos (BRO 2).....	77
3.3.2.4 Longitud promedio de los brotes uno y dos	77
3.3.2.5 Número de brotes	78
3.3.2.6 Tasa de Multiplicación	79
3.3.2.7 Índice de Brotación	80
3.3.2.8 Análisis de Componentes Principales (ACP) para el primer ensayo de Multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	80
3.4 Fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas regeneradas (Fase 3).....	82
3.4.1 Contaminación y sobrevivencia	82
3.4.2 Porcentaje de vitroplantas enraizadas	82
3.4.3 Número de raíces	83
3.4.4 Promedio de longitud de raíces.....	84
3.4.5 Análisis de Componentes Principales (ACP) para la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de Jiguerón.....	85
3.4.5.1 Análisis del total de Varianza Explicada	86
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	88
4.1 Fase de Desinfección	88
4.2 Fase de establecimiento <i>in vitro</i> del cultivo (Fase 1).....	90
4.2.1 Longitud de brote uno, dos y su promedio	92
4.2.2 Número de brotes	91

4.2.3 Número de nudos	92
4.2.4 Análisis de Componentes Principales (ACP) para la Fase de Establecimiento <i>in vitro</i> de Jiguerón	93
4.3 Fase de Multiplicación o proliferación <i>in vitro</i> de brotes (Fase 2)	94
4.3.1 Primer ensayo de multiplicación	94
4.3.1.1 Longitud de brote uno, dos y su promedio	94
4.3.1.2 Número de brotes	95
4.3.1.3 Tasa de Multiplicación	95
4.3.1.4 Índice de Brotación	96
4.3.1.5 Análisis de Componentes Principales (ACP) para el primer ensayo de la Fase de Multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	97
4.3.2 Segundo ensayo de multiplicación	98
4.3.2.1 Longitud de brote uno, dos y su promedio	99
4.3.2.2 Número de brotes	99
4.3.2.3 Tasa de Multiplicación	100
4.3.2.4 Índice de Brotación	100
4.3.2.5 Análisis de Componentes Principales (ACP) para el primer ensayo de la Fase de Multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	100
4.4 Fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas regeneradas (Fase 3)	101
4.4.1 Porcentaje de vitroplantas enraizadas	102
4.4.2 Número de raíces	102
4.4.3 Promedio de longitud de raíces	102
4.4.4 Análisis de Componentes Principales (ACP) para la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de Jiguerón	103
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	104
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	106
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	107

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.4.1 Tratamientos planteados para la fase de desinfección de explantes	42
Tabla 2.5.1 Tratamientos planteados para la fase de Establecimiento <i>in vitro</i> de Jiguerón	45
Tabla 2.6.1: Tratamientos planteados para el primer ensayo de Multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	49
Tabla 2.6.2. Tratamientos planteados para el segundo ensayo de Multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	49
Tabla 2.7.1 Tratamientos planteados para la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de Jiguerón	51
Tabla 3.1.1.1 Tabla de resumen de los resultados obtenidos en la fase de desinfección de Jiguerón	53
Tabla 3.2.1.1 Porcentajes medios de contaminación, sobrevivencia y descarte en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> de Jiguerón	56
Tabla 3.2.2.1 Análisis de varianza para la longitud del brote uno (BRO 1) a los 7, 14 y 21 días	57
Tabla 3.2.2.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud de brote uno (BRO1) a los 7, 14 y 21 días	57
Tabla 3.2.2.3 Efecto de la dosis de BAP en la longitud de brote uno (BRO1) a los 7, 14 y 21 días	57

Tabla 3.2.3.1 Análisis de varianza del crecimiento del brote dos (BRO 2) a los 7, 14 y 21 días	58
Tabla 3.2.3.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud de brote dos (BRO2) a los 7, 14 y 21 días	58
Tabla 3.2.3.3 Efecto de la dosis de BAP en la longitud de brote dos (BRO2) a los 7, 14 y 21 días	59
Tabla 3.2.4.1 Análisis de varianza del promedio de longitud de brote uno y dos (BRO 1 y BRO 2).....	60
Tabla 3.2.4.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en el promedio de longitud de brote uno y dos a los 7, 14 y 21 días	60
Tabla 3.2.4.3 Efecto de la dosis de BAP en el promedio de longitud de brote uno y dos a los 7, 14 y 21 días	60
Tabla 3.2.5.1 Análisis de varianza del número de brotes	61
Tabla 3.2.5.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en el número de brotes a los 7, 14 y 21 días	61
Tabla 3.2.5.3 Efecto de la dosis de BAP en el número de brotes a los 7, 14 y 21 días	61
Tabla 3.2.6.1 Análisis de varianza de la longitud promedio de brotes adicionales	62
Tabla 3.2.6.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud promedio de brotes adicionales a los 7, 14 y 21 días	63
Tabla 3.2.6.3 Efecto de la dosis de BAP en la longitud promedio de brotes adicionales a los 7, 14 y 21 días	63

Tabla 3.2.7.1 Análisis de varianza del número de nudos.	64
Tabla 3.2.7.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en el número de nudos a los 7, 14 y 21 días	64
Tabla 3.2.7.3 Efecto de la dosis de BAP en el número de nudos a los 7, 14 y 21 días	65
Tabla 3.2.8.1.1 Total de la varianza explicada en el modelo ACP de la fase de Establecimiento <i>in vitro</i> de Jiguerón	66
Tabla 3.3.1.1.1 Porcentajes medios de contaminación y sobrevivencia para el primer ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	67
Tabla 3.3.1.2.1 Análisis de varianza de la Longitud de brote uno (BRO1)	67
Tabla 3.3.1.2.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud de brote uno (BRO 1) a los 14, 21 y 28 días	67
Tabla 3.3.1.2.3 Efecto del tipo y dosis de citoquininas en la longitud de brote uno (BRO 1) a los 14, 21 y 28 días	68
Tabla 3.3.1.3.1 Análisis de varianza de la Longitud de brote uno (BRO 2)	69
Tabla 3.3.1.3.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud de brote dos (BRO 2) a los 14, 21 y 28 días	69
Tabla 3.3.1.3.3 Efecto del tipo de citoquinina y sus dosis en la longitud de brote dos (BRO 2) a los 14, 21 y 28 días	69
Tabla 3.3.1.4.1 Análisis de varianza de la longitud promedio de los brotes uno y dos	70

Tabla 3.3.1.4.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud promedio de los brotes uno y dos a los 14, 21 y 28 días	70
Tabla 3.3.1.4.3 Efecto del tipo y dosis de citoquinina en la longitud promedio de los brotes uno y dos a los 14, 21 y 28 días	71
Tabla 3.3.1.5.1 Análisis de varianza del número de brotes	71
Tabla 3.3.1.5.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en el número de brotes a los 14, 21 y 28 días	71
Tabla 3.3.1.5.3 Efecto del tipo y dosis de citoquininas en el número de brotes a los 14, 21 y 28 días	72
Tabla 3.3.1.7.1 Índice de Brotación por tratamiento y distancia entre brotes	73
Tabla 3.3.1.8.1 Análisis del total de varianza explicada del ACP del primer ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	75
Tabla 3.3.2.1.1: Porcentajes medios de contaminación y sobrevivencia en el segundo ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	76
Tabla 3.3.2.2.1 Análisis de varianza de la longitud de brote uno (BRO 1) para el segundo ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	76
Tabla 3.3.2.2.2 Efecto de la dosis de Brasinólida en la longitud de brote uno a los 22, 29 y 36 días	77
Tabla 3.3.2.3.1 Análisis de varianza de la longitud de brote dos (BRO 2).....	77
Tabla 3.3.2.3.2 Efecto de la dosis de Brasinólida en la longitud de brote dos a los 22, 29 y 36 días	77
Tabla 3.3.2.4.1: Análisis de varianza del promedio de brotes 1 y 2	78

Tabla 3.3.2.4.2: Efecto de la dosis de Brasinolida en el promedio de brotes 1 y 2 a los 22, 29 y 36 días	78
Tabla 3.3.2.5.1 Análisis de varianza del número de brotes	78
Tabla 3.3.2.5.2 Efecto de la dosis de Brasinolida en el número de brotes a los 22, 29 y 36 días	79
Tabla 3.3.2.7.1 Índice de Brotación por tratamiento y distancia entre brotes (mm)	80
Tabla 3.3.2.8.1.1 Análisis del total de varianza explicada del ACP del segundo ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	81
Tabla 3.4.1.1 Porcentajes medios de contaminación y sobrevivencia en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de Jiguerón	82
Tabla 3.4.2.1 Porcentajes de vitroplantas de Jiguerón enraizadas en cada tratamiento a los 28 días	82
Tabla 3.4.3.1 Análisis de varianza del número de raíces	84
Tabla 3.4.3.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en el número de raíces a los 14, 21 y 28 días	84
Tabla 3.4.3.3 Efecto de IBA en el número de raíces a los 14, 21 y 28 días	84
Tabla 3.4.4.1 Análisis de varianza del promedio de longitud de raíces	85
Tabla 3.4.4.2 Efecto del tipo de medio de cultivo en el promedio de longitud de raíces a los 14, 21 y 28 días	85
Tabla 3.4.3.5.3 Efecto de IBA en el promedio de longitud de raíces a los 14, 21 y 28 días	85

Tabla 3.4.3.6.1.1 Análisis del Total de Varianza Explicada del ACP para la fase de enraizamiento *in vitro* de Jiguerón 86

Tabla 3.4.3.6.1.1 Análisis del Total de Varianza Explicada del ACP para la fase de enraizamiento *in vitro* de Jiguerón 87

LISTA DE CUADROS

Cuadro 4.1.1 Géneros de bacteria más frecuentemente observados en cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	89
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.4.3.3.1.1. Jiguerón (<i>Aegiphila ferruginea</i> Hayek & Spruce).....	14
Figura 1.4.4.2.1 Esquema General de la Técnica de Micropropagación	26
Figura 2.2.1: Plantas Madre de Jiguerón (<i>Aegiphila ferruginea</i>) de entre 20 y 26 meses de edad, vivero municipal de Cununyacu	38
Figura 2.3.1: Brotes epicórmicos de plantas madre de Jiguerón	40
Figura 2.3.2: En 1. se observan las yemas (meristemos axilares) utilizadas para el proyecto. En 2. se observan las yemas muy pegadas al ápice descartadas para el proyecto debido a su alto porcentaje de contaminación bajo condiciones <i>in vitro</i>	40
Figura 2.4.1: Material vegetal segmentado listo para la fase de desinfección ..	41
Figura 2.4.2: Lavado de material vegetal (solución con detergente y Tween® 20)	41
Figura 2.4.3: A. Cultivo bajo condiciones asépticas. B. Segmentos nodales (con dos meristemos axilares) de Jiguerón cultivados bajo condiciones <i>in vitro</i>	42
Figura 2.5.1: Forma y tamaño de los segmentos nodales para la fase de establecimiento	44
Figura 2.5.2: Cultivo de explantes en medios de cultivo (fase de establecimiento).....	44
Figura 2.5.3: Incubación de explantes en la sala de cultivo <i>in vitro</i> (fase de establecimiento).....	45

Figura 2.5.4: Identificación de brote 1, brote 2, nudos y brotes adicionales para la recolección de datos en cada explante (fase de establecimiento y multiplicación)	46
Figura 2.6.1: A. Explante establecido, se observa el desarrollo de brotes basales y la formación de yemas axilares. B. Brotes tomados de A, antes de extraer sus yemas. C. Yemas axilares tomadas de B	48
Figura 2.6.2: Incubación de yemas axilares en frascos de vidrio. Fase de multiplicación	48
Figura 2.7.1: Cultivo de vitro plántulas regeneradas en la fase 2 (A), en medio de cultivo para su enraizamiento (B y C)	51
Figura 3.1.1.1 Gráfica del total de explantes descartados vs. tiempo de exposición en Hipoclorito de Calcio 20% + Tween 20 para la fase de desinfección de Jiguerón	54
Figura 3.1.2.1 Tipos de contaminantes presentes en los explantes durante la fase de desinfección (A) contaminación bacteriana, (B) contaminación fúngica y (C) explante muerto	54
Figura 3.1.2.2 Frecuencia de los agentes causales para el descarte de explantes en la Fase desinfección de Jiguerón	55
Figura 3.2.6.1 Brotes basales adicionales y normales formados en los explantes a los 21 días	63
Figura 3.2.8.1: Análisis de Componentes Principales para la Fase de Establecimiento <i>in vitro</i> de Jiguerón	65
Figura 3.3.1.6.1: Frecuencia media de la Tasa de Multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	72

Figura 3.3.1.7.1 Frecuencia de las distancias entre brotes en explantes de Jiguerón	73
Figura 3.3.1.8.1 Análisis de Componentes Principales para el primer ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	74
Figura 3.3.2.6.1 Tasa de Multiplicación para el segundo ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón	79
Figura 3.3.2.7.1 Índice de brotación de Jiguerón a los 22, 29 y 36 días para el segundo ensayo de multiplicación <i>in vitro</i>	80
Figura 3.3.2.8.1: Análisis de Componentes Principales (ACP) para la Fase de Multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón con Brasinolida	81
Figura 3.4.3.6.1 Análisis de Componentes Principales para la Fase de Enraizamiento <i>in vitro</i> de Jiguerón	86

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Listado de las principales especies de la flora de las áreas del DMQ	115
ANEXO B: Criterios de Clasificación de la UICN	117
ANEXO C: Componentes de los medios de cultivo MSVG y WPM	119
ANEXO D: Resultados de la Fase de Establecimiento <i>in vitro</i> de Jiguerón (<i>Aegiphila ferruginea</i>)	121
ANEXO E: Resultados del primer ensayo para la Fase de Multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón (<i>Aegiphila ferruginea</i>)	124
ANEXO F: Resultados del segundo ensayo para la Fase de Multiplicación <i>in vitro</i> de Jiguerón (<i>Aegiphila ferruginea</i>)	125
ANEXO G: Resultados de la Fase de Enraizamiento <i>in vitro</i> de Jiguerón (<i>Aegiphila ferruginea</i>)	126

RESUMEN

El Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*) es una especie nativa de los andes ecuatorianos y se encuentra catalogado como especie en peligro según el Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. El objetivo planteado en este proyecto fue: determinar los protocolos para la micropropagación *in vitro* que permitan la producción masiva y conservación de esta especie. Para la desinfección se probaron 5 tratamientos con hipoclorito de calcio al 20% con diferentes tiempos de inmersión (10, 20, 30, 40, 50 minutos), el tratamiento con el menor número de segmentos nodales descartados fue T3 (hipoclorito de calcio al 20% durante 30 min). En la fase de establecimiento se probaron dos tipos de medio de cultivo (MSVG y WPM) y varias concentraciones de BAP (0, 2, 4, 6, 8 μM), el mejor tratamiento para establecer segmentos nodales según el número de nudos, longitud de brotes, número de brotes adicionales y descarte fue T5 (MSVG + 8 μM BAP). En la fase de multiplicación se probaron dos ensayos; en el primer ensayo se probaron dos medio de cultivo (MSVG y WPM) y varias concentraciones de BAP y KIN (4 y 8 μM), el mejor tratamiento para esta fase según el índice de brotación, tasa de multiplicación, número de nudos, longitud de brotes y descarte fue T5 (MSVG + 4 μM KIN); en el segundo ensayo se probaron 0.5, 1.0 y 1.5 ppm de Brasinolida, la mejor dosis según el índice de brotación, tasa de multiplicación y longitud de brotes fue 0.5 ppm. En la fase de enraizamiento se probaron dos tipos de medio de cultivo (MSVG y WPM) y dosis de AIB (5 y 0 μM), el mayor número de raíces por vitroplanta (5.08) se obtuvo con el tratamiento W5 (WPM/2 + 5 μM AIB).

ABSTRACT

Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*) is an Ecuadorian endemic tree, and it is an endangered specie according to the data of the “Red Book of Endemic Species of Ecuador” published in 2000 by the UICN. The objective of this study was to develop an efficient micropropagation protocol in order to conserve and increase the number of this plant. For disinfection phase five treatments with calcium hypochlorite (20%) were tested at different immersion periods, the less number of nodal segments for discard was obtained with T3 (calcium hypochlorite 20% for 30 minutes). In the Establishment phase two kinds of media (MSVG and WPM) and several concentrations of BAP (0, 2, 4, 6, 8 μ M) were tested, the best results obtained according to the number of nodes, number of additional buds and discard percentage was with T5 (MSVG + 8 μ M BAP). In the Multiplication phase two trials was carried out; in the first trial two kinds of media (MSVG and WPM) and several concentrations of BAP y KIN (4 y 8 μ M) were tested, the best results obtained according to the budding rate, multiplication rate, number of nodes, buds length and discard percentage was with T5 (MSVG + 4 μ M KIN); in the second trial several concentrations of Brassinolide (0.5, 1.0 y 1.5 ppm) were tested, the best results obtained according to the budding rate, multiplication rate and buds length was with BRA1 (MSVG + 0.5ppm). In the Rooting phase two kinds of media (MSVG and WPM) and several concentrations of IBA (5 y 0 μ M) were tested, the best results obtained according to the number of roots and roots length was with W5 (WPM/2 + 5 μ M IBA).

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema.

El Ecuador es el país que posee el mayor número de especies por unidad de área en América del Sur. Tiene el 10% de todas las especies del mundo y un 20% de especies consideradas endémicas de un total aproximado de 16.000 especies de plantas vasculares. El endemismo alcanza un 20% en la Costa y un 15% en el Oriente, en tanto que en los flancos de la cordillera de los Andes llega al 25%, es decir que la diversidad es mayor en las altitudes medias que en las bajas. Se calcula que en la región interandina existen unas 10.500 especies de plantas (2.000 en las alturas y 8.500 en los valles y en los flancos de las cordilleras que corresponden a boques húmedos tropicales). (Bustos, 2008)

Una especie se considera endémica cuando está restringida a un solo lugar y no existe en ningún otro. Al lugar donde se desarrolla la especie endémica se denomina área de especiación activa. La conservación del endemismo demanda que las áreas de especiación activa no sean afectadas por la acción humana y mantengan sus características y condiciones naturales (Coloma y Ron, 2001).

El endemismo y la alta concentración de especies ubican al Ecuador dentro de los hot spots¹, lugares donde la protección es considerada como alta prioridad. (Coloma y Ron, 2001)

Las plantas endémicas del Ecuador están abrumadoramente concentradas en la zona andina. La alta densidad de endémicas en los

¹ Los hot spots son "lugares de situación crítica bajo amenaza" que ocupan menos del 5% de la superficie terrestre y que conserva alrededor del 50% de las especies del planeta, y están en proceso de deterioro acelerado.

Andes es especialmente impactante, ya que las tierras altas cubren el área más pequeña de las tres regiones continentales. En el Ecuador las tasas de endemismo son inversamente proporcionales al tamaño de las regiones y además el autor menciona que, es probable que el endemismo crezca en los años venideros debido a que la mayoría de nuevas endémicas que se describen son en los Andes (Valencia *et al.*, 2000).

Históricamente la zona andina ha estado densamente poblada y su vegetación natural ha sido modificada durante miles de años. La región está fuertemente amenazada por la deforestación. (Ulloa & Jørgensen, 1995).

El fomento a la colonización, la actividad pecuaria y la modernización del agro promovió un modelo de producción extensivo, convirtiendo suelos de bosques en tierras agrícolas. En veinte años el país quintuplicó la cantidad de suelo destinado a pastizales, en doce años se aumentó en un 172% las tierras destinadas a monocultivos. El crecimiento de los monocultivos no tradicionales expande la frontera agrícola a costa de la depredación del bosque, depredación vinculada a la extracción de madera (Bustos, 2008).

Los datos relacionados con la tasa de deforestación a nivel nacional varían. El ritmo de deforestación más aceptado por cifras oficiales para el decenio 1985-1996, es de 360.000 hectáreas anuales.

Según datos tomados del Instituto Geográfico Militar se piensa que en el año 1991 existían 12.114.299 hectáreas de bosques húmedos en el Ecuador. El CLIRSEN (Centro de Levantamientos Integrados de Recursos Naturales por Sensores Remotos), utilizando información satelital con tecnología actualizada, realizó el inventario de los Recursos Naturales del país determinado que en el período 1991-2000 se han deforestado 1'782.832 hectáreas. Esta información lleva a la FAO a considerar al Ecuador entre los 10 países del mundo con una de las

tasas más altas de deforestación. El CLIRSEN afirma que de 1980 a 1990 la deforestación del bosque tropical fue de 15,5 millones de hectáreas; de 1990 a 2000 se tuvo una pérdida de 8,9 millones de hectáreas y entre el 2000 y 2005, la pérdida anual neta de superficie forestal fue de 7,3 millones de hectáreas. Reporta para 2006 una tasa de deforestación anual de 198.000 hectáreas (Bustos, 2008).

Menos del 3% de la superficie de la sierra se encuentra en masas boscosas naturales (CESA, 1992). Los remanentes de vegetación original en el callejón interandino son muy escasos, algo más frecuentes en las vertientes externas de la cordillera, sobre todo hacia la región Amazónica (Ulloa & Jørgensen 1995). Sin embargo, todos estos remanentes están en riesgo de desaparecer (Cuamacás *et al.*, 1995). Este proceso de degradación de los ecosistemas naturales avanza de manera conjunta con el proceso de pérdida y degradación de los conocimientos tradicionales campesinos sobre las especies nativas, este último es, incluso, más acelerado (CESA, 1992).

La pérdida de los bosques está vinculada a efectos como la regulación hídrica, la captación de anhídrido carbónico del aire (que contribuye a reducir el efecto invernadero), la regulación del clima, la pérdida de biodiversidad, los desequilibrios biológicos que afectan el reciclamiento de nutrientes y el funcionamiento de los ciclos de los ecosistemas naturales y productivos. Así también la deforestación es la principal causa de erosión de los suelos, la contaminación y degradación de los cursos de agua por el arrastre de sedimentos y otros materiales, la pérdida de barreras naturales ante inundaciones y deslizamientos. La erosión, sumada a la pérdida de recursos hídricos, deriva en procesos de desertificación. Esta es una realidad común a los páramos de toda la región de la Sierra, solo en Chimborazo, el 70% de la vegetación originaria ha sido destruida; esto significa deforestación y eliminación de la vegetación nativa. El 55% del territorio provincial está afectado por procesos erosivos y el 79% de la población está en

situación de pobreza. En resumen, la deforestación afecta drásticamente el desarrollo integral humano (Bustos, 2008).

Datos científicos recientes muestran que la mayoría de extinciones se han producido en los últimos ciento cincuenta años. Esto nos muestra la agresiva intervención humana a través de modelos de desarrollo devastadores de los bienes naturales. El desarrollo científico y la existencia de organizaciones preocupadas por la biodiversidad hoy en día nos permiten contar con registros de las especies en peligro. La pérdida de la biodiversidad se compila en las llamadas Listas Rojas. Estas listas se construyen sobre categorías establecidas por la UICN (Unión Mundial para la Naturaleza). (Bustos, 2008)

Un balance realizado en el 2003 por la UICN alerta que cientos de plantas desaparecen rápidamente en Ecuador. Estos datos fueron revelados al presentar su "Lista Roja de Especies", en cuya elaboración han participado científicos y conservacionistas de todo el mundo, y que incluye un total de 12.259 especies amenazadas en las categorías de "peligro crítico", "peligro" y "vulnerable".

Este año, 1.164 especies de plantas del Ecuador han sido incluidas en la Lista Roja y 813 de éstas están amenazadas. El Jiguerón es una especie nativa de los andes ecuatorianos, la cual figura en esta lista como especie en "peligro" (Santiana y Pitman, 2004).

El Jiguerón se encuentra entre las principales especies de la flora de las áreas del DMQ (Anexo A). (CESA, 1992)

Sin embargo en el vivero, el proceso de propagación a partir de semilla es lento, debido a complicaciones en la calidad de las semillas y en el poco interés que se presta a la propagación de esta especie.

En cuanto a la calidad de las semillas, éstas presentan un bajo porcentaje de germinación, lo cual influye directamente sobre el número

de plántulas obtenidas mediante la técnica de siembra tradicional. La falta de interés por la propagación de esta especie se ve reflejada en el desabastecimiento de semillas de esta especie por parte del Banco de Semillas del Vivero, esto ha llegado a tal punto que, al momento, el Banco de Semillas ya no cuenta con semillas de Jiguerón.

En todo el Vivero de la EPMMOP, solo existen 100 plantas de Jiguerón de 18 meses de edad, las cuales son la base para la realización de este proyecto.

Campañas de reforestación.

Con los objetivos de recuperar masa biótica, mejorar las variables ambientales y estéticas, el Municipio del DMQ crea proyectos de Forestación y Reforestación, y como ente ejecutor, coordina acciones con las dependencias municipales relacionadas con el tema.

Para llevar a cabo estos proyectos el Municipio cuenta con varios viveros en los cuales se desarrollan más de un millón de árboles, arbustos nativos e introducidos adaptados a los diferentes pisos climáticos del Distrito para arborización urbana y para recuperar mediante repoblación forestal las micro cuencas que abastecen de agua potable a Quito y demás parroquias del Distrito Metropolitano (Gangotena, 1990).

Es importante resaltar que las especies mayormente incluidas para los proyectos de Forestación y Reforestación son exóticas y que éstas especies tienen un efecto destructivo sobre el suelo, lo cual puede llevar incluso a la inutilización de terrenos, pérdidas de cosechas y de la biodiversidad (Mack *et al.*, 2000). Un claro ejemplo de introducción de especies exóticas destructivas en los bosques es sin duda el eucalipto. El eucalipto es una especie nativa de Australia, a la cual se le atribuye características que favorecen el deterioro de los suelos y de las fuentes de agua de los lugares en donde son sembrados (Hofstede *et al.*, 1998).

Como se puede ver, aún culturalmente no se ha hecho énfasis en el hecho de que lo que se necesita, es el tipo adecuado de árboles para el tipo adecuado de ecosistemas.

1.2 Justificación del problema.

Debido a la problemática ya mencionada, los investigadores nacionales, apoyándose en las técnicas de *cultivo in vitro*, se encuentran dando los primeros pasos en busca del desarrollo de protocolos que permitan mejorar la reproducción vegetativa de especies forestales nativas para obtener altas tasas de multiplicación y en un futuro mejorar las características tanto genéticas como fenotípicas de dichas especies.

El Laboratorio de Micropropagación es una iniciativa de la Gerencia de Parques y Jardines de la Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas, creado para mejorar el servicio de conservación del ambiente urbano y las condiciones de habitabilidad y calidad de vida de los habitantes del Distrito Metropolitano de Quito. Este laboratorio incentiva la conservación ambiental mediante la investigación científica y la innovación tecnológica, la cual contribuye significativamente a un mejor desarrollo del espacio público a través del desarrollo de varios proyectos para la investigación y producción masiva de especies ornamentales y agroforestales, las cuales son de especial interés para los programas de arborización y reforestación de la ciudad.

Como respuesta a la excelente apertura por parte de la Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas, se propone la realización del presente proyecto, en el cual se plantea la propagación masiva de la especie Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*) ya que se trata de una especie en peligro de extinción y de la cual se desconocen sus características ya que es muy poco conocida.

El desarrollo de los protocolos de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de Jiguerón beneficiará principalmente al Laboratorio de Micropropagación ya que contará con una importante herramienta biotecnológica que contribuirá sólidamente en la conservación y propagación de esta especie, satisfaciendo así, el interés de la EPMMOP por incrementar el número de especies nativas para incluirlas en los programas de reforestación que lleva a cabo el Municipio (Gangotena, 1990). Con lo cual, se renovarían los ecosistemas nativos cada día más escasos (Suárez, 2008) los cuales son fuente de vida y de conservación de las lluvias (Estrella, 1996).

Además, al incluir esta especie en las campañas de reforestación se contrarrestarían los ya mencionados problemas de invasión por parte de especies exóticas introducidas (Gangotena, 1990).

Datos recientes muestran que la capacidad de reforestación del país es de aproximadamente 2'938.000 hectáreas (10,8%) de tierras sin bosque. Esto vuelve a la actividad forestal de producción o protección una actividad prometedora (Bustos, 2008).

Por otro lado, al contar con un mayor número de plantas de Jiguerón, se podrá aumentar la difusión de esta especie, con ello la gente se familiarizaría con su presencia y como consecuencia, se fomentaría la investigación acerca de los recursos que posea esta especie. Resultaría interesante realizar un estudio con los extractos de esta planta, ya que algunas especies, pertenecientes a su mismo género, muestran cualidades medicinales muy interesantes, como por ejemplo, *Aegiphila panamensis* contiene un antídoto contra la mordedura de serpiente, por lo que en algunos lugares de Panamá, se le conoce como “contraculebra” (Sánchez, 2001). Los diterpenos aislados de *Aegiphila lhotzkyana*, aún bajo estudios, presentan acción potencialmente inhibidora de proliferación de tumores en animales (Costa, 2004).

Al contar con mayores poblaciones de estas plantas y con el conocimiento generado a través de sus estudios, se podrán generar estudios de carácter molecular como por ejemplo el uso de marcadores moleculares para la investigación de diversidad genética con miras a la conservación de germoplasma, identificación genotípica de materiales, marcación de genes prioritarios para el mejoramiento, etc.

1.3 Objetivos de la investigación.

1.3.1 Objetivo General.

- ✓ Determinar los protocolos más apropiados para la micropropagación *in vitro* de Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*) que permitan la producción masiva y conservación de esta especie endémica en peligro de extinción.

1.3.2 Objetivos Específicos.

- ✓ Determinar un protocolo óptimo de desinfección que permita obtener explantes libres de contaminantes microbianos exógenos.
- ✓ Determinar el mejor tratamiento para el establecimiento *in vitro* a partir de yemas axilares de Jiguerón.
- ✓ Determinar el tratamiento que permitan la mayor obtención de brotes *in vitro* de Jiguerón.
- ✓ Determinar las tasas de multiplicación de Jiguerón.
- ✓ Determinar el tratamiento que permita el desarrollo de raíces *in vitro* de Jiguerón.

1.4 Marco Teórico.

1.4.1 La extinción de especies y sus causas.

La extinción es un evento que se presenta cuando una región o todo el planeta experimenta cambios o alteraciones ambientales drásticas frente

a los cuales los organismos residentes no son capaces de responder adaptativamente; entre estos cambios podemos citar: aumento o disminución de la temperatura global, cambios en el régimen de la pluviosidad, procesos orogénicos como el desplazamiento de las placas y la fragmentación de hábitats, competencia entre las poblaciones por los recursos del ambiente y la llegada de nuevos organismos ante un sistema ecológico totalmente nuevo. Estas extinciones de ocurrencia ordinaria permiten que la selección natural opere y las especies con mejores condiciones físicas, genéticas y de adaptación ecológica, sobrevivan y dejen descendencia, mientras las especies menos favorecidas desaparecen (Castellanos, 2006).

1.4.2 El hombre como agente causante de la extinción.

Queda claro que la extinción es un evento natural que afecta con mayor o menor proporción y a diferentes tasas de velocidad a todos los grupos de organismos. Sin embargo, en la actualidad, el problema radica en que la intervención del hombre sobre el ambiente y la diversidad biológica está provocando la mayor extinción en masa de todos los tiempos. Esto está ocurriendo en un lapso de tiempo muy corto y a una velocidad muy acelerada, generando la pérdida permanente de especies que, como en el caso de Colombia y otros países tropicales, no poseen inventarios completos de su biota (Llosa, 2001).

Las actividades humanas que desencadenan la extinción son: la deforestación, la expansión de la frontera agrícola, la conversión de sabanas en tierras de pastoreo, la destrucción de los arrecifes de coral, y la construcción de caminos y represas de agua. Algunos de estos sucesos son los responsables de la pérdida definitiva de muchas especies en América latina; cuando un hábitat natural es fragmentado, las poblaciones se dispersan, se reduce su diversidad genética y el sistema ecológico se vuelve insostenible. (Castellanos, 2006)

1.4.3 Indicadores de riesgo de extinción.

Biólogos e investigadores ambientales en su afán de generar políticas de conservación de los recursos naturales, han creado una serie de categorías y listas que indican el riesgo de extinción al que está sometida la riqueza biológica. Este es el punto de partida para formular programas que estimulen la educación ambiental, el rescate del conocimiento etnobiológico, el uso y valoración de la biodiversidad y la elaboración de inventarios bióticos; de tal forma que estas estrategias permitan reducir el impacto causado en la naturaleza por la acción humana. Bajo este contexto, la Lista Roja elaborada por la Unión Mundial para la Naturaleza es la más difundida de las clasificaciones de los estados de conservación de las especies (Castellanos, 2006).

1.4.3.1 Lista roja de la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN).

La Unión Mundial para la Naturaleza (UICN) es la entidad internacional que cataloga, monitorea y evalúa el estado de conservación de las plantas raras o en peligro a nivel mundial. Ofrece el mejor conocimiento disponible sobre las especies amenazadas, algo necesario para poner en marcha acciones de conservación en profundidad. Pero para frenar la pérdida de biodiversidad se necesitan también voluntad política y recursos. Las actividades humanas han constituido, dentro de los últimos 100 años, la principal amenaza para las especies, pero los humanos también podemos y debemos ayudar a su recuperación (Escribano, 2004). La actualización de 2003 de esta monumental base de datos cuenta con más de 2.000 entradas nuevas y modificaciones en los 380 taxones que han sido revisados (Escribano, 2004).

1.4.3.2 Criterios de clasificación de la UICN.

Para clasificar el estado de conservación de una especie (sea esta un árbol, una ballena, un pájaro o un hongo) la UICN juzga su

distribución, abundancia, historia, y dinámica de poblaciones según un grupo de criterios establecidos y decide hasta qué grado la especie está en peligro de extinción. Luego se asigna una categoría que resume el estado de conservación de la especie y este permanece en efecto hasta que la información nueva indique que es necesario un cambio. Una vez asignadas las categorías, éstas se usan para priorizar los esfuerzos de conservación hacia aquellas especies que corran el mayor peligro de extinción (Valencia *et al*, 2000).

Las categorías de la UICN son: Extinto (EX), Extinto en la naturaleza (EW), El peligro crítico (CR), El Peligro (EN), Vulnerable (VU), Casi Amenazado (NT), Preocupación Menor (LC), Datos Insuficientes (DD) y No Evaluado (NE). Los criterios para las categorías En peligro Crítico, En Peligro y Vulnerable se detallan en el apartado de Anexos (Anexo B) (Valencia *et al*, 2000).

Hasta el momento se han catalogado como amenazadas un total de 12.529 especies de todo el mundo. Se cree que este dato es un indicador de lo que le está ocurriendo globalmente a la diversidad biológica. Otro dato preocupante ofrecido por la UICN es que 700 especies amenazadas no gozan de ningún tipo de protección legal en ninguna de sus áreas de distribución. Para otras, la situación es aún peor, son ya 762 especies las registradas como extintas, de las cuales sólo 58 mantienen un hilo de esperanza al mantener algunos ejemplares en cultivos o cautividad. Algo que tienen muy claro los responsables del Programa de la Lista Roja es que una base de datos como ésta tiene que servir necesariamente para estudiar las tendencias de los diferentes grupos taxonómicos. Por eso, desde 1996 se vienen haciendo periódicamente análisis más exhaustivos de los datos. Cada cuatro o cinco años se lee con lupa la información obtenida y se la compara con la de años anteriores. El primero de estos análisis reveló que una de cada cuatro especies de mamíferos y una de cada ocho especies de aves se encontraban al borde de la extinción. El vigor biológico del planeta obtuvo peor nota en el año

2000, ya que si los porcentajes antes citados no habían variado de manera significativa, lo que sí aumentó fue el grado de amenaza de numerosas especies. Las catalogadas En Peligro Crítico elevaron su número de 169 a 180, en el caso de los mamíferos, y de 168 a 182 en el de las aves; mientras que el número de especies En Peligro aumentó en 25 mamíferos y 86 aves. Este segundo test supuso un serio revés para los primates, que pasaron de 13 a 19 especies en Peligro Crítico. En uno o dos años tendremos una nueva comparación y podremos saber cómo le ha ido al planeta (Escribano, 2004).

De momento los científicos de la UICN están reevaluando a todos los mamíferos, unos 6.000; a todas las aves, 10.000 aproximadamente; a unas 5.000 especies de anfibios; a 8.000 de reptiles; 10.000 peces de agua dulce; 1.000 tiburones y rayas y unos 5.000 moluscos de agua dulce. También se están evaluando nuevas especies de plantas, invertebrados y especies marinas. Un esfuerzo con el que se pretende que todas las especies conocidas estén evaluadas para 2008 (Escribano, 2004).

1.4.3.3 Especies amenazadas en Ecuador.

A través de los datos del “Libro Rojo de plantas endémicas del Ecuador” se conoce que, de 1164 especies nuevas que son incluidas a este libro, 813 van a parar a alguna de las categorías de amenaza. Ecuador es considerado como una zona extremadamente importante para la conservación de las especies vegetales, no sólo por su exuberancia, sino también por la existencia de cuatro regiones amenazadas en una superficie similar a la de Italia. A juicio de la UICN habría que potenciar las medidas de conservación en el archipiélago de Galápagos, las tierras bajas de la costa, los Andes y el Amazonas. (Escribano, 2004).

De acuerdo con los objetivos de conservación de este proyecto se hará referencia al caso del Jiguerón (*Aegiphila ferruginea* Hayek y

Spruce), especie que se encuentra catalogada dentro del “Libro Rojo de plantas endémicas del Ecuador”, como especie en peligro de extinción por pérdida de hábitat.

A nivel nacional se han realizado varios estudios en esta especie. Así por ejemplo, en la Escuela de Ingeniería Forestal de la Escuela Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Humanante (2006) elaboró una tesis de investigación con el título “Evaluación de cuatro tratamientos pre-germinativos en Jiguerón (*Aegiphylia ferruginea*) con cuatro tipos de sustratos”.

El INIAP ha llevado a cabo una “Evaluación y mantenimiento del Arboretum de especies nativas en la estación experimental Santa Catalina” para buscar usos potenciales (alimenticios, maderables y medicinales) de varias especies nativas que se encuentran en peligro de deterioro irreversible, entre ellas el Jiguerón (*Aegiphylia ferruginea*).

Hasta el momento, no han sido reportados estudios *in vitro* en Jiguerón por ningún autor nacional o extranjero.

1.4.3.3.1 Características generales del Jiguerón.

El Jiguerón es un árbol endémico del Ecuador (Figura 1.4.3.3.1.1), de mediana altura que se desarrolla en las estribaciones del los Andes entre los 2.000 y 4.000 msnm. Desde el bosque andino alto hasta el paramo húmedo de pajonal y paramo seco. Puede encontrarse de forma silvestre y cultivada, de la cual se conocen varias poblaciones distribuídas desde Carchi hasta Zamora-Chinchipec. Hay una plantación en el Refugio Silvestre Pasochoa, otra cerca de la Reserva Ecológica El Ángel y en el Parque Nacional Cajas (Valencia *et al*, 2000). Pertenece a la familia Verbenaceae.



Figura 1.4.3.3.1.1. Jiguerón (*Aegiphila ferruginea* Hayek y Spruce).

El Ecuador cuenta con 141 especies de Verbenaceae dentro de 22 géneros y un total de 24 especies endémicas, que incluyen hierbas, arbustos y árboles.

Dentro del género *Aegiphila* están representadas 28 especies; 5 especies son propias de los bosques andinos: *Aegiphila bogotensis* (Spreng.) Mold., *A. ferruginea*, *A. monticola* Mold., *A. purpurascens* Mold. y *A. rimbachii* Moldenke.

1.4.3.3.2 Características botánicas esenciales del género *Aegiphila*.

La mayoría de los miembros de este género son árboles, de aproximadamente 12 a 17 metros de alto, sin embargo predominan los de baja estatura. Muchas de las especies varían considerablemente, dependiendo de las condiciones ambientales (Moldenke, 1934).

Las ramas principales y secundarias son tetragonales y subcilíndricas. Las hojas son simples, por lo general su disposición es opuesta por cada par de hojas, se despoja de sus hojas cada año al final del período de cultivo. Presentan inflorescencias cimosas, los cimos a menudo se modifican y se asemejan más a panículas (racimos agrupados), umbelas falsas, algunas presentan glomérulos o

incluso el número se reduce a pocas flores y a veces una sola flor. Las flores son actinomorfas, hermafroditas pero generalmente se visualizan unisexuales o diclinas. El cáliz es gamosépalo más o menos acampanado, ciatiforme o tubular, toma un tamaño enorme y duro cuando hay frutos. La corola es hipógina, gamopétala, infundibular o hipocrateriforme, su tubo es cilíndrico. Los estambres se encuentran entre 4 y 5, isomórficos insertados por debajo del tubo de la corola y encima de su base, por dentro o sobresalido de la corola. Su pistilo es único. Estigma bifido, es alargado y con forma de punzón. El ovario es súpero, perfecta o imperfectamente segmentado en cuatro celdas, cada una de las celdas contiene 1 ovulo. Los óvulos se ubican de forma lateral o alto-lateral a las paredes del ovario, hemianátropo. El fruto es drupáceo, casi siempre contiene 4 semillas. Las semillas no tienen endospermo (Moldenke, 1934).

1.4.3.3.3 Etnobotánica de *Aegiphila ferruginea* Hayek y Spruce

El papel de este árbol en la sociedad ecuatoriana se recoge en la Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador (De la Torre, 2008), detallándose las siguientes características:

Habito: árbol o arbusto, **Origen:** Nativa, endémica, **Nombres comunes:** Balsa, **Etnia:** Kichwa de la Sierra, **Usos:** **Combustible:** Se utiliza para fabricar carbón (Kichwa de la Sierra-Imbabura, Chimborazo). **Materiales:** La madera se usa como materia prima para la fabricación de arados, estacas, muebles y artesanías, en especial para la confección de cucharas (Kichwa de la Sierra-Imbabura, Chimborazo; Etnia no especificada-Carchi). **Medicinal:** la infusión de la planta elimina los piojos (Etnia no especificada-Pichincha). Las hojas se usan para tratar heridas y cólicos (Kichwa de la Sierra-Imbabura, Chimborazo).

1.4.4 Técnicas utilizadas para la conservación de especies amenazadas.

La conservación de la biodiversidad puede, en teoría, aplicarse a tres niveles de organización: génica, organísmica y ecológica. Con los avances de la ingeniería genética en el aislamiento, secuenciación y transferencia de genes, se acerca el momento en el que se establezcan grandes bancos de genes para su conservación. Sin embargo, por el momento, en la mayoría de los casos, los genes no se conservan individualmente, sino formando parte de organismos, poblaciones o ecosistemas. Al igual que los genes de un organismo se asocian entre ellos a través de múltiples interacciones, los individuos de una especie o de diferentes especies interaccionan dentro de un ecosistema. Por ello, cuando se acomete la conservación con el máximo nivel de información –el ecosistema–, no sólo se conservan cada uno de sus componentes, sino también todas sus relaciones recíprocas (Iriondo, 2001).

1.4.4.1 Conservación *in situ*.

La conservación *in situ* de especies amenazadas implica una adecuada protección y gestión de sus ecosistemas. Existe un gran número de figuras de protección de espacios naturales en donde la actividad humana queda condicionada o restringida en mayor o menor medida. No obstante, frecuentemente la simple restricción de la actividad humana en el entorno no resulta suficiente para asegurar la supervivencia de las especies a conservar (Falk, 1989).

La gestión activa de un ecosistema para conservar una determinada especie puede requerir medidas de intervención, como la preservación del medio físico en el que se desarrolla la especie amenazada, la potenciación de interacciones con otros organismos que lleven implícito un beneficio para la especie amenazada, y el establecimiento de programas de reforzamiento de poblaciones existentes, reintroducción en localidades donde la población ya se haya

extinguido o, incluso, la introducción de nuevas poblaciones (Falk, 1989).

El proceso de conservación *in situ* se inicia con el estudio y seguimiento en el tiempo de las poblaciones, recabando datos demográficos, genéticos y autoecológicos. La utilización de técnicas de análisis de viabilidad de poblaciones constituye otra herramienta de gran valor por su capacidad diagnóstica y su poder de evaluación al considerar diferentes alternativas de gestión (Gillman, 1997).

A menudo, las actividades de conservación *in situ* se encuentran con problemas de aplicación derivados de la necesidad de establecer marcos legales de protección de las áreas y hábitats pertinentes, de conflictos de interés con otras actividades humanas, y de falta de una asignación continuada y a largo plazo de recursos económicos a las instituciones encargadas de las tareas de conservación. A esto cabe añadir, en numerosas ocasiones, la falta de una información básica sobre la biología de las especies a conservar. Este tipo de limitaciones conlleva la necesidad de desarrollar métodos de conservación *ex situ*, o conservación fuera del hábitat natural, que sirvan para complementar las acciones tomadas en los hábitats naturales (Ramanatha & Riley, 1994).

1.4.4.2 Conservación *ex situ*.

Mientras está universalmente aceptado que el mecanismo más efectivo y eficiente para la conservación es la protección de los hábitats, también está reconocido que las técnicas de conservación *ex situ* constituyen componentes críticos en un programa de conservación global (Dodds, 1991).

Los programas de conservación *ex situ* complementan la conservación *in situ* almacenando a largo plazo germoplasma representativo de las poblaciones, permitiendo un mejor conocimiento

de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado, y proporcionando propágulos para su utilización en programas educativos, programas de mejora genética de especies cultivadas y en planes de reforzamiento, reintroducción o introducción (Ramanatha & Riley, 1994).

Los métodos de conservación *ex situ* implican la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética de una especie y su mantenimiento fuera de las condiciones naturales en las que la especie ha evolucionado. Las ventajas que proporcionan estos métodos son control directo sobre el material, fácil accesibilidad y disponibilidad (Ramanatha & Riley, 1994).

Una vez realizada la recolección del material a conservar, la conservación *ex situ* de especies amenazadas consta de dos elementos esenciales: el almacenamiento o preservación del germoplasma y el desarrollo de métodos que posibiliten su propagación. No obstante, también deben tenerse presentes otros elementos relevantes tales como la documentación y la caracterización del germoplasma almacenado (Hummer, 1999).

1.4.4.2.1 Almacenamiento de germoplasma.

El almacenamiento de germoplasma de especies amenazadas tiene lugar en forma de colecciones de plantas y en los bancos de germoplasma (Dodds, 1991).

Colecciones de plantas.

Las colecciones de plantas constituyen el método tradicional de conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Bajo esta denominación se pueden considerar tanto los jardines botánicos como las colecciones de plantas en campo. Los jardines botánicos pueden considerarse las primeras instituciones implicadas en la

conservación *ex situ* de recursos vegetales. El establecimiento de colecciones de diferentes tipos de plantas se remonta a la antigüedad, estando en muchos casos vinculado a prácticas religiosas. Sin embargo, el gran desarrollo de los jardines botánicos tal como los conocemos en la actualidad llegó de la mano de las grandes potencias coloniales, que establecieron numerosos jardines en sus posesiones de ultramar y en sus propios países como método de introducción de plantas y cultivos exóticos.

En la actualidad hay cerca de 1.500 jardines botánicos por todo el mundo, de los cuales más de 500 desarrollan actividades de conservación. Los jardines botánicos cultivan alrededor de 80.000 especies, de las cuales un 10 % se encuentra en peligro de extinción. Ello pone de manifiesto la importante contribución de la red de jardines botánicos a la conservación de especies amenazadas (Iriando, 2001).

La conservación en jardines botánicos presenta una serie de problemas derivados de su irregular distribución por el mundo y del escaso soporte financiero que reciben para su mantenimiento. Así, por ejemplo, existen 532 jardines botánicos en Europa y solamente 82 en África y 66 en América del Sur. En los países tropicales, donde reside el mayor número de especies, es donde menos jardines botánicos hay. Por ello, en el conjunto de los jardines botánicos, la flora de los países tropicales y subtropicales se encuentra peor representada que la de los países de climas templados (Ramanatha & Riley, 1994).

Bancos de germoplasma.

La conservación *ex situ* de germoplasma de especies raras y amenazadas está basada esencialmente en la utilización de los bancos de germoplasma. Los bancos de germoplasma son centros orientados al almacenamiento mediante propágulos de una parte

representativa de la variabilidad genética correspondiente a una determinada especie. Dentro de esta categoría podemos distinguir los bancos de semillas, los bancos de cultivo *in vitro*, los bancos de polen y los bancos de genes o bancos de ADN (Miller, 1995).

Bancos de semillas.

El almacenamiento de semillas ha interesado a la humanidad desde el inicio de la Agricultura hace 10.000 años. Los antiguos agricultores almacenaban semillas para su utilización en la siembra del siguiente año o como reserva de alimento. Sin embargo, no es hasta mediados del presente siglo cuando se inicia de forma sistemática el almacenamiento de semillas con fines científicos o de conservación. El almacenamiento del material a conservar en forma de semillas constituye uno de los procedimientos de conservación *ex situ* más válidos y extendidos en la actualidad. Se ha podido comprobar que el almacenamiento de semillas a largo plazo constituye una operación relativamente simple y económica en términos de tecnología, infraestructuras, personal y gastos de mantenimiento. De esta manera, resulta posible mantener un gran número de semillas de diferentes especies vegetales durante largos períodos de tiempo y con un mínimo riesgo de daños genéticos. Las semillas presentan una serie de características que hacen que su almacenamiento sea el método más eficaz y económico para la conservación *ex situ* de especies vegetales. Por un lado, las semillas son unidades adaptadas a la dispersión en el tiempo y, por tanto, capaces en la mayoría de los casos de permanecer viables, de forma natural, durante largos períodos de tiempo. En segundo lugar, el pequeño tamaño de las semillas, unido a la posibilidad de que cada una de ellas posea una constitución genética diferente, asegura la conservación de una gran diversidad genética en un espacio reducido (Iriondo & Pérez, 1999).

La conservación de semillas posee mayores requerimientos técnicos que las colecciones de plantas. Sin embargo, estas últimas resultan caras en términos de mano de obra y espacio, y sólo permiten el mantenimiento de un número reducido de individuos por especie. Además, las colecciones de plantas resultan vulnerables frente a desastres naturales como incendios, tornados, plagas y enfermedades. La conservación de semillas ofrece como mínimo un servicio de seguridad y apoyo a otras técnicas de conservación, mientras que, en el otro extremo, puede constituir la única opción disponible cuando los últimos ejemplares de una especie están a punto de desaparecer. Por ello, entre todos los métodos de conservación, los bancos de semillas son los más utilizados al ser simultáneamente prácticos y económicos (Miller, 1995).

Bancos de cultivo *in vitro*.

Si bien la conservación *ex situ* en bancos de semillas constituye la alternativa más utilizada, en ciertas especies surgen problemas de propagación o conservación que impiden o dificultan el uso de dicha solución. Este sería el caso de: a) especies con semillas recalcitrantes; b) especies que no producen semilla, con baja o nula fertilidad o con producción reducida de semillas o de polen; c) clones con elevado grado de heterocigosis que han sido seleccionados por sus características en una población natural y que deben ser mantenidos mediante propagación vegetativa. La conservación por semilla permite el almacenamiento de los genes del clon, pero puede resultar difícil recuperar la combinación heterocigótica para la que fueron seleccionados los clones; d) especies perennes con ciclos de vida muy largos que no producen semilla hasta cierta edad. Estas especies se suelen propagar vegetativamente para acortar la entrada en producción, aunque posean semillas viables y con capacidad de ser conservadas en un banco de germoplasma; e) especies con una población natural extremadamente reducida donde la mera recolección de semillas

pueda afectar a la supervivencia de la población. En estos casos, las técnicas de almacenamiento o conservación *in vitro* constituyen una alternativa válida a la conservación de semillas de especies raras o amenazadas (Pence, 1999).

Los protocolos de conservación *in vitro* se atienden, en todos los casos, a las siguientes etapas: a) obtención del explante; b) establecimiento del cultivo; c) almacenamiento; d) recuperación de un cultivo viable; e) regeneración de plantas (Dodds, 1991). En este protocolo el almacenamiento es normalmente la etapa que implica más costo, tanto en equipamiento como en personal. En el caso de que el cultivo se mantenga en condiciones normales (crecimiento continuo), los repicados deberán hacerse en intervalos que oscilarán de varios días a varios meses, dependiendo del tipo de cultivo y de las especies. Además, en estas circunstancias, los subcultivos están expuestos a un continuo riesgo de pérdidas por accidente o contaminación, a lo que hay añadir el riesgo de alteraciones genéticas (variación somaclonal) (Pence, 1999).

Bancos de ADN.

Con el avance de las técnicas de ingeniería genética que posibilitan la transferencia de genes entre especies totalmente distintas, una nueva alternativa que comienza ahora a perfilarse es la instalación de bancos de ADN. Entre sus ventajas están la pequeña cantidad de material vegetal necesaria para su almacenamiento y la posibilidad de transferir genes a genotipos o especies relacionadas. Esta técnica puede ser utilizada con especies amenazadas o incluso extintas tomando muestras del material en vivo o a partir de especímenes de herbario. En los bancos de ADN, el ADN extraído de individuos de una determinada población se almacena a bajas temperaturas (congeladores a -80°C o tanques de nitrógeno líquido). En la actualidad, esta alternativa sólo presenta utilidad en el caso de especies o géneros cuyo genoma ha sido

profundamente estudiado y donde se conocen las secuencias de numerosos o importantes genes. Sin embargo, es posible que en un futuro este tipo de bancos vaya extendiéndose a medida que se vayan implantando las técnicas de ingeniería genética en los procesos de mejora y obtención de nuevos cultivares (Pence, 1999).

Otros bancos de germoplasma.

Los bancos de polen y los bancos de yemas vegetativas son otras dos opciones de conservación que en principio podrían ser aplicables a la conservación de especies raras o amenazadas. En ambos casos, el almacenamiento se realiza a bajas temperaturas, siendo aplicables las técnicas de crioconservación. Los bancos de polen tienen la ventaja de que requieren un mínimo espacio y resultan aplicables tanto a especies con semillas ortodoxas como a especies con semillas recalcitrantes. Los bancos de yemas vegetativas se utilizan en la actualidad en la conservación de clones de especies frutales y requieren la puesta a punto de la técnica de injerto sobre planta patrón. Esta técnica podría ser aplicable a determinados casos de especies arbustivas o arbóreas en peligro de extinción (Pence, 1999).

1.4.4.2.2 Propagación.

Una componente fundamental de la conservación *ex situ* de especies raras o amenazadas consiste en el desarrollo de métodos de propagación y cultivo que posibiliten la utilización del material almacenado en operaciones de conservación *in situ* como reforzamientos, reintroducciones o introducciones, en estudios científicos para un mejor conocimiento de la especie o en ámbitos de divulgación cultural y educativa como jardines botánicos o centros de interpretación de espacios naturales (Miller, 1995).

Propagación por semilla.

Tanto en angiospermas como en gimnospermas el método más habitual de propagación es a partir de semillas. El período que comprende desde la germinación de la semilla hasta el establecimiento de las plántulas es el más vulnerable de todo el ciclo vital, ya que la semilla en germinación está expuesta a drásticas variaciones en contenido de humedad y temperatura y las plántulas son muy susceptibles a daños por plagas y enfermedades y a la competencia con otras plantas (Iriondo & Pérez, 1999).

El período de germinación se caracteriza a través de dos parámetros: el porcentaje de semillas que germinan y la velocidad de germinación. Cuando estos parámetros se estudian bajo condiciones ambientales óptimas controladas resulta posible estimar la germinabilidad intrínseca y el vigor de una muestra de semillas. Estos factores dependen esencialmente de la existencia de dormición, la presencia de infecciones microbianas, el tamaño de la semilla, su edad y las condiciones de almacenamiento. Mientras en las semillas de plantas cultivadas la germinabilidad de las semillas ha sido tan mejorada que no se tiene casi en consideración, la baja germinación de una muestra de semillas de especies silvestres puede constituir una grave limitación para una propagación efectiva (Iriondo y Pérez, 1999).

Propagación vegetativa.

Estas técnicas se han desarrollado a lo largo de varios siglos y la investigación en este campo es todavía muy activa. Su utilización en el campo de especies vegetales amenazadas reside fundamentalmente en los jardines botánicos, a la hora de multiplicar material vegetal para su exposición o con fines de estudio o intercambio. No obstante, estas técnicas también pueden ser utilizadas de cara a la obtención de material vegetal para

actuaciones de reforzamiento, introducción o reintroducción cuando la reproducción por vía sexual no resulta factible o eficaz. En estos casos se debe tener la precaución de mantener controlada la identidad genética del material propagado y de tener en cuenta, no sólo la producción de un determinado número de individuos, sino también la producción de un mínimo número de genotipos distintos.

Existe un amplio abanico de técnicas de propagación vegetativa y la elección de la más adecuada pasa por tener previamente un profundo conocimiento de la morfología de la especie y de la existencia de algún medio de propagación vegetativa natural en la misma (Hartmann *et al.*, 1997). Si bien la propagación por esquejes o estaquillas de tallo es la técnica más utilizada, no deben olvidarse otras posibilidades, como división de mata, división de rizomas, tubérculos y estolones, propagación por bulbos, pseudobulbos o bulbillos, propagación mediante esquejes de hoja, propagación a partir de raíces y propagación por injerto (Hartmann *et al.*, 1997).

Micropropagación.

Las técnicas de cultivo *in vitro* han sido utilizadas de forma extensiva en la propagación y conservación de recursos fitogenéticos en agricultura (Figura 1.4.4.2.1). De igual manera estas técnicas han sido adaptadas para su utilización en un amplio rango de especies silvestres con problemas de propagación por métodos convencionales y/o con poblaciones extremadamente reducidas (Dodds, 1991).

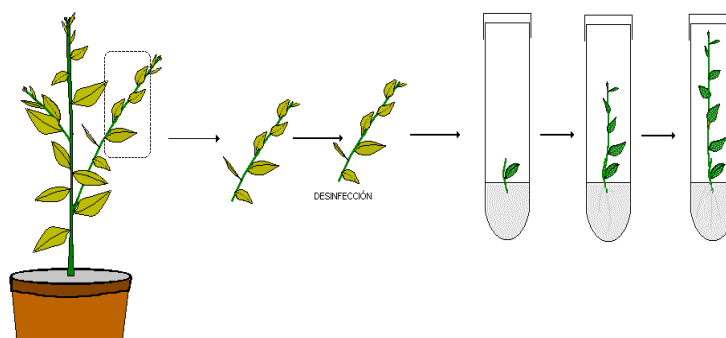


Figura 1.4.4.2.1 Esquema General de la Técnica de Micropropagación.

1.4.5 Micropropagación de especies amenazadas.

A medida que más y más especies de plantas se consideran raras o amenazadas, la necesidad de protegerlas y salvarlas de la extinción se vuelve más urgente. La biotecnología es la herramienta de innovación tecnológica actual que se presenta como alternativa para contribuir a la conservación de la biodiversidad genética de éstas especies (Loyola, 2006)

La micropropagación es un término que se usa para describir un proceso de cultivo de tejidos vegetales, el cual es ampliamente utilizado para la propagación vegetativa *in vitro* de plantas (Loyola, 2006).

La micropropagación se lleva a cabo de la siguiente forma: una pequeña parte de tejido vegetal, libre de patógenos exógenos, o explante es tomado de la planta donadora y es cultivado en un medio nutriente en recipientes estériles. Mediante la variación en la composición del medio (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, reguladores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos, entre otros) y las condiciones ambientales (temperatura, intensidad de luz y periodo, humedad y otros), el desarrollo del tejido o explante puede ser dirigido a través de diferentes vías hasta que finalmente una planta intacta sea regenerada. Toda la progenie proviene de una sola planta, a esta progenie se la denomina clones (Loyola, 2006).

La regeneración de plantas se basa en la teoría de que todas las células vegetales tienen capacidad para formar plantas completas, es decir, que tienen **totipotencialidad** (Hartmann *et al.*, 1997), y puede llevarse a cabo a través de varias rutas. La **organogénesis**, se refiere a la vía morfo genética que sigue el explante para llegar a convertirse en plántula. Dependiendo del tipo de explante puede seguir las siguientes rutas, organogénesis directa, organogénesis indirecta, embriogénesis directa, embriogénesis indirecta (Rojas, 2003).

La organogénesis directa consiste en la generación de plantas sin raíces directamente del explante, esta ruta generalmente se sigue cuando se utiliza meristemas vegetativos o laterales. En la organogénesis indirecta, el explante genera la formación de una masa indiferenciada de células llamada callo, a partir de éste se forman partes vegetativas diferenciadas como brotes, o raíces, de las cuales se obtiene una plántula según sea la especie y las hormonas utilizadas. Este es el caso principalmente del cultivo de protoplastos. Cuando se trata de embriogénesis directa, previa a la generación de la plántula se requiere la formación de un embrión de origen sexual que llegará a ser una planta completa, es el caso de explantes provenientes de granos de polen que forman un embrión haploide, o embriones diploides de semillas o tejido ovular. En la embriogénesis indirecta, el explante genera la formación de una masa indiferenciada de células (callo) a partir de éste se forman embriones somáticos, de cual se obtiene la plántula según sea la especie y las hormonas utilizadas. Este es el caso de secciones de tallo, hoja, raíz y protoplastos (Rojas, 2003).

1.4.6 Fases de la Micropropagación.

Murashige (1974) ha propuesto tres pasos o fases fundamentales para propagar eficientemente una especie: 1) el establecimiento aséptico del cultivo; 2) su proliferación o multiplicación; y 3) el enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo.

1.4.6.1 Fase 1: Establecimiento del cultivo.

Una vez que se ha seleccionado el explante, se requiere desinfectarlo superficialmente ya que en el medio de cultivo pueden desarrollarse hongo o bacterias que competirán con el explante. Para esta desinfección se emplean diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el alcohol a diferentes porcentajes y otros. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de exposición a ellos, se determina, en gran medida, por las características del explante; en la práctica, se establecen experimentalmente por ensayo y error (Roca, 1991).

Después de la desinfección y bajo condiciones de total asepsia, se cultiva el tejido en el medio de cultivo escogido, para la esterilización interna del tejido, se pueden adicionar al medio productos como fungicidas sistémicos y bactericidas como antibióticos esto ayuda a prevenir la presencia de agentes contaminantes. Cuando hay contaminación, para la determinación del agente contaminante (hongo o bacteria) se observa el patrón de densidad del patógeno y el tiempo de ocurrencia de esta contaminación (Rojas, 2003).

En esta primera fase, se induce el desarrollo de los meristemas o la embriogénesis por medio del empleo de citoquininas (López, 2004).

1.4.6.2 Fase 2: Proliferación o Multiplicación.

Una vez que el explante se ha adaptado a las condiciones de laboratorio, sin presentar ningún tipo de contaminación endógena o exógena, es transferido a un nuevo medio de cultivo, con adición de algunos biorreguladores cuyo balance favorece a las

citoquininas, necesarias en el proceso de organogénesis (Rojas, 2003).

Por medio de la inducción de brotes adventicios se incrementa el número de plantas que se derivan de una sola planta madre, este proceso puede repetirse varias veces (subcultivos) (López, 2004).

El número de subdivisiones depende de la especie pero en general no se puede exagerar este proceso porque pueden haber efectos negativos en las vitroplántulas, por ejemplo pueden haber cambios genéticos por la acción de las hormonas (Rojas, 2003).

La tasa de multiplicación es muy importante en términos de eficiencia (biológica y económica), es decir, el número de propágulos, la rapidez en el crecimiento, en la formación de embriones somáticos o en brotes formados a partir del explante inicial, según sea el caso (Rojas, 2003).

1.4.6.3 Fase 3: Enraizamiento de los brotes.

Este proceso de enraizamiento de los brotes propagados, requiere generalmente un trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Además se requiere disminuir la cantidad de citoquininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citoquininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Villalobos, 1983).

Si el sistema radical fue diferenciado *in vitro*, las plantas no se pueden trasplantar directamente a las condiciones de invernadero sin una paulatina adaptación a las condiciones del suelo (Roca, 1991).

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

Al final de esta etapa deberá quedar formada completamente la vitroplanta (Rojas, 2003).

1.4.7 Factores que influyen en la Micropropagación.

Los factores que influyen drásticamente en la micropropagación son: el explante, la planta donadora, la composición de los medios de cultivo y los factores físicos (luz y temperatura), a continuación se detallan éstos factores.

1.4.7.1 El explante.

El explante y su procedencia son importantes tanto para su disponibilidad como para su manipulación. Es necesario utilizar material establecido en invernadero y viveros que permitan reducir la incidencia de microorganismos patógenos y así obtener una respuesta rápida del explante, los materiales a cultivar deben proceder de plantas jóvenes (Escalante, 1995).

El explante es una parte del tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta para ser cultivado en condiciones *in vitro*, sobre un medio de cultivo. Los explantes pueden provenir de raíces, hojas, meristemos vegetativos o reproductivos, semillas, tallos, ápices, yemas axilares, tejido ovular, anteras, granos de polen, etc. (Roca, 1991).

En la mayoría de los casos, la micropropagación se lleva a cabo utilizando yemas o meristemos caulinares como material de partida. Los meristemos tienen la ventaja de ser un material muy estable desde un punto de vista genético y de encontrarse normalmente libre de virus. No obstante, a menudo resulta difícil su utilización debido a que su manipulación es más compleja a consecuencia de su reducido tamaño (0,2 - 1,0 mm) y al largo período de tiempo requerido para el desarrollo de los tallos. Debido a ello es más frecuente la utilización de explantes caulinares constituidos por el meristemo apical y uno o más nudos, debido a que son más fáciles de manipular, se establecen rápidamente y a menudo proliferan bien (Iriondo, 2001).

Las yemas axilares a partir de brotes epicórmicos se generan a partir de yemas latentes y se caracterizan por tener un crecimiento vigoroso alcanzando grandes dimensiones en relativo poco tiempo. (Caso, 1992). La propagación *in vitro* a partir de brotes epicórmicos es una técnica muy útil para la producción clonal de especies forestales (Castro, 1999)

Se ha observado que la edad fisiológica de los explantes tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado este el tejido que se va a cultivar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos, 1982).

1.4.7.2 La Planta donadora o Planta Madre.

Las plantas madres de las cuales se toman los primeros explantes deben ser sanas y poseer características varietales conformes con la variedad elegida. En poco tiempo se obtendrá un elevado número de plantas sanas genéticamente iguales a la planta madre. (Hartmann *et al.*, 1997)

Se ha observado que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas con diferentes edades fisiológicas (Styer, 1983)

1.4.7.3 Composición de los medios de cultivo.

La composición de los medios de cultivo utilizados, en cada caso, variará de acuerdo a los requerimientos de las diferentes especies y a las condiciones particulares de cada laboratorio, no siempre fácilmente reproducibles. La experiencia indica que son múltiples las variables que inciden en el cultivo. Por tanto, el origen y edad de las explantes, presencia de contaminantes y respuesta a los diferentes medios, son puntos importantes a solucionar para la iniciación del cultivo. Lograr el ajuste de la técnica implica obtener brotes homogéneos para enraizar y plantas adaptadas capaces de sobrevivir a las condiciones ambientales naturales. A la mayoría de los medios de cultivo se les adiciona compuestos denominados fitohormonas o también llamados hormonas vegetales. Estas son sustancias químicas producidas por algunas células vegetales en sitios estratégicos de la planta y estas hormonas son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas. (Roca, 1991)

Las fitohormonas se producen en pequeñas cantidades en tejidos vegetales, a diferencia de las hormonas animales, sintetizadas en glándulas. Pueden actuar en el propio tejido donde se generan o bien a largas distancias, mediante transporte a través de los vasos xilemáticos y floemáticos. Las hormonas vegetales controlan un gran número de sucesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación. Una fitohormona interviene en varios procesos, y del mismo modo todo proceso está regulado por la acción de varias fitohormonas. Se establecen fenómenos de antagonismo y balance hormonal que conducen a una regulación precisa de las funciones

vegetales, lo que permite solucionar el problema de la ausencia de sistema nervioso. Las fitohormonas ejercen sus efectos mediante complejos mecanismos moleculares, que desembocan en cambios de la expresión génica, cambios en el citoesqueleto, regulación de las vías metabólicas y cambio de flujos iónicos (Garnica, 2005).

La adición de estas fitohormonas al medio en diferentes proporciones puede estimular o detener el crecimiento o diferenciación de algunos órganos de la planta. Por eso con la utilización de éstos, en diferentes concentraciones y la mezcla de varios, se puede manipular algunos procesos morfo genéticos de la planta. Los principales reguladores de crecimiento son: auxinas, citoquininas, giberelinas (GA_3), ácido abscísico (ABA). (Rojas, 2003)

1.4.7.3.1. Auxinas.

Las auxinas son el grupo más conocido de fitorreguladores o fitohormonas que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; aunque también se ha encontrado que al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos (Rojas, 2003).

Promueve el desarrollo de raíces laterales y adventicias, no se conoce exactamente como actúan las auxinas en la formación de raíces. Pueden intervenir factores distintos, como los vinculados con la nutrición (en los tejidos caulinares son muy importantes los hidratos de carbono y las sustancias nitrogenadas). Inhibe el desarrollo de las yemas axiales, dando origen una dominancia apical (Roca, 1991).

Las auxinas más usadas en la práctica son el ácido indol butírico (AIB), ácido indo acético (AIA), ácido 2, 4

diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido α -naftalén acético (ANA) (Roca, 1991).

En la práctica, el uso de las auxinas es un arte. Generalmente solo se utiliza una auxina cada vez. Sin embargo, para algunos investigadores ocasionalmente ha sido útil el uso simultáneo de dos auxinas en una misma fórmula del medio de cultivo. Ya que varias auxinas parecen tener diferentes sitios de acción, en ciertos casos podría ser conveniente ensayarlas (Roca, 1991).

1.4.7.3.2 Citoquininas.

Las citoquininas constituyen un grupo de hormonas vegetales que promueven la división y la diferenciación celular. Entre sus efectos fisiológicos se destaca que regulan la formación y el desarrollo del tallo. En cultivo *in vitro*, las citoquininas promueven la formación de tallos en diversos tipos de explantes, como callos, hojas y cotiledones de diversas especies. Regulan la síntesis de pigmentos fotosintéticos en los cloroplastos junto con otros factores como la luz y el estado nutricional de la célula (Rojas, 2003).

Entre las citoquininas naturales se encuentran: Zeatina (ZEA), isopentil-adenina, dimetil amino purina, dihidroxizeatina y metilzeatina. La Kinetina (KIN) y el 6-bencilaminopurina (BAP) son sintéticas. El BAP se utiliza actualmente tal vez más que la KIN o la ZEA. Es un compuesto muy activo, poco fotosensible y se encuentra disponible, fácilmente, a un costo más o menos razonable (Roca, 1991)

1.4.7.3.3 Brasinoesteroides.

Los brasinoesteroides son compuestos naturales que se encuentran en pequeñísimas cantidades en los órganos de las plantas, preferentemente en los tejidos y órganos más jóvenes. El primero de estos compuestos fue aislado del polen de la *Brassica napus* (Mitchell *et al.*, 1970) y el esclarecimiento de su estructura se realizó en el año 1979 por científicos norteamericanos por espectroscopía y cristalografía de rayos X (Mandava, 1988).

Debido a la intrigada actividad fisiológica de la brasinolida en las plantas y sus usos agrícolas potenciales, en la actualidad muchos esfuerzos están siendo realizados en el descubrimiento, análisis, extracción, aislamiento, síntesis, biosíntesis, metabolismo, actividad fisiológica y aplicaciones prácticas en la agricultura (Clouse & Sasse, 1998).

Entre los efectos fisiológicos de brasinoesteroides se puede mencionar que:

- Influye o dirige procesos de movilización dentro de las plantas.
- En cultivo de tejidos, en presencia de auxinas y citoquininas, estimula el crecimiento de callos induciendo el alargamiento y la división celular.
- Estimula la actividad fotosintética acelerando la fijación de CO₂
- Incrementa la biosíntesis de proteínas y el contenido de azúcares reductores.
- Promueve la elongación de tejidos vegetales.

En la actualidad se conocen más de 45 miembros de la familia de los brasinoesteroides, por lo que constituyen una amplia familia de compuestos, de potente actividad biológica (Clouse & Sasse, 1998).

1.4.7.4 Factores físicos.

Los factores físicos que influyen de forma significativa en la micropropagación son: la luz y la temperatura.

Investigaciones recientes han comprobado que la luz es un factor fundamental en la morfogénesis. El papel de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperiodo y la calidad (Villalobos, 1983).

La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28°C. Se han realizado pruebas variando los regímenes de temperatura en el día y en la noche, y se ha encontrado únicamente en un reducido número de especies tal variación es ventajosa (Villalobos, 1983).

1.4.7.5. Ventajas y desventajas de la micropropagación.

Las ventajas potenciales del uso de sistemas de cultivo in vitro pueden ser enormes, entre los que se encuentran:

- Las altas tasas de multiplicación que se consiguen,
- La de ser un cultivo aséptico que puede mantenerse libre de hongos, bacterias, virus e insectos
- El espacio reducido que ocupan
- La economía frente a colecciones de campo
- Las múltiples aplicaciones en programas de mejora genética (Iriando, 2001).

Sin embargo, las técnicas de micropropagación no están exentas de problemas. En muchos casos, la micropropagación de una especie presenta enormes dificultades debidas a la contaminación del material de partida, la falta de respuesta del explante inicial, la hiperhidratación de los tallos y la ausencia de enraizamiento. Un problema adicional es la posible ocurrencia de variación somaclonal, entendiéndose ésta como la aparición de variación genética en el material vegetal a consecuencia del cultivo *in vitro* (Iriondo, 2001).

1.5 Hipótesis.

El Jiguerón puede ser micropropagado *in vitro* en los medios de cultivo MSVG, WPM y mediante la utilización de los biorreguladores, BAP, KIN, Brasinolida y AIB.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación Geográfica

El proyecto de tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas de Quito (EPMOP). Ubicado en la provincia de Pichincha, perteneciente al Distrito Metropolitano de Quito, con Latitud $0^{\circ}13'59''S$ y Longitud $78^{\circ}25'70''W$ a una altura de 2.300 m.s.n.m. La zona tiene una precipitación media anual de alrededor de 1500 mm, con temperaturas medias anuales de $17.7^{\circ}C$ grados centígrados.

2.2 Plantas Madres

Las plantas madres fueron especies aviveradas de Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*) de entre 20 y 26 meses de edad que se encuentran en el vivero municipal de Cununyacu de la EPMOP (Figura 2.2.1).



Figura 2.2.1: Plantas Madre de Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*) de entre 20 y 26 meses de edad, vivero municipal de Cununyacu.

Estas plantas se encuentran expuestas a las condiciones ambientales del lugar, tales como lluvias, viento y periodos secos; para su protección ante la luz solar directa, las plantas se encontraban bajo un sarán que les proporcionaba entre 40 y 50 por ciento de sombra. Por ello, para un buen mantenimiento se realizaron tratamientos fitosanitarios y fertilizaciones foliares durante los meses de Mayo, Junio y parte del mes de Julio de 2010.

Los tratamientos fitosanitarios se realizaron dos veces por semana, con diferentes compuestos como Mancozeb (Mancozeb 80 g, Inertes 100g), Kocide (46.1% hidróxido cúprico (equiv. de cobre = 30%), Agrigent Plus (Sulfato de gentamicina: 20 g de I.A./kg y Clorhidrato de oxitetraciclina: 60 g de I.A./kg y Phyton (Sulfato de Cobre pentahidratado 21.36 % p/p) de forma rotativa a razón de 1 g.L⁻¹) con el objetivo de reducir la incidencia de agentes patógenos durante las fases de micropropagación *in vitro*.

Los tratamientos de fertilización se realizaron dos veces por semana, con fertilizantes foliares (Kristalon a razón de 1 g.L⁻¹)

2.3 Recolección del material vegetal de partida

Las recolecciones de material vegetal se llevaron a cabo entre las 9 y 11 horas de la mañana, en los días más secos del mes de Julio de 2010, dicho material de partida consistió en tallos de brotes epicórmicos², de entre 5 y 25 cm, tomados a partir de las plantas madre (Figura 2.3.1). Con la ayuda de una tijera de disección, se realizaron escisiones sobre los tallos de tal manera que queden, específicamente, las segundas y terceras yemas axilares (meristemo axilar) contando desde el ápice, descartando las yemas que se ubican pegadas al ápice debido a que, el porcentaje de contaminación por hongos es muy elevado bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Figura 2.3.2). Durante la recolección de los explantes la tijera de

² Los brotes epicórmicos son retoños de una yema durmiente en las zonas leñosas de las plantas. Se caracterizan por tener un crecimiento vigoroso alcanzando grandes dimensiones en relativo poco tiempo (Roca, 1991).

disección utilizada, se iba sumergiendo en una solución de cloro (10%) al 1% (v/v) cada tres cortes realizados a la planta madre.



Figura 2.3.1: Brote epicórmico de plantas madre de Jiguerón.

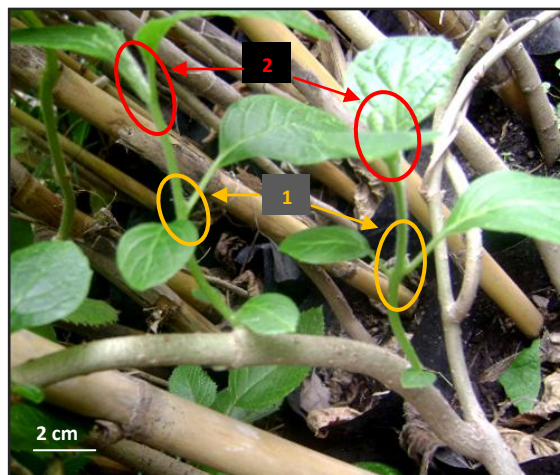


Figura 2.3.2: En 1. se observan las yemas (meristemos axilares) utilizadas para el proyecto. En 2. se observan las yemas muy pegadas al ápice descartadas para el proyecto debido a su alto porcentaje de contaminación bajo condiciones *in vitro*.

2.4 Desinfección de explantes (Fase 0).

Una vez recolectado el material vegetal de partida, se procedió a descartar las hojas de los brotes (epicórmicos) dejando el pecíolo, utilizando unas tijeras de disección desinfectadas con alcohol al 96% (Figura 2.4.1). A los tallos obtenidos se les sometió a un lavado superficial con agua potable para retirar polvo, tierra y otras impurezas (Esquivel, 1994).



Figura 2.4.1: Material vegetal segmentado listo para la fase de desinfección

Con el material ya segmentado, se procedió a realizar tres lavados (Figura 2.4.2) en una solución con detergente y TWEEN® 20 (SIGMA ULTRA) durante 10 minutos (el Tween 20® se añadió en el ultimo lavado), luego se efectuaron cuatro enjuagues con agua destilada, después se colocaron los explantes en una solución de etanol al 70% (v/v) durante un minuto y treinta segundos, finalmente, fueron expuestos a diferentes tiempos (tabla 2.4.1) de hipoclorito de calcio (SIGMA) al 20% y TWEEN® 20. (Esquivel, 1994).



Figura 2.4.2: Lavado de material vegetal (solución con detergente y Tween® 20).

Tabla 2.4.1 Tratamientos planteados para la fase de desinfección de explantes

Tratamiento	Componentes
1	Hipoclorito de Calcio al 20% durante 10 minutos
2	Hipoclorito de Calcio al 20% durante 20 minutos
3	Hipoclorito de Calcio al 20% durante 30 minutos
4	Hipoclorito de Calcio al 20% durante 40 minutos
5	Hipoclorito de Calcio al 20% durante 50 minutos

De forma aséptica, en la cámara de cultivo (STREAMLINE®), se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Luego se realizaron cortes en el material vegetal obteniéndose segmentos nodales (Cada segmento nodal contenía dos meristemos axilares) que posteriormente se cultivaron en tubos de 25x200 (Pierik, 1990) que contenían diferentes tipos de medios de cultivo (Figura 2.4.2).

Los medios de cultivo utilizados se ajustaron a pH 5.8 ± 0.02 (pH-Meter JENWAY) antes de añadir el agar (SIGMA AGAR), y se esterilizaron en autoclave (TRIDENT EA-632) a 121 °C durante 25 minutos (Esquivel, 1994).

Los cultivos se mantuvieron en el cuarto de cultivo a 25 ± 2 °C y fotoperiodo de 16h luz (Roca, 1991) durante 25 días.



Figura 2.4.3: **A.** Cultivo bajo condiciones asépticas. **B.** Segmentos nodales (con dos meristemos axilares) de Jiguerón cultivados bajo condiciones *in vitro*.

Con el objetivo de determinar el mejor tratamiento para esta fase, se evaluaron las siguientes variables: contaminación, muerte y descarte total de los explantes en cada tratamiento. Cada tratamiento probado estuvo constituido por 10 unidades experimentales y tres repeticiones.

La contaminación de los explantes se evaluó mediante la observación visual de hongos, bacterias o la presencia de conjunta de hongos y bacterias. La muerte se evaluó mediante la observación visual de necrosamiento del tejido. Estas evaluaciones se realizaron a los 21 días de iniciada esta fase.

Dentro del análisis de contaminación, además del conteo del número de explantes contaminados, se analizó la frecuencia del tipo de contaminante (Hongo (H) o Bacteria (B)) mediante la elaboración de tablas de contingencias (frecuencias). Para hacer más visibles los resultados obtenidos, se elaboró una gráfica con el número de explantes contaminados, número de explantes muertos y el total de explantes descartados a los 10, 20, 30, 40 y 50 minutos de exposición a la solución de hipoclorito de calcio al 20%.

2.5. Fase de establecimiento del cultivo (Fase 1).

Una vez determinado el mejor tratamiento para la fase de desinfección, se recolectó nuevo material y se realizaron los pasos que se detallaron en la fase de desinfección con el tratamiento T3 (hipoclorito de calcio al 20% durante 30 minutos)

Dentro de una cámara de flujo laminar (STREAMLINE®) y bajo estrictas condiciones de asepsia se tomaron los explantes y se realizaron cortes en ellos hasta dejarlos en una longitud homogénea de aproximadamente 1.5 centímetros (Figura 2.5.1). Luego, se cultivaron los explantes en tubos de vidrio de 25x200 (Pierik, 1990) que contenían 10 ml los medios de cultivo sólidos: MS (Murashige y Skoog, 1962) con vitaminas Gamborg (1966), y Woody Plant Médiu, (Lloyd and McCown, 1980), sucrosa 30 g.L⁻¹ y agar 6 g.L⁻¹ (SIGMA AGAR), suplementados con

diferentes concentraciones de BAP (0, 2, 4, 6 y 8 μM) (tabla 2.5.1). Las figuras 2.5.1 y 2.5.2 muestran el procedimiento.

Los medios de cultivo utilizados en esta fase se ajustaron a $\text{pH } 5.8 \pm 0.02$ (pH Meter JENWAY) antes de añadir el agar, y se esterilizaron en autoclave (TRIDENT EA-632) a $121\text{ }^\circ\text{C}$ durante 25 minutos (Esquivel, 1994). Los componentes del medio de cultivo MSVG y WPM se detallan en el Anexo C.

Los cultivos se mantuvieron en el cuarto de cultivo a $25 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ y fotoperiodo de 16h luz (Roca, 1991), durante 25 días (Figura 2.5.3).

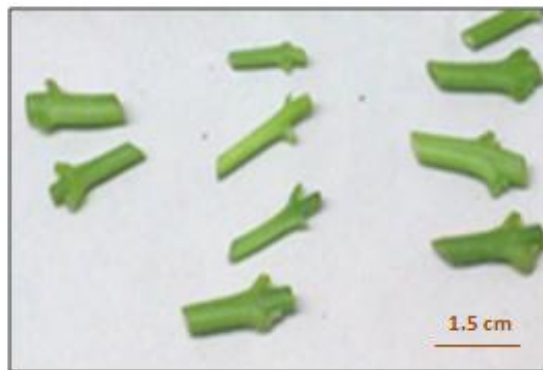


Figura 2.5.1: Forma y tamaño de los segmentos nodales para la fase de establecimiento.

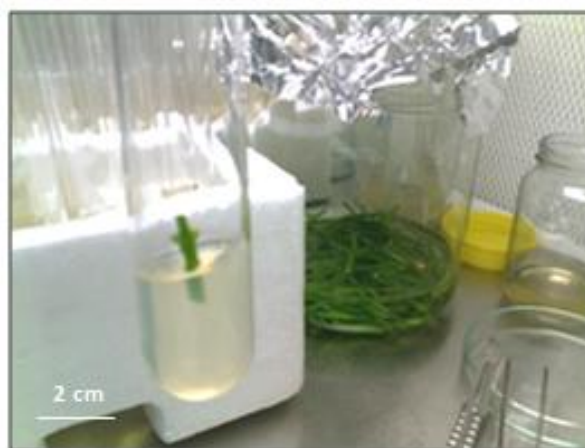


Figura 2.5.2: Cultivo de explantes en medios de cultivo (fase de establecimiento).

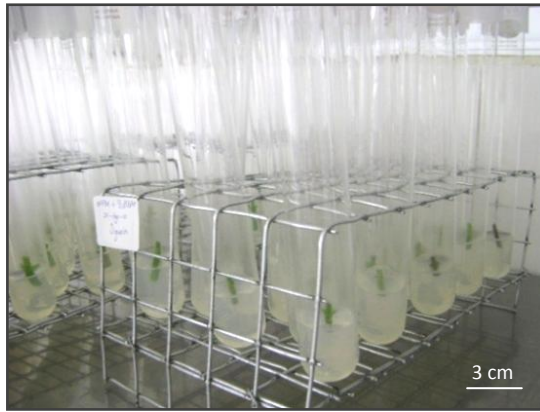


Figura 2.5.3: Incubación de explantes en la sala de cultivo *in vitro* (fase de establecimiento).

Tabla 2.5.1: Tratamientos planteados para la fase de Establecimiento *in vitro* de Jiguerón

Tratamientos	Tipo y componentes del medio de cultivo
T1	MSVG + 0 μM BAP
T2	MSVG + 2 μM (0.450 mg.L^{-1}) BAP
T3	MSVG + 4 μM (0.900 mg.L^{-1}) BAP
T4	MSVG + 6 μM (1.350 mg.L^{-1}) BAP
T5	MSVG + 8 μM (1.800 mg.L^{-1}) BAP
T6	WPM+ 0 μM BAP
T7	WPM + 2 μM (0.450 mg.L^{-1}) BAP
T8	WPM + 4 μM (0.900 mg.L^{-1}) BAP
T9	WPM + 6 μM (1.350 mg.L^{-1}) BAP
T10	WPM + 8 μM (1.800 mg.L^{-1}) BAP

Con el objetivo de determinar el mejor tratamiento para esta fase, se evaluaron las siguientes variables: sobrevivencia, número de brotes basales por explante, longitud de brotes, número de brotes basales adicionales y número de nudos, cada siete días a partir del cultivo. Cada tratamiento planteado, estuvo constituido por 10 unidades experimentales y tres repeticiones.

La sobrevivencia se evaluó mediante la observación visual de explantes vivos y los resultados se presentaron en forma porcentual, utilizando la fórmula:

$$\% \text{ sobrevivencia} = \frac{\text{explantes vivos} * 100}{\text{total de explantes}} \quad (1)$$

El número de brotes basales por explante y el número de nudos fueron contados cada siete días para cada tratamiento y sus repeticiones. La longitud de brotes fue medida también cada siete días con una regla milimetrada, desde la base del brote hacia la yema apical, como se observó que todos los explantes tenían dos yemas axilares por explante, se puso una señal en cada tubo como referencia para establecer las yemas o brotes de la derecha (Bro 2) y de la izquierda (Bro 1), esto independientemente de cualquier característica fisiológica, con esto se facilitaría la toma de datos y la interpretación de los mismos. En los casos en que se presentaron más de un brote a la izquierda o a la derecha, se consideraron como 'brotes adicionales' (Figura 2.5.4).

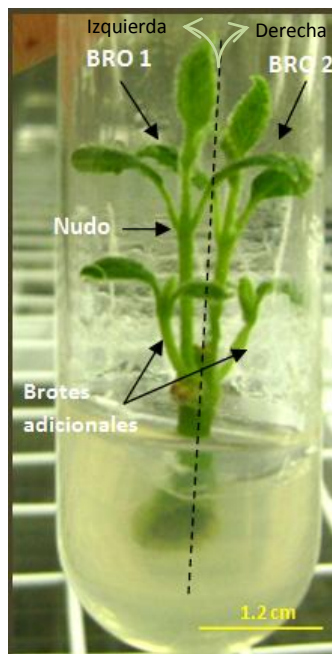


Figura 2.5.4: Identificación de brote 1, brote 2, nudos y brotes adicionales para la recolección de datos en cada explante (fase de establecimiento y multiplicación).

Con las variables: número de brotes basales totales por explante, número de brotes basales adicionales, longitud de brotes (brote uno, brote dos), media aritmética de longitud de brotes adicionales, media aritmética de los brotes centrales (brote uno, brote dos) y número de nudos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los factores A (medios de cultivo) y B (dosis de BAP) utilizando el paquete estadístico SAS, al encontrarse diferencias significativas, se realizó una prueba de significancia estadística de Tukey al 95% de confianza.

Además se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), este análisis factorial es una técnica de reducción de datos que sirve para encontrar Grupos Homogéneos de variables a partir de un grupo numeroso de variables, las variables se agrupan de acuerdo a su grado de correlación entre ellas. Los resultados obtenidos se presentan mediante la elaboración de gráficas, tanto para esta fase como con las fases de Multiplicación y Enraizamiento *in vitro*, aquí se muestran las correlaciones entre los tratamientos con las variables o componentes de cada fase. Básicamente consiste en que las variables, de acuerdo a su correlación se van identificando con los ejes x e y. Posteriormente se ubican los tratamientos en el plano, de acuerdo a sus correlaciones con las variables. Es decir que, si un tratamiento se ubica muy cerca de uno de los dos ejes, tendrá las características que se hayan ubicado sobre dicho eje.

2.6. Fase de multiplicación o proliferación de brotes (Fase 2).

De forma aséptica, dentro de la cámara de flujo laminar (STREAMLINE®), con pinzas y bisturíes estériles, se tomaron de cada tubo sus explantes regenerados, se extrajeron las yemas axilares de cada brote (figura 2.6.1) y se las expuso a una solución de etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos. Posteriormente, las yemas fueron cultivadas en frascos de vidrio comercial de 250 ml (4 o 5 explantes por frasco) (Loyola, 2006), que contenían 20 ml de los medios de cultivo: MS (Murashige y Skoog, 1962) con vitaminas Gamborg (VG) y Woody Plant Medium (Lloyd and McCown, 1980), sucrosa 30 gL⁻¹ y agar 6 gL⁻¹ (SIGMA AGAR), suplementados con

diferentes concentraciones de BAP (4 y 8 μM), Kinetina (4 y 8 μM) y Brasinolida (0.5, 1.0 y 1.5 ppm). (Figura 2.6.2). Todos los medios de cultivo se ajustaron a $\text{pH } 5.8 \pm 0.02$ (pH Meter JENWAY) antes de añadir el agar, y se esterilizaron en autoclave (TRIDENT EA-632) a $121\text{ }^\circ\text{C}$ durante 25 minutos (Esquivel, 1994).

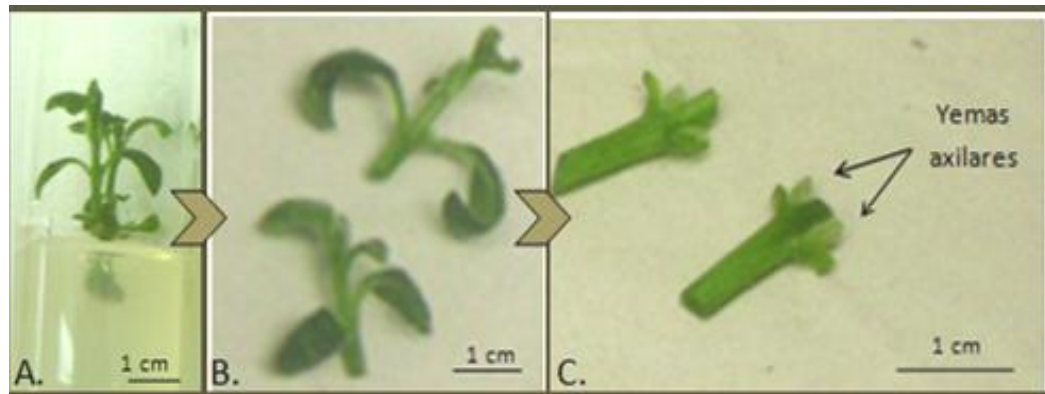


Figura 2.6.1: A. Explante establecido, se observa el desarrollo de brotes basales y la formación de yemas axilares. B. Brotes tomados de A, antes de extraer sus yemas. C. Yemas axilares tomadas de B.

Los cultivos se mantuvieron en el cuarto de cultivo a $25 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ y fotoperiodo de 16h luz (Roca, 1991), durante 28 días para los tratamientos con BAP y Kinetina y 36 días para los tratamientos con brasinolida. Las tablas 2.6.1 y 2.6.2 muestran los tratamientos planteados para esta fase.



Figura 2.6.2: Incubación de yemas axilares en frascos de vidrio. Fase de multiplicación.

Tabla 2.6.1: Tratamientos planteados para el primer ensayo de Multiplicación *in vitro* de Jiguerón

Tratamientos	Tipo y componentes del medio de cultivo
T1	MSVG + 4 μ M (0.900 mg·L ⁻¹) BAP
T2	MSVG + 8 μ M (1.800 mg·L ⁻¹) BAP
T3	WPM + 4 μ M (0.900 mg·L ⁻¹) BAP
T4	WPM+ 8 μ M (1.800 mg·L ⁻¹) BAP
T5	MSVG + 4 μ M (0.861 mg·L ⁻¹) KIN
T6	MSVG + 8 μ M (1.722 mg·L ⁻¹) KIN
T7	WPM + 4 μ M (0.861 mg·L ⁻¹) KIN
T8	WPM + 8 μ M (1.722 mg·L ⁻¹) KIN

Tabla 2.6.2. Tratamientos planteados para el segundo ensayo de Multiplicación *in vitro* de Jiguerón

Tratamientos	Componentes del medio de cultivo
BRA1	MSVG + 0.5 ppm BRA
BRA2	MSVG + 1.0 ppm BRA
BRA3	MSVG + 1.5 ppm BRA

Con el objetivo de determinar el, o los, mejores tratamientos para esta fase, se evaluaron las siguientes variables: Supervivencia, número de brotes basales, longitud de los brotes (mm) (brote uno, brote dos), media aritmética de los brotes (brote uno, brote dos), número de nudos, índice de brotación y tasa de multiplicación.

Cada tratamiento planteado de la tabla 2.6.1, estuvo constituido por 10 unidades experimentales y tres repeticiones. Los tratamientos de la tabla 2.6.2 estuvieron constituidos por 5 unidades experimentales y cinco repeticiones.

La sobrevivencia se evaluó mediante la observación visual de explantes vivos, los resultados se presentaron en forma porcentual, utilizando la fórmula (1) ya descrita anteriormente. La longitud de los brotes se midió cada siete días con una regla milimetrada, desde la base del brote hacia la yema apical. Para conocer el número de yemas axilares se realizó un conteo en cada unidad experimental y sus repeticiones.

Con las variables: número de brotes basales por explante, longitud de brotes (mm) (brote uno, brote dos), media aritmética de los brotes (brote uno, brote dos) y número de nudos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los factores A (medios de cultivo) y B (dosis de BAP y KIN) utilizando el paquete estadístico SAS, al encontrarse diferencias significativas, se realizó una prueba de significancia estadística de Tukey al 95% de confianza. Además se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), este análisis factorial es una técnica de reducción de datos que sirve para encontrar Grupos Homogéneos de variables a partir de un grupo numeroso de variables.

El índice de brotación se obtuvo dividiendo el número de brotes encontrados sobre la distancia entre éstos (2). Para determinar la tasa de multiplicación se contaron los brotes generados a los 30 días del inicio del cultivo y se calculó la media aritmética del número de brotes en cada tratamiento.

$$\text{Índice de brotación} = \frac{\text{número de brotes}}{\text{distancia entre brotes}} \quad (2)$$

2.7 Fase de enraizamiento de *vitro* plántulas regeneradas (Fase 3).

De forma aséptica, dentro de la cámara de flujo laminar (STREAMLINE®), con pinzas y bisturíes libres de contaminantes, se fueron tomando de los frascos las *vitro* plántulas regeneradas, se realizaron cortes en sus bases para separarlas del explante original y posteriormente se expuso la punta de cada base en una solución de etanol al 70% (v/v)

durante 30 segundos. Finalmente, se cultivaron (brote apical con 2 a 3 nudos) en tubos de 25x200 conteniendo los medios sólidos MS (Murashige y Skoog, 1962) con vitaminas Gamborg (VG) y Woody Plant Médium (Lloyd and McCown, 1980), a la mitad de su concentración, sucrosa 30 gL⁻¹ y agar 6 gL⁻¹ (SIGMA), suplementados con 5 µM de IBA. (Figura 2.7.1). Todos los medios de cultivo se ajustaron a pH 5.8 ± 0.02 (pH Meter JENWAY) antes de añadir el agar, y se esterilizaron en autoclave (TRIDENT EA-632) a 121 °C durante 25 min (Esquivel, 1994).

Los cultivos se mantuvieron en el cuarto de cultivo a 25 ± 2 °C y fotoperiodo de 16h luz (Roca, 1991) durante varios meses. La tabla 2.7.1 muestra los tratamientos planteados para esta fase.

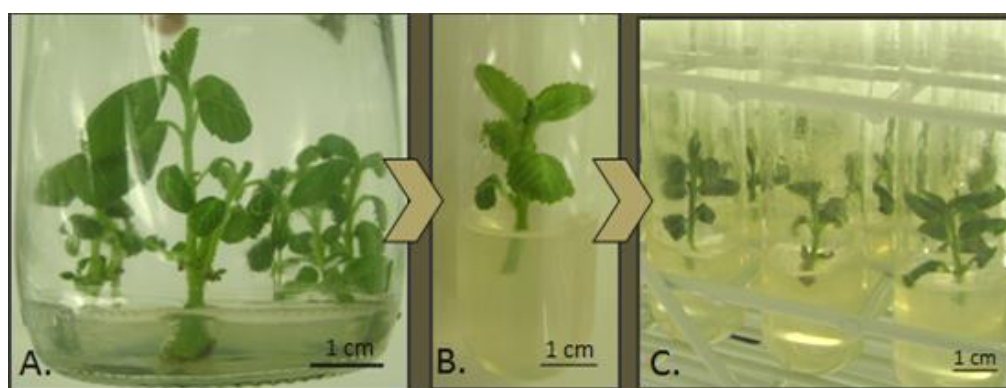


Figura 2.7.1: Cultivo de vitro plántulas regeneradas en la fase 2 (A), en medio de cultivo para su enraizamiento (B y C).

Tabla 2.7.1: Tratamientos planteados para la fase de enraizamiento *in vitro* de Jiguerón.

Tratamientos	Tipo de medio y concentración de auxina
W0	WPM/2 + 0 µM AIB
M0	MSVG/2 + 0 µM AIB
W5	WPM/2 + 5 µM (1.0 mg. L ⁻¹) AIB
M5	MSVG/2 + 5 µM (1.0 mg. L ⁻¹) AIB

*AIB: Ácido indol butírico

Con el objetivo de determinar el mejor tratamiento para esta fase, se evaluaron las siguientes variables: Supervivencia, número de raíces y media aritmética de la longitud de raíz (mm). Los tratamientos constaron de 10 unidades experimentales y tres repeticiones.

La supervivencia será evaluada mediante la observación visual de explantes vivos y los resultados se presentaran en forma porcentual, utilizando la fórmula (1) ya descrita anteriormente. La longitud de las raíces se midió cada siete días con una regla milimetrada, desde la base del explante hacia la punta de la raíz. Para el número de raíces realizó un conteo cada siete días en cada una de las unidades experimentales y sus repeticiones.

Con las variables: número de raíces, y media aritmética de la longitud de brotes (mm), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los factores A (medios de cultivo) y B (dosis de BAP y KIN) utilizando el paquete estadístico SAS®, al encontrarse diferencias significativas, se realizó una prueba de significancia estadística de Tukey al 95% de confianza. Además se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), este análisis factorial es una técnica de reducción de datos que sirve para encontrar Grupos Homogéneos de variables a partir de un grupo numeroso de variables.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Desinfección de explantes (Fase 0).

3.1.1 Contaminación y sobrevivencia

Mediante la observación visual de los explantes, a los 21 días, se presentaron pérdidas de una buena parte de los explantes. Los porcentajes de contaminación, el número de explantes muertos y el total de explantes descartados para cada tratamiento se resumen en la tabla 3.1.1.1. En la figura 3.1.1.1 se muestra una gráfica del total de explantes descartados en base a sus principales agentes causales (contaminación o muerte).

Tabla 3.1.1.1 Tabla de resumen de los resultados obtenidos en la fase de desinfección de Jiguerón

N° de explantes totales	Min. en CaClO ₂ (20%)	N° de explantes contaminados	% Contaminación	N° de explantes muertos	Total de explantes descartados
30	10 (T1)	24.0	80.0	0.0	24.0
30	20 (T2)	16.0	53.3	0.0	16.0
30	30 (T3)	5.0	16.7	0.0	5.0
30	40 (T4)	6.0	20.0	8.0	14.0
30	50 (T5)	5.0	16.7	11.0	16.0
Σ 150		56.0		19.0	75.0

Como se puede apreciar en la tabla, el tratamiento T3 (Hipoclorito de Calcio al 20% durante 30 minutos) y el tratamiento 5 (Hipoclorito de Calcio al 20% durante 30 minutos) son los que menor porcentaje de contaminación presentan (16.7%). La figura 3.1.1 se puede observar los resultados obtenidos tras el análisis del número total de explantes descartados y sus minutos de exposición a la solución de hipoclorito de calcio al 20%.

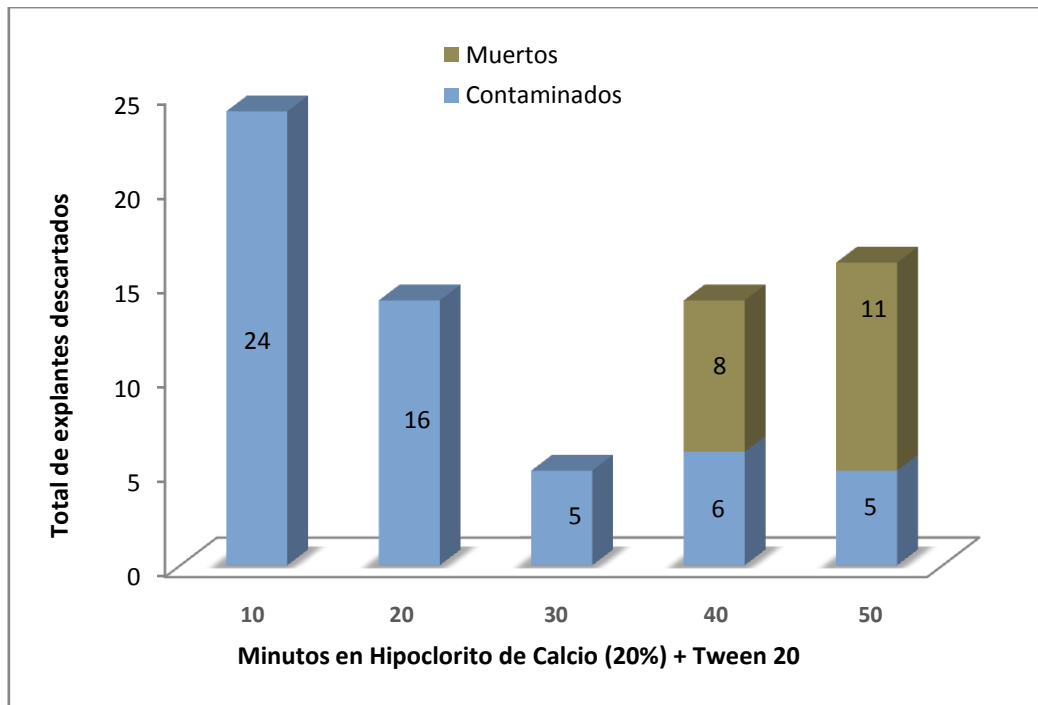


Figura 3.1.1.1 Gráfica del total de explantes descartados vs. tiempo de exposición en Hipoclorito de Calcio 20% + Tween 20 para la fase de desinfección de Jiguerón.

3.1.2 Agentes causales para el descarte de explantes

En la figura 3.1.2.1 se muestran las fotografías de los explantes contaminados por hongos o bacterias y los explantes que presentaron muerte del tejido. En la figura 3.1.2.2 se muestra la gráfica tras el análisis de frecuencias de los agentes causales para el descarte durante los 21 días de evaluación.

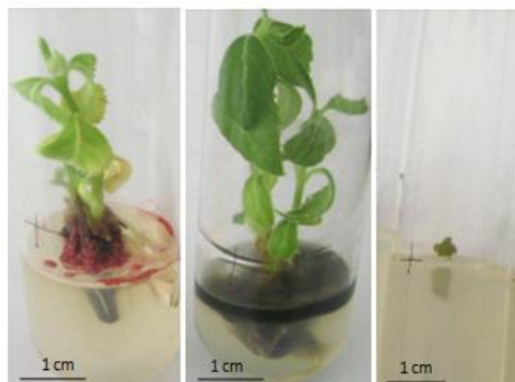


Figura 3.1.2.1 Tipos de contaminantes presentes en los explantes durante la fase de desinfección (A) contaminación bacteriana, (B) contaminación fúngica y (C) explante muerto.

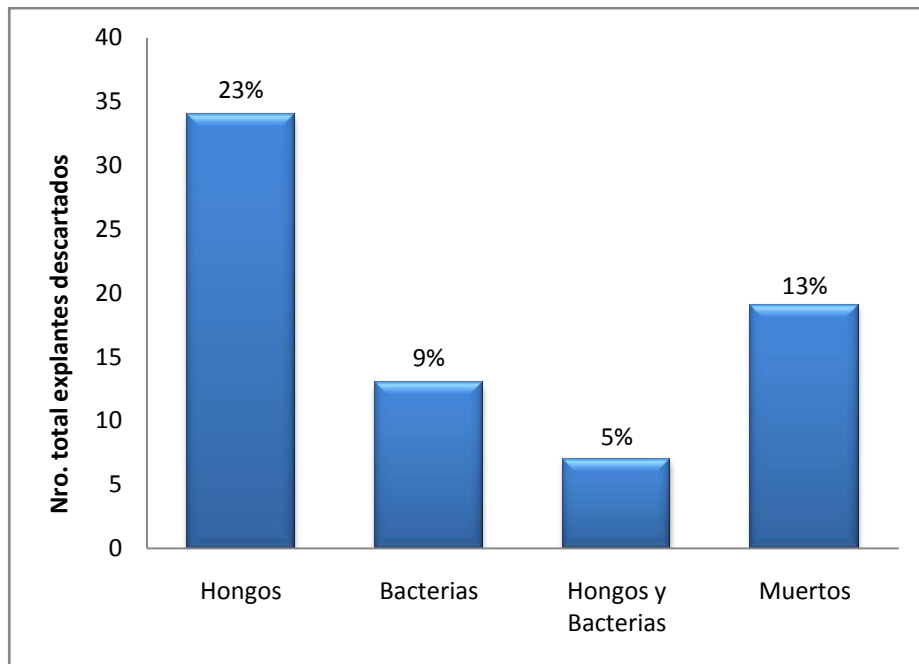


Figura 3.1.2.2 Frecuencia de los agentes causales para el descarte de explantes en la Fase desinfección de Jiguerón.

Como se puede apreciar, del total de explantes cultivados, el agente causal que se presentó con más frecuencia fueron hongos (23%), como segundo agente causal se tuvo a Muerte de los tejidos (13%), en tercer lugar se encontró a Bacterias (9%) y en cuarto lugar se ubicó la contaminación por hongos y bacterias (5%) sobre el explante.

3.2 Fase de establecimiento *in vitro* del cultivo (Fase 1).

3.2.1 Contaminación y Supervivencia

Durante esta fase se perdió una parte de los explantes. La porción media de explantes contaminados fue del 17.7%, la supervivencia fue del 82.3%, el total de explantes bajo estudio, en promedio, fue de 24.1 unidades y el porcentaje de Descarte fue del 2.0% (Tabla 3.2.1.1).

Tabla 3.2.1.1 Porcentajes medios de contaminación, sobrevivencia y descarte en la fase de establecimiento *in vitro* de Jiguerón

Tratam.	N° total explantes	N° explantes contaminados	N° explantes muertos	N° explantes vivos	Contaminacion (%)	Sobrevivencia (%)	Descarte (%)
T1	30.0	7.0		23.0	23.0	76.7	0.0
T2	30.0	6.0	1.0	23.0	20.0	80.0	3.3
T3	30.0	6.0		24.0	20.0	80.0	0.0
T4	30.0	5.0	1.0	24.0	16.6	83.3	3.3
T5	30.0	6.0	1.0	23.0	20.0	80.0	3.3
T6	30.0	3.0		27.0	10.0	90.0	0.0
T7	30.0	6.0		24.0	20.0	80.0	0.0
T8	30.0	3.0	1.0	26.0	10.0	90.0	3.3
T9	30.0	7.0		23.0	23.3	76.7	0.0
T10	30.0	4.0	2.0	24.0	13.3	86.7	6.7
Total	300.0	53.0	6.0	241.0	-	-	-
Media		5.3	2.0	24.1	17.7	82.3	2.0

3.2.2 Longitud del brote uno (BRO 1).

El análisis de varianza para la variable longitud del brote uno³, durante los 7, 14 y 21 días detectó diferencias altamente significativas para el factor medio de cultivo (MC). Para el factor dosis de regulador (DR) se encontró diferencia altamente significativa a los 14 días (tabla 3.2.2.1). Tras realizar una separación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p < 0.05$) se obtuvo que los mejores promedios, con respecto al tipo de medio de cultivo, se presentaban en el medio MSVG (grupo A) con respecto a los obtenidos en el medio WPM (grupo B) durante las tres lecturas realizadas (tabla 3.2.2.2) y que las dosis de BAP con mejores promedios a los 14 días (grupo A) fueron 8 μM (9.5mm) y 4 μM (8.6 mm). Los tratamientos que contienen el medio de cultivo MSVG y las dosis indicadas de BAP son T5 y T3, respectivamente (tabla 3.2.2.3). A pesar de que a los 21 días no se presentan diferencias para el factor DR sobre esta variable, al analizar los promedios se encontró que los valores más altos también son para 8 y 4 μM , con 14.9 y 13.8 mm respectivamente.

³ La variable longitud de brote uno se refiere al brote ubicados a la izquierda del explante (Figura 2.5.4)

Tabla 3.2.2.1 Análisis de varianza para la longitud del brote uno (BRO 1) a los 7, 14 y 21 días.

F. de V.	7 Días			14 Días		21 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	299						
Tratam	9	61.576	<.0001**	129.468	0.0663 ns	178.718	0.5049 ns
MC	1	471.755	<.0001**	473.759	0.0029**	756.842	0.0027**
DR	4	9.479	0.479 ns	141.901	0.0002**	180.050	0.0720 ns
MC*DR	4	11.128	0.393 ns	30.967	0.465 ns	32.852	0.8110 ns
EE	290	10.826		34.454		82.830	

Pr>F: Valor de Probabilidad ($p \leq 0.05$), MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis de regulador de crecimiento, para este caso BAP.

Tabla 3.2.2.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud de brote uno (BRO1) a los 7, 14 y 21 días ().

Medio de Cultivo	Media aritmética		
	7 días	14 días	21 días
MSVG	5.83 a	8.89 a	14.22 a
WPM	3.32 b	6.38 b	11.05 b

Tabla 3.2.2.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto de la dosis de BAP en la longitud de brote uno (BRO1) a los 7, 14 y 21 días.

Dosis Regulador	Media aritmética		
	7 días	14 días	21 días
8 BAP	4.987	9.508 a	14.942
4 BAP	4.933	8.608 a	13.783
6 BAP	4.067	7.633 ab	12.433
0 BAP	4.300	6.917 ab	11.133
2 BAP	4.583	5.517 ab	10.883

3.2.3 Longitud del brote dos (BRO 2)

El análisis de varianza para la variable longitud del brote dos⁴, durante los 7, 14 y 21 días detectó diferencias altamente significativas para el factor medio de cultivo (MC). Para el factor dosis de regulador se encontró diferencias altamente significativa a los 14 días y para la

⁴ La variable longitud de brote dos se refiere al brote ubicado a la derecha del explante (Figura 2.5.4)

interacción MC*DR se detectaron diferencias significativas (tabla 3.2.3.1). Tras realizar una separación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p < 0.05$) se obtuvo que los mejores promedios, con respecto al tipo de medio de cultivo, se encontraban en el medio MSVG (grupo A) con respecto a los obtenidos en el medio WPM (grupo B) durante las tres lecturas realizadas (tabla 3.2.3.2), y que la dosis de BAP con mejor promedio a los 14 días (grupo A) fue 8 μ M (9.5mm). Luego en el grupo AB se ubicaron las dosis 4 y 6 μ M, en el grupo B se tuvo a 0 y 2 μ M. El tratamiento que contiene el medio de cultivo MSVG y la mejor dosis de BAP es T5. A pesar de que a los 21 días no se presentan diferencias para el factor DR sobre esta variable, al analizar los promedios se encontró que los valores más altos son para 8 y 4 μ M, 14.4 y 13.4 mm respectivamente.

Tabla 3.2.3.1 Análisis de varianza del crecimiento del brote dos (BRO 2) a los 7, 14 y 21 días.

F. de V.	GL	7 Días		14 Días		21 Días	
		CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	299						
Tratam	9	47.024	<.0001**	150.257	<.0001**	173.157	0.0262 *
MC	1	337.079	<.0001**	331.804	0.0018**	630.747	0.0056**
DR	4	5.383	0.6102 ns	144.307	0.0021**	112.521	0.2370 ns
MC*DR	4	16.142	0.0910 ns	110.824	0.0111*	119.386	0.2094 ns
EE	290	7.971		33.388		80.878	

Pr>F: Valor de Probabilidad, MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis de regulador de crecimiento, para este caso BAP.

Tabla 3.2.3.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud de brote dos (BRO2) a los 7, 14 y 21 días.

Medio de Cultivo	Media aritmética		
	7 días	14 días	21 días
MSVG	4.56a	8.50a	14.01a
WPM	2.44b	6.40b	11.11b

Tabla 3.2.3.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto de la dosis de BAP en la longitud de brote dos (BRO2) a los 7, 14 y 21 días.

Dosis Regulador	Media aritmética		
	7 días	14 días	21 días
8 BAP	3.733	9.475 a	14.400
4 BAP	3.825	8.500 ab	13.383
6 BAP	3.075	7.250 ab	12.117
2 BAP	3.500	5.650 b	12.050
0 BAP	3.367	6.383 b	10.833

3.2.4 Promedio de longitud de brotes uno y dos (BRO1 y BRO2)

El análisis de varianza para la variable promedio de longitud de brotes uno y dos, durante los 7, 14 y 21 días detectó diferencias altamente significativas para el factor medio de cultivo (MC) y para el factor dosis de regulador hubieron diferencias altamente significativas a los 14 días, para la interacción MC*DR no se detectaron diferencias (tabla 3.2.4.1). Tras realizar una separación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se obtuvo que los mejores promedios, con respecto al tipo de medio de cultivo, se encontraban en el medio MSVG (grupo A) con respecto a los obtenidos en el medio WPM (grupo B) durante las tres lecturas realizadas (tabla 3.2.4.2), y que la dosis de BAP con mejor promedio a los 14 días (grupo A) fue 8 μM (9.5mm) (tabla 3.2.4.3). Aunque a los 21 días no hubieron diferencias significativas para el factor DR, se observó que los valores de las medias son más altos para 8 y 4 μM con 14.67 y 13.58 mm respectivamente. Los tratamientos que contienen el medio de cultivo MSVG y las dosis indicadas de BAP son T5 y T3.

Tabla 3.2.4.1 Análisis de varianza del promedio de longitud de brote uno y dos (BRO 1 y BRO 2).

F de V.	7 Días			14 Días		21 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	299						
Tratam	9	53.734	<.0001**	135.428	<.0001**	165.883	0.0187**
MC	1	401.589	<.0001**	399.628	0.0003**	692.358	0.0023**
DR	4	7.201	0.5156 ns	142.017	0.0010**	138.876	0.1122 ns
MC*DR	4	13.302	0.2001 ns	62.779	0.0808 ns	61.248	0.5048 ns
EE	290	8.834		29.878		73.487	

Pr>F: Valor de Probabilidad ($p \leq 0.05$), MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis de regulador de crecimiento, para este caso BAP.

Tabla 3.2.4.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto del tipo de medio de cultivo en el promedio de longitud de brote uno y dos a los 7, 14 y 21 días.

Medio de Cultivo	Media aritmética		
	7 días	14 días	21 días
MSVG	5.19a	8.69a	14.12a
WPM	2.88b	6.39b	11.08b

Tabla 3.2.4.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto de la dosis de BAP en el promedio de longitud de brote uno y dos a los 7, 14 y 21 días.

Dosis Regulador	Media aritmética		
	7 días	14 días	21 días
8 BAP	4.360	9.491 a	14.671
4 BAP	4.379	8.554 ab	13.583
6 BAP	3.571	7.442 abc	12.275
2 BAP	4.042	6.650 bc	11.467
0 BAP	3.833	5.583 c	10.983

3.2.5 Número de brotes

El análisis de varianza para la variable número de brotes, durante los 7, 14 y 21 días detectó diferencias significativas para el factor medio de cultivo (MC) a los 14 y 21 días y para el factor dosis de regulador a los 21 días, para la interacción MC*DR no se detectaron diferencias significativas (tabla 3.2.5.1). Tras realizar una separación de medias por medio de la

prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se obtuvo que los mejores promedios, con respecto al tipo de medio de cultivo, se encontraban en el medio MSVG (grupo A) con respecto a los obtenidos en el medio WPM (grupo B) durante las tres lecturas realizadas (tabla 3.2.5.2), y que la dosis de BAP con el mayor promedio a los 21 días (grupo A) fue 8 μ M. En segundo lugar (Grupo AB) se encuentra la dosis 4 μ M, los valores medios para estas dosis fueron 2.48 y 2.31 brotes, respectivamente. Los tratamientos que contienen el medio de cultivo MSVG y las dosis indicadas de BAP son T5 y T3.

Tabla 3.2.5.1 Análisis de varianza del número de brotes.

F. de V.	7 Días			14 Días		21 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	299						
Tratam	9	0.732	0.4199 ns	2.638	0.0725 ns	4.473	0.0053**
MC	1	1.202	0.1936 ns	6.749	0.0340 *	10.447	0.0128*
DR	4	0.687	0.4170 ns	2.231	0.2010 ns	5.143	0.0165*
MC*DR	4	0.632	0.4652 ns	2.017	0.2493 ns	2.308	0.2403 ns
EE	290	0.712		1.489		1.672	

Pr>F: Valor de Probabilidad ($p \leq 0.05$), MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis de regulador de crecimiento, para este caso BAP.

Tabla 3.2.5.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto del tipo de medio de cultivo en el número de brotes a los 7, 14 y 21 días.

Medio de Cultivo	Media aritmética		
	7 días	14 días	21 días
MSVG	1.84	2.15a	2.31a
WPM	1.71	1.85b	1.93b

Tabla 3.2.5.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto de la dosis de BAP en el número de brotes a los 7, 14 y 21 días.

Dosis Regulador	Media aritmética		
	7 días	14 días	21 días
8 BAP	1.767	2.133	2.483a
4 BAP	1.883	2.200	2.317ab
6 BAP	1.600	1.867	2.117ab
2 BAP	1.833	2.050	1.933ab
0 BAP	1.800	1.733	1.750b

3.2.6 Longitud promedio de brotes adicionales

Debido a que la presencia de brotes basales adicionales⁵ se observó a partir de los 10 días, en análisis de varianza se realizó a partir del día 14. El análisis de varianza para esta variable, durante los 14 y 21 días detectó diferencias altamente significativas para el factor medio de cultivo (MC) y para el factor dosis de regulador hubieron diferencias altamente significativas a los 21 días (tabla 3.2.6.1), para la interacción MC*DR se detectaron diferencias a los 21 días. Tras realizar una separación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se obtuvo que los mejores promedios, con respecto al tipo de medio de cultivo, se encontraban en el medio MSVG (grupo A) con respecto a los obtenidos en el medio WPM (grupo B) durante las tres lecturas realizadas (tabla 3.2.6.2), y que la dosis de BAP con mejor promedio a los 14 días (grupo A) fueron 8 μ M y 4 μ M (tabla 3.2.6.3), sin embargo a los 21 días la dosis de BAP que se destacó (grupo A) fue 8 μ M (1.800 mg·L⁻¹), ubicándose en segundo lugar (grupo AB) 4 μ M (0.900 mg·L⁻¹), los valores medios para estas dosis a los 21 días fueron 2.66 y 2.53 mm, respectivamente (tabla 3.2.6.3). Los tratamientos que contienen el medio de cultivo MSVG y las dosis indicadas de BAP son T5 y T3.

Tabla 3.2.6.1 Análisis de varianza de la longitud promedio de brotes adicionales.

F de V.	14 Días			21 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	299				
Tratam	9	19.908	<.0001**	77.487	<.0001**
MC	1	95.032	<.0001**	313.143	<.0001**
DR	4	14.269	0.0032*	66.821	<.0001**
MC*DR	4	6.772	0.1055 ns	29.238	0.0106*
EE	290	3.514		8.732	

Pr>F: Valor de Probabilidad ($p \leq 0.05$), MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis de regulador de crecimiento, para este caso BAP.

⁵ Los brotes basales adicionales corresponden a brotes que emergieron y se desarrollaron junto a los brotes axilares existentes en los explantes originales (Figura 2.5.4).

Tabla 3.2.6.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud promedio de brotes adicionales a los 7, 14 y 21 días.

Medio de Cultivo	Media aritmética	
	14 días	21 días
MSVG	1.356a	2.587a
WPM	0.230b	0.543b

Tabla 3.2.6.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto de la dosis de BAP en la longitud promedio de brotes adicionales a los 7, 14 y 21 días.

Dosis Regulador	Media aritmética	
	14 días	21 días
8 BAP	1.308a	2.658a
4 BAP	1.172a	2.533ab
6 BAP	0.717ab	1.058bc
2 BAP	0.700ab	1.442abc
0 BAP	0.067b	0.133c

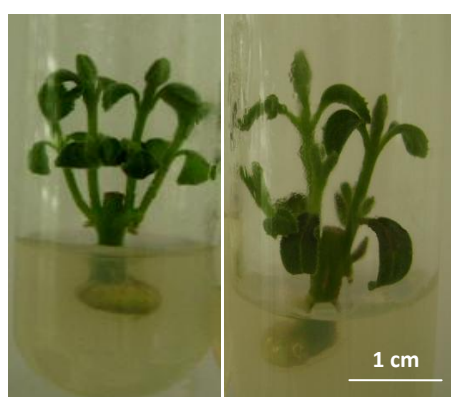


Figura 3.2.6.1 Brotes basales adicionales y normales formados en los explantes a los 21 días.

3.2.7 Número de nudos.

Debido a que la presencia de nudos se observó a partir de los 9 días aproximadamente, en análisis de varianza se realizó a partir del día 14. El análisis de varianza para esta variable, durante los 14 y 21 días detectó diferencias altamente significativas para el factor medio de cultivo

(MC) y para el factor dosis de regulador hubieron diferencias altamente significativas a los 21 días (tabla 3.2.7.1), para la interacción MC*DR no se detectaron diferencias. Tras realizar una separación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se obtuvo que los mejores promedios, con respecto al tipo de medio de cultivo, se encontraban en el medio MSVG (grupo A) con respecto a los obtenidos en el medio WPM (grupo B) durante las tres lecturas realizadas (tabla 3.2.7.2), y que la dosis de BAP con mejor promedio a los 14 días (grupo A) fue $8\mu\text{M}$ ($1.800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), en segundo lugar (grupo AB) se ubicó la dosis $6\mu\text{M}$ ($1.350 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y en un tercer lugar (grupo AB) estuvo la dosis $4\mu\text{M}$ (tabla 3.2.7.3). A los 21 días la mejor dosis de BAP (grupo A) también fue $8\mu\text{M}$ ($1.800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), en segundo lugar (grupo AB) se ubicó la dosis y $4\mu\text{M}$ ($0.900 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y en tercer lugar (grupo ABC) estuvo la dosis $6\mu\text{M}$ ($1.350 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), los promedios para estas dosis a los 21 días fueron 1.72, 1.50 y 1.37 nudos, respectivamente (tabla 3.2.7.4). Los tratamientos que contienen el medio de cultivo MSVG y las dos mejores dosis indicadas de BAP son T5 y T3.

Tabla 3.2.7.1 Análisis de varianza del número de nudos.

F de V.	14 Días			21 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	299				
Tratam	9	3.203	<.0001 **	5.689	<.0001 **
MC	1	19.251	<.0001 **	19.247	<.0001 **
DR	4	2.211	0.0126 *	5.438	0.0011 **
MC*DR	4	0.178	0.9024 ns	2.563	0.0675 ns
EE	290	0.682		1.162	

Pr>F: Valor de Probabilidad ($p \leq 0.05$), MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis de regulador de crecimiento, para este caso BAP.

Tabla 3.2.7.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto del tipo de medio de cultivo en el número de nudos a los 7, 14 y 21 días.

Medio de Cultivo	Media aritmética	
	14 días	21 días
MSVG	0.900a	1.587a
WPM	0.393b	1.080b

Tabla 3.2.7.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto de la dosis de BAP en el número de nudos a los 7, 14 y 21 días.

Dosis Regulador	Media aritmética	
	14 días	21 días
8 BAP	0.833a	1.717a
4 BAP	0.733ab	1.500ab
6 BAP	0.750ab	1.367abc
2 BAP	0.567b	1.133bc
0 BAP	0.350b	0.950c

3.2.8 Análisis de Componentes Principales (ACP) para la Fase de Establecimiento *in vitro* de Jiguerón

La gráfica (Figura 3.2.8.1) muestra las correlaciones entre los tratamientos y sus variables, donde; BRO 1 es longitud de brote uno, BRO 2 es la longitud de brote dos, LPbro es la longitud promedio de de brotes adicionales, TBBG es el total de brotes generados, Descarte indica el número de explantes descartados por contaminación o muerte y Nudos es el número de nudos obtenidos al final de la evaluación.

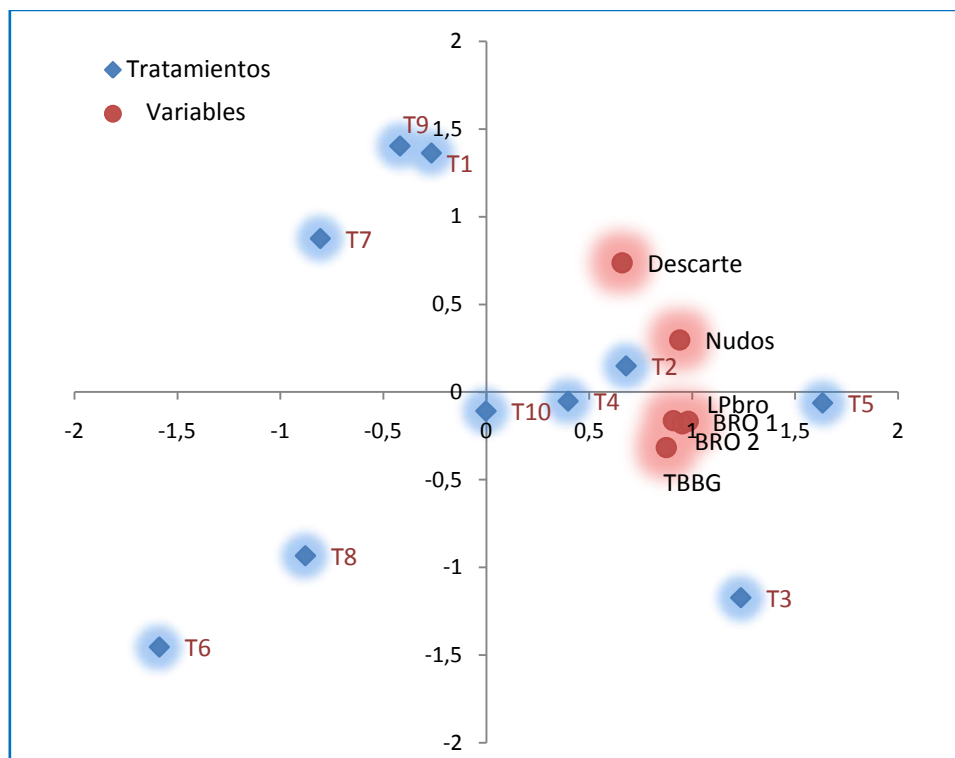


Figura 3.2.8.1: Análisis de Componentes Principales para la Fase de Establecimiento *in vitro* de Jiguerón

3.2.8.1 Total de la Varianza Explicada

El análisis del total de la varianza explicada (tabla 3.2.8.1.1) permite conocer el número de componentes necesarios para explicar la varianza de un modelo, para este caso la varianza del modelo factorial (ACP) obtenido en el apartado anterior.

Tabla 3.2.8.1.1 Total de la varianza explicada en el modelo ACP de la fase de Establecimiento *in vitro* de Jiguerón

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	4.789	79.816	79.816	4.789	79.816	79.816
2	.820	13.662	93.478	.820	13.662	93.478
3	.294	4.899	98.377	.294	4.899	98.377
4	.094	1.567	99.944			
5	.003	.056	100.000			
6	.000	.000	100.000			

Extraction Method: Principal Component Analysis.

3.3 Fase de Multiplicación o proliferación *in vitro* de brotes (Fase 2).

3.3.1 Primer ensayo de multiplicación

En este primer ensayo de multiplicación se utilizó los medios de cultivo MSVG y WPM con los reguladores BAP y KIN.

3.3.1.1 Contaminación y sobrevivencia

Durante esta fase de multiplicación *in vitro* se perdió una parte de los explantes. La porción media de explantes contaminados fue del 4.58%, la sobrevivencia fue del 90.843%, el total de explantes bajo estudio, en promedio, fue de 27.0 unidades y el descarte por muerte de los explantes fue del 4.58% (Tabla 3.3.1.1.1).

Tabla 3.3.1.1.1 Porcentajes medios de contaminación y sobrevivencia para el primer ensayo multiplicación *in vitro* de Jiguerón.

T	N° total explantes	N° explantes contaminados	N° explantes muertos	N° explantes vivos	Contaminación (%)	Sobrevivencia (%)	Descarte (%)
T1	30,0	2,0	1,0	27,00	6,67	90,00	3,33
T2	30,0	1,0	1,0	28,00	3,33	93,33	3,33
T3	30,0	2,0	2,0	26,00	6,67	86,67	6,67
T4	30,0	2,0	1,0	27,00	6,67	90,00	3,33
T5	30,0	2,0	1,0	27,00	6,67	90,00	3,33
T6	30,0	0,0	2,0	28,00	0,00	93,33	6,67
T7	30,0	1,0	2,0	27,00	3,33	90,00	6,67
T8	30,0	1,0	1,0	28,00	3,33	93,33	3,33
Total	240,0	11,0	10,00	218,00	-	-	-
Media		1,4	1,4	27,3	4,58	90,83	4,58

3.3.1.2. Longitud de brote uno (BRO1)

El análisis de varianza para esta variable (tabla 3.3.1.2.1), durante los 14, 21 y 28 días no detectó diferencias significativas tanto para el factor medio de cultivo (MC) como para el factor dosis de regulador (DR). En las tablas 3.3.1.2.2 y 3.3.1.2.3 se muestran los valores de media obtenidos.

Tabla 3.3.1.2.1 Análisis de varianza de la Longitud de brote uno (BRO1)

F de V.	14 Días			21 Días		28 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	239						
Tratam	7	2.683	0.441 ns	6.732	0.472 ns	4.446	0.946 ns
MC	1	5.581	0.1531 ns	11.501	0.2141 ns	11.932	0.3577 ns
DR	3	2.426	0.4454 ns	6.277	0.4512 ns	2.922	0.8908 ns
MC*DR	3	1.973	0.5370 ns	5.746	0.4910 ns	3.474	0.8632 ns
EE	232	2.716		7.119		14.048	

Pr>F: Valor de Probabilidad, MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis de regulador de crecimiento, para este caso BAP o KIN.

Tabla 3.3.1.2.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud de brote uno (BRO 1) a los 14, 21 y 28 días.

Medio de Cultivo	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
MSVG	2.173	3.671	5.220
WPM	1.867	3.242	4.773

Tabla 3.3.1.2.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto del tipo y dosis de citoquininas en la longitud de brote uno (BRO 1) a los 14, 21 y 28 días.

Dosis Regulador	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
4BAP	2.238	3.843	4.841
8BAP	2.143	3.590	5.195
4KIN	1.853	3.123	5.178
8KIN	1.845	3.268	4.773

3.3.1.3. Longitud de brote dos (BRO 2)

El análisis de varianza para esta variable, durante los 14, 21 y 28 días detectó diferencias significativas para el factor medio de cultivo (MC) a los 14 y 21 días, y para el factor dosis de regulador hubieron diferencias altamente significativas a los 14 días (tabla 3.3.1.3.1), para la interacción MC*DR no se detectaron diferencias. Tras realizar una separación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se obtuvo que los mejores promedios, con respecto al tipo de medio de cultivo, se presentaban en el medio MSVG (grupo A) con respecto a los obtenidos en el medio WPM (grupo B) durante las dos primeras lecturas realizadas (tabla 3.3.1.3.2) y que los mejores promedios a los 14 días (grupo A) fueron con BAP (grupo A) con dosis de $4\mu\text{M}$ y $8\mu\text{M}$, en tercer lugar (grupo AB) se ubicó KIN con $4\mu\text{M}$ y en cuarto lugar (grupo B) estuvo KIN con $8\mu\text{M}$. (Tabla 3.3.1.3.3). Los tratamientos que contienen el medio de cultivo MSVG y las dos mejores dosis indicadas de BAP son T1 y T2. A pesar de que a los 28 días para el factor DR, no hay diferencia estadística, se observó que los valores medios mayores son para las dosis $4\mu\text{M}$ KIN y $8\mu\text{M}$ BAP correspondientes a los tratamientos T5 y T2.

Tabla 3.3.1.3.1 Análisis de varianza de la Longitud de brote uno (BRO 2)

F de V.	14 Días			21 Días		28 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	239						
Tratam	7	6.316	0.0075*	7.520	0.2720 ns	10.724	0.5801 ns
MC	1	11.266	0.0255 *	26.934	0.0348 *	36.096	0.1002 ns
DR	3	8.838	0.0088 **	6.057	0.3875 ns	10.708	0.4905 ns
MC*DR	3	2.142	0.4121 ns	2.512	0.7386 ns	2.284	0.9150 ns
EE	232	2.230		5.977		13.251	

Pr>F: Valor de Probabilidad ($p \leq 0.05$), MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis y regulador de crecimiento, para este caso BAP o KIN.

Tabla 3.3.1.3.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud de brote dos (BRO 2) a los 14, 21 y 28 días.

Medio de Cultivo	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
MSVG	2.003a	3.503a	5.306
WPM	1.570b	2.833b	4.529

Tabla 3.3.1.3.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto del tipo de citoquinina y sus dosis en la longitud de brote dos (BRO 2) a los 14, 21 y 28 días.

Dosis Regulador	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
4BAP	2.128 ^a	3.288	4.544
8BAP	2.050 ^a	3.523	5.197
4KIN	1.675ab	3.088	5.362
8KIN	1.293b	2.773	4.567

3.3.1.4 Longitud promedio de los brotes uno y dos.

El análisis de varianza para esta variable, durante los 14, 21 y 28 días detectó diferencias significativas para el factor medio de cultivo (MC) a los 14 y 21 días, y para el factor dosis de regulador hubieron diferencias significativas a los 14 días (tabla 3.3.1.4.1), para la interacción MC*DR no se detectaron diferencias. Tras realizar una separación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se obtuvo que los mejores

promedios, con respecto al tipo de medio de cultivo, se presentaban en el medio MSVG (grupo A) con respecto a los obtenidos en el medio WPM (grupo B) durante las dos primeras lecturas realizadas (tabla 3.3.1.4.2) y que los mejores promedios a los 14 días (grupo A) fueron con BAP (grupo A) con 4 μ M (0.900 mg·L⁻¹), en segundo lugar (grupo AB) se ubicó BAP con 8 μ M, en tercer lugar (grupo AB) estuvo KIN con 4 μ M y en cuarto lugar (grupo B) se ubicó KIN con 8 μ M. Los tratamientos que contienen el medio de cultivo MSVG y las dos mejores dosis indicadas de BAP son T1 y T2 (tabla 3.3.1.4.3). A pesar de que a los 28 días para el factor DR, no hay diferencia estadística, se observó que los valores medios mayores son para las dosis 4 μ M KIN (5.27 mm) y 8 μ M BAP (5.20 mm) correspondientes a los tratamientos T5 y T2.

Tabla 3.3.1.4.1 Análisis de varianza de la longitud promedio de los brotes uno y dos.

F de V.	14 Días			21 Días		28 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	239						
Tratam	7	4.106	0.010 ns	6.295	0.136 ns	7.230	0.5312 ns
MC	1	8.177	0.0212 *	18.122	0.0328 *	23.788	0.0921 ns
DR	3	4.936	0.0226 *	5.031	0.2821 ns	6.544	0.5022 ns
MC*DR	3	1.919	0.2876 ns	3.618	0.4318 ns	2.397	0.8338 ns
EE	232	1.519		3.932		8.316	

Pr>F: Valor de Probabilidad, MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis y regulador de crecimiento, para este caso BAP o KIN.

Tabla 3.3.1.4.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto del tipo de medio de cultivo en la longitud promedio de los brotes uno y dos a los 14, 21 y 28 días.

Medio de Cultivo	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
MSVG	2.088a	3.587a	5.263
WPM	1.718b	3.038b	4.632

Tabla 3.3.1.4.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto del tipo y dosis de citoquinina en la longitud promedio de los brotes uno y dos a los 14, 21 y 28 días.

Dosis Regulador	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
4 BAP	2.183a	3.566	4.654
8 BAP	2.097ab	3.557	5.196
4 KIN	1.764ab	3.106	5.270
8 KIN	1.569b	3.021	4.670

3.3.1.5 Número de brotes

El análisis de varianza para esta variable (tabla 3.3.1.5.1), durante los 14, 21 y 28 días no detectó diferencias significativas tanto para el factor medio de cultivo (MC) como para el factor dosis de regulador (DR). En las tablas 3.3.5.2 y 3.3.5.3 se muestran los valores de media obtenidos.

Tabla 3.3.1.5.1 Análisis de varianza del número de brotes.

F de V.	14 Días			21 Días		28 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	239						
Tratam	7	0.766	0.0543 ns	0.666	0.1231 ns	1.531	0.0291 ns
MC	1	0.504	0.2509 ns	0.704	0.1883 ns	0.0014	0.9884 ns
DR	3	0.637	0.1731 ns	0.815	0.1125 ns	1.900	0.0513 ns
MC*DR	3	0.981	0.0543 ns	0.504	0.2936 ns	1.674	0.0612 ns
EE	232	0.380		0.404		0.671	

Pr>F: Valor de Probabilidad, MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis y regulador de crecimiento, para este caso BAP o KIN.

Tabla 3.3.1.5.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto del tipo de medio de cultivo en el número de brotes a los 14, 21 y 28 días.

Medio de Cultivo	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
MSVG	1.708	1.808	1.817
WPM	1.617	1.700	1.815

Tabla 3.3.1.5.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto del tipo y dosis de citoquininas en el número de brotes a los 14, 21 y 28 días.

Dosis Regulador	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
4 BAP	1.650	1.767	1.949
8 BAP	1.800	1.883	1.983
4 KIN	1.650	1.767	1.717
8 KIN	1.550	1.600	1.617

3.3.1.6 Tasa de Multiplicación

A través de un análisis de frecuencias se determinó que la tasa de multiplicación⁶ *in vitro* de Jiguerón fue muy similar para los tratamientos T1, T3, T4, T6, T7 y T8 con 3 brotes por cada explante cultivado. Y para los tratamientos T2 y T5 fue de 4 brotes por cada explante cultivado. La figura 3.3.1.6.1 muestra la frecuencia media de número de brotes obtenida para cada tratamiento probado. Como la multiplicación *in vitro* se llevó a cabo en frascos, donde se colocaron 5 explantes/frasco, por cada frasco había como mínimo 30 brotes y un máximo de 40 brotes.

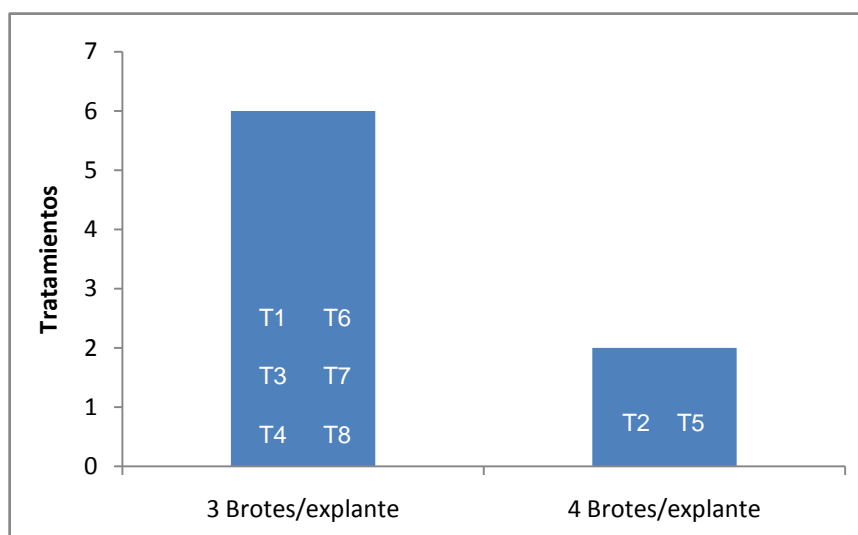


Figura 3.3.1.6.1: Frecuencia media de la Tasa de Multiplicación *in vitro* de Jiguerón.

⁶ La tasa de multiplicación es el resultado del promedio de yemas o brotes axilares (sanos) formados en cada explante a los 14, 21 y 28 días para este ensayo.

3.3.1.7 Índice de Brotación

El índice de brotación indica qué tan cerca (índices altos) o lejos (índices bajos) se encuentran los brotes unos de otros en los explantes. Como se puede observar en la tabla 3.3.1.7.1, el índice más bajo a los 36 días fue en T7 y el más alto en T2.

Tabla 3.3.1.7.1 Índice de Brotación por tratamiento y distancia entre brotes.

Tratamiento	Media de la distancia entre brotes (mm)	Índice Brotación.		
		22 días	29 días	36 días
T1	1.5	2.0	1.8	2.8
T2	1.2	2.9	3.0	3.3
T3	3.5	0.0	0.7	0.8
T4	3.5	0.6	0.6	1.1
T5	3.0	1.0	1.2	1.5
T6	3.5	0.6	0.8	0.9
T7	5.5	0.4	0.4	0.5
T8	3.5	0.6	0.8	0.8

A través de un gráfico de frecuencias (figura 3.3.1.7.1) se puede observar que la longitud más común de los entrenudos es de 3.5 mm. Sin embargo con el tratamiento T2 esta distancia se redujo hasta 1.2 mm aproximadamente.

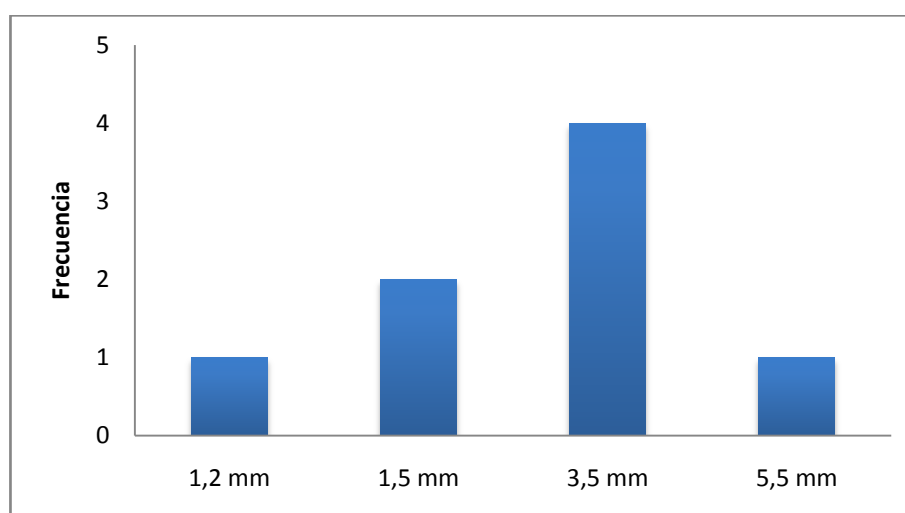


Figura 3.3.1.7.1 Frecuencia de las distancias entre brotes en explantes de Jiguerón

3.3.1.8 Análisis de Componentes Principales (ACP) para el primer ensayo de Multiplicación *in vitro* de Jiguerón

La gráfica (figura 3.3.1.8.1) muestra las correlaciones entre los tratamientos con las variables o componentes, donde; BRO 1 es longitud de brote uno, BRO 2 es la longitud de brote dos, TMult es la tasa de multiplicación, InB es el índice de brotación, Nudos es el número de nudos, TBRO es el total de brotes basales, LPTBA es la longitud promedio de brotes basales adicionales y Descarte, es el número de explantes descartados por muerte o contaminación.

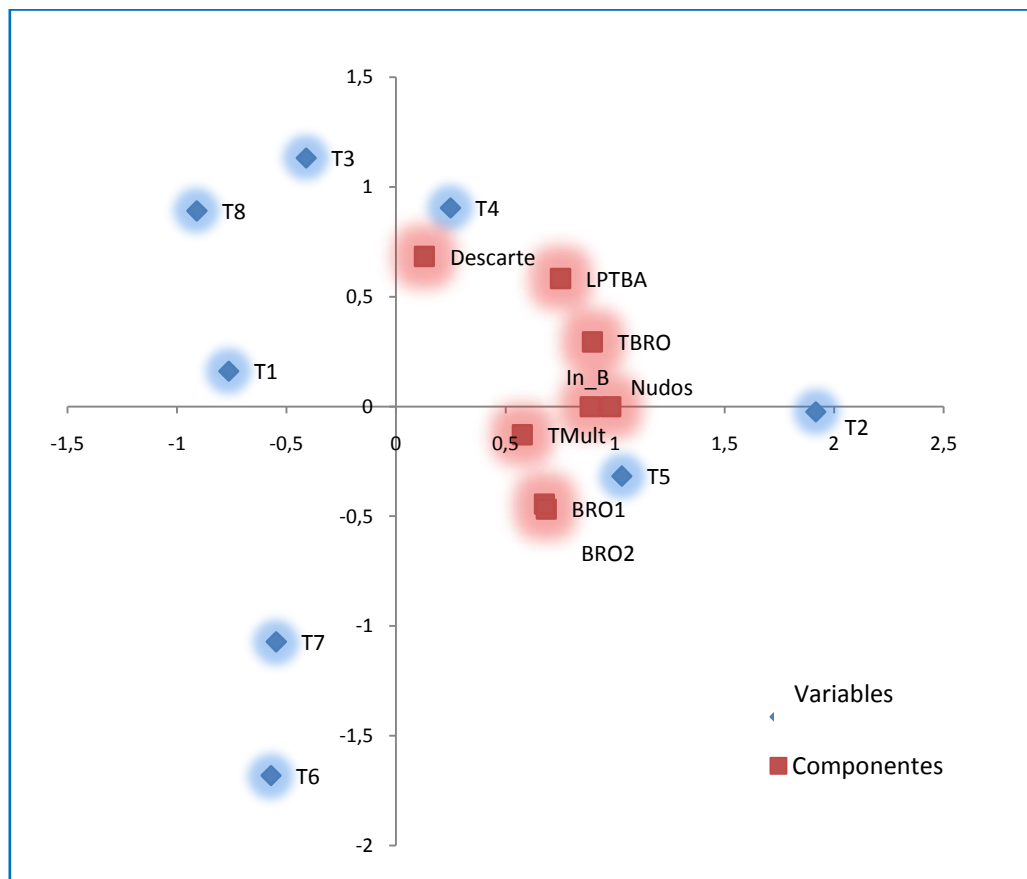


Figura 3.3.1.8.1 Análisis de Componentes Principales para el primer ensayo de multiplicación *in vitro* de Jiguerón.

3.3.1.8.1 Análisis del total de varianza explicada

Los resultados obtenidos del análisis del total de varianza explicada para esta fase de micropropagación, se muestran en la Tabla 3.3.1.8.1 Este análisis permite conocer el número de componentes necesarios para explicar la varianza de un modelo ACP obtenido en el apartado anterior.

Tabla 3.3.1.8.1 Análisis del total de varianza explicada del ACP del primer ensayo de multiplicación *in vitro* de Jiguerón

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	4.401	55.013	55.013	4.401	55.013	55.013
2	1.337	16.711	71.724	1.337	16.711	71.724
3	1.176	14.694	86.418	1.176	14.694	86.418
4	.847	10.591	97.009	.847	10.591	97.009
5	.172	2.149	99.158	.172	2.149	99.158
6	.065	.811	99.969	.065	.811	99.969
7	.002	.031	100.000	.002	.031	100.000
8	.000	.000	100.000	.000	.000	100.000

Extraction Method: Principal Component Analysis.

3.3.2 Segundo ensayo de multiplicación

En este segundo ensayo de multiplicación *in vitro* de Jiguerón se utilizó el medio de cultivo MSVG con diferentes concentraciones de Brasinolida.

3.3.2.1 Contaminación y sobrevivencia

En esta evaluación adicional se perdió una parte de los explantes. La porción media de explantes contaminados fue del 13.3%, la sobrevivencia fue del 76.0%, el total de explantes bajo estudio, en promedio, fue de 19.0 unidades y el descarte por muerte de los explantes fue del 10.7% (Tabla 3.3.2.1.1).

Tabla 3.3.2.1.1: Porcentajes medios de contaminación y sobrevivencia en el segundo ensayo de multiplicación *in vitro* de Jiguerón.

Tratam.	Total explantes	N° explantes contaminados	N° explantes muertos	N° explantes vivos	Contaminación (%)	Sobrevivencia (%)	Explantes muertos (%)
T1	25.0	4.0	3.0	18.0	16.0	72.0	12.0
T2	25.0	3.0	2.0	20.0	12.0	80.0	8.0
T3	25.0	3.0	3.0	19.0	12.0	76.0	12.0
Total	75.0	10.0	0.0	57.0	-	-	-
Media		3.3	2.7	19.0	13.3	76.0	10.7

3.3.2.2 Longitud de brote uno (BRO 1)

El análisis de varianza para esta variable, durante los 22, 29 y 36 días detectó diferencias altamente significativas para el factor dosis de Brasinolida a los 36 días (tabla 3.3.2.2.1). Tras realizar una separación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se obtuvo que los mejores promedios, respecto a las dosis de BRA, fue 0.5 ppm (grupo A) con un valor medio de 5.20 mm, en segundo lugar se ubicó la dosis 1.5 ppm (grupo AB) con un valor medio de 4.08 mm, en tercer lugar estuvo la dosis 1.0 ppm (grupo B) con un valor medio de 2.44 mm (tabla 3.3.2.2.2).

Tabla 3.3.2.2.1 Análisis de varianza de la longitud de brote uno (BRO 1) para el segundo ensayo de multiplicación *in vitro* de Jiguerón.

F de V.	22 Días			29 Días		36 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	74						
BRA	2	4.198	0.1922 ns	9.282	0.1064 ns	48.173	0.0033 **
EE	72	2.488		4.015		7.777	

Pr>F: Valor de Probabilidad, BRA: Factor dosis de Brasinolida.

Tabla 3.3.2.2.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto de la dosis de Brasinolida en la longitud de brote uno a los 22, 29 y 36 días.

Brasinolida	Media aritmética		
	22 días	29 días	36 días
0.5 BRA	2.072	2.720	5.200a
1.5 BRA	1.808	2.576	4.080ab
1.0 BRA	1.268	1.600	2.440b

3.3.2.3 Longitud de brote dos (BRO 2)

El análisis de varianza para esta variable (tabla 3.3.2.3.1), durante los 22, 29 y 36 días no detectó diferencias significativas para el factor dosis de Brasinolida. La tabla 3.3.2.3.2 muestra los valores medios obtenidos.

Tabla 3.3.2.3.1 Análisis de varianza de la longitud de brote dos (BRO 2)

F de V.	22 Días			29 Días		36 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	74						
BRA	2	0.094	0.8656 ns	2.206	0.6001 ns	18.653	0.1551 ns
EE	72	0.655		4.289		9.753	

Pr>F: Valor de Probabilidad, BRA: Factor dosis de Brasinolida.

Tabla 3.3.2.3.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto de la dosis de Brasinolida en la longitud de brote dos a los 22, 29 y 36 días.

Brasinolida	Media aritmética		
	22 días	29 días	36 días
0.5 BRA	0.588	1.680	3.200
1.5 BRA	0.552	1.228	2.200
1.0 BRA	0.468	1.120	1.480

3.3.2.4 Longitud promedio de brotes uno y dos

El análisis de varianza para esta variable, durante los 22, 29 y 36 días detectó diferencias altamente significativas para el factor dosis de Brasinolida a los 36 días (tabla 3.3.2.4.1). Tras realizar una separación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se obtuvo que los

mejores promedios, respecto a las dosis de BRA, fue 0.5 ppm (grupo A) con un valor medio de 4.20 mm, en segundo lugar se ubicó la dosis 1.5 ppm (grupo AB) con un valor medio de 3.14 mm, en tercer lugar estuvo la dosis 1.0 ppm (grupo B) con un valor medio de 1.96 mm.

Tabla 3.3.2.4.1: Análisis de varianza del promedio de brotes 1 y 2.

F de V.	22 Días			29 Días		36 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	74						
BRA	2	1.388	0.2616 ns	4.534	0.1772 ns	31.390	0.0053 **
EE	72	1.016		2.557		5.565	

Pr>F: Valor de Probabilidad, BRA: Factor dosis de Brasinolida.

Tabla 3.3.2.4.2: Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto de la dosis de Brasinolida en el promedio de brotes 1 y 2 a los 22, 29 y 36 días.

Brasinolida	Media aritmética		
	22 días	29 días	36 días
0.5 BRA	1.330	2.200	4.200a
1.5 BRA	1.180	1.902	3.140ab
1.0 BRA	0.868	1.360	1.960b

3.3.2.5 Número de brotes

El análisis de varianza para esta variable (tabla 3.3.2.5.1), durante los 22, 29 y 36 días no detectó diferencias significativas para el factor dosis de Brasinolida. La tabla 3.3.2.3.2 muestra los valores medios obtenidos.

Tabla 3.3.2.5.1 Análisis de varianza del número de brotes

F de V.	22 Días			29 Días		36 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	74						
BRA	2	1.493	0.0862 ns	1.240	0.1360 ns	0.813	0.2507 ns
EE	72	0.588		0.604		0.576	

Pr>F: Valor de Probabilidad, BRA: Factor dosis de Brasinolida.

Tabla 3.3.2.5.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto de la dosis de Brasinolida en el número de brotes a los 22, 29 y 36 días.

Brasinolida	Media aritmética		
	22 días	29 días	36 días
0.5 BRA	1.400	1.400	1.400
1.5 BRA	1.240	1.240	1.240
1.0 BRA	0.920	0.960	1.040

3.3.2.6 Tasa de Multiplicación

La tasa de multiplicación⁷ *in vitro* de Jiguerón a los 36 días para los tratamientos BRA1 fue de 3 brotes/explante, para el tratamiento BRA2 fue de 2 brotes/explante, mientras que para el tratamiento BRA3 fue de 1 brotes/explante. La figura 3.3.2.6.1 muestra el promedio del número de brotes obtenidos para cada tratamiento probado.

Como la multiplicación *in vitro* se llevó a cabo en frascos, donde se colocaron 4 explantes por cada frasco, por cada frasco habían como mínimo 8 brotes y como máximo 16 brotes.

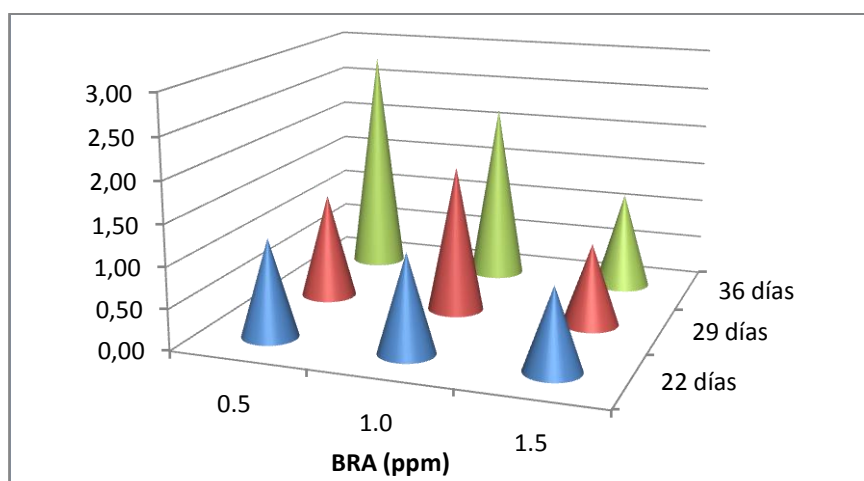


Figura 3.3.2.6.1 Tasa de Multiplicación para el segundo ensayo de multiplicación *in vitro* de Jiguerón.

⁷ La tasa de multiplicación es el resultado del promedio de yemas o brotes axilares (sanos) formados en cada explante a los 22, 29 y 36 días para este segundo ensayo.

3.3.2.7 Índice de Brotación

El índice de brotación indica qué tan cerca (índices altos) o lejos (índices bajos) se encuentran los brotes unos de otros en los explantes. Como se pudo observar en la tabla 3.3.2.7.1, el índice más bajo a los 36 días se observó en BRA3 (MSVG + 1.5 ppm BRA), en segundo lugar está el obtenido en el tratamiento BRA1 (MSVG + 0.5 ppm BRA) y el más alto se observó en BRA2 (MSVG + 1.0 ppm BRA).

Tabla 3.3.2.7.1 Índice de Brotación por tratamiento y distancia entre brotes (mm).

Tratamiento	Media de la distancia entre brotes (mm)	Índice Brotación.		
		22 días	29 días	36 días
BRA1	3.50	0,18	0,23	0,39
BRA2	1.50	0,05	0,37	0,75
BRA3	2.80	0,09	0,17	0,34

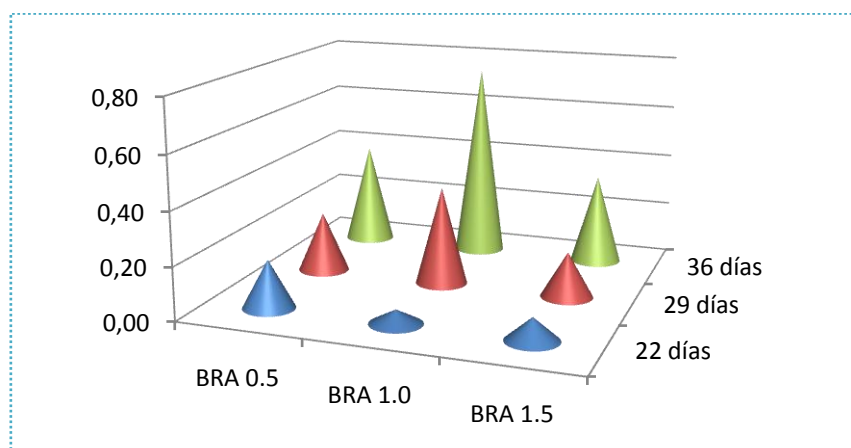


Figura 3.3.2.7.1 Índice de brotación de Jiguerón a los 22, 29 y 36 días para el segundo ensayo de multiplicación *in vitro*.

3.3.2.8 Análisis de Componentes Principales (ACP) para la Fase de Multiplicación *in vitro* de Jiguerón con Brasinolida

La gráfica (Figura 3.3.2.8.1) muestra las correlaciones entre los tratamientos con las componentes, donde; BRO 1 es longitud de brote uno, BRO 2 es la longitud de brote dos, IBrot es el índice de brotación y Nudos es el número de nudos obtenidos al final de la evaluación.

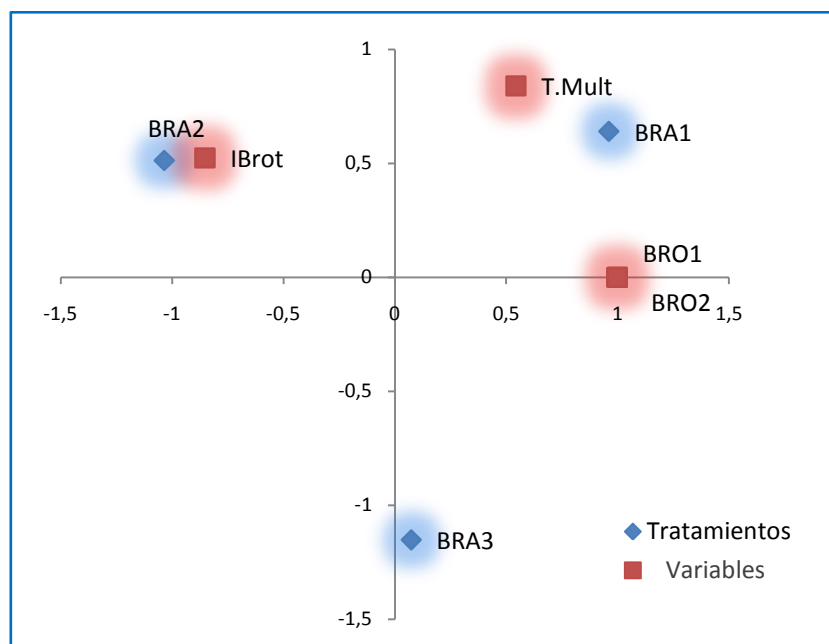


Figura 3.3.2.8.1: Análisis de Componentes Principales (ACP) para la Fase de Multiplicación *in vitro* de Jiguerón con Brasinolida

3.3.2.8.1 Análisis del Total de Varianza Explicada

Los resultados obtenidos del análisis del total de varianza explicada para esta fase de micropropagación, se muestran en la Tabla 3.3.2.8.1.1. Este análisis permite conocer el número de componentes necesarios para explicar la varianza de un modelo ACP obtenido en el apartado anterior.

Tabla 3.3.2.8.1.1 Análisis del total de varianza explicada del ACP del segundo ensayo de multiplicación *in vitro* de Jiguerón

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	3.015	75.367	75.367	3.015	75.367	75.367
2	.985	24.633	100.000	.985	24.633	100.000
3	1.825E-16	4.562E-15	100.000	1.825E-16	4.562E-15	100.000
4	-1.825E-16	-4.562E-15	100.000			

Extraction Method: Principal Component Analysis.

3.4 Fase de enraizamiento *in vitro* de plántulas regeneradas (Fase 3).

3.4.1 Contaminación y sobrevivencia

Durante esta fase de enraizamiento *in vitro* se perdió una parte muy pequeña de los explantes. La porción media de explantes contaminados fue del 6.7%, la sobrevivencia fue del 93.3%, el total de explantes bajo estudio, en promedio, fue de 28.0 unidades y no se observó muerte de los explantes (Tabla 3.4.1.1).

Tabla 3.4.1.1 Porcentajes medios de contaminación y sobrevivencia en la fase de enraizamiento *in vitro* de Jiguerón

Tratam.	N° total explantes	N° explantes contaminados	N° explantes muertos	N° explantes vivos	Contaminación (%)	Sobrevivencia (%)
T1	30.0	2.0	0.0	28.0	6.7	93.3
T2	30.0	2.0	0.0	28.0	6.7	93.3
T3	30.0	2.0	0.0	28.0	6.7	93.3
T4	30.0	2.0	0.0	28.0	6.7	93.3
Total	120.0	8.0	0.0	112.0	-	-
Media		2.0	0.0	28.0	6.7	93.3

3.4.2 Porcentaje de vitroplantas enraizadas

Los porcentajes de vitroplantas enraizadas a los 28 días se muestran en la tabla 3.4.2.1.

Tabla 3.4.2.1 Porcentajes de vitroplantas de Jiguerón enraizadas en cada tratamiento a los 28 días.

Tratamiento	Porcentaje de plantas enraizadas (%)
W0	83.3
M0	53.3
W5	90.0
M5	66.6

Como se puede observar en la tabla 3.4.2.1, el porcentaje más alto de enraizamiento se presentó en el tratamiento W5 (WPM/2 + 5uM IBA) y corresponde a un 90%. En segundo lugar se ubicó el tratamiento W0 (WPM/2 + 0uM IBA) con un 83.3%, en el tercer lugar se ubicó el tratamiento M5 (MSVG/2 + 5uM IBA) con un 66.6% y con el porcentaje más bajo se presentó el tratamiento M0 (MSVG/2 + 0uM IBA) con un 53.3%.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en cuanto a los análisis de varianza y al análisis de componentes principales para las variables número de raíces y longitud de raíces.

3.4.3 Número de raíces

El análisis de varianza para esta variable, durante los 14, 21 y 28 días detectó diferencias altamente significativas para el factor medio de cultivo (MC) a los 21 y 28 días, y para el factor dosis de regulador hubieron diferencias significativas a los 21 y 28 días (tabla 3.4.3.1), para la interacción MC*DR no se detectaron diferencias. Tras realizar una separación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se obtuvo que los mejores promedios, con respecto al tipo de medio de cultivo, se presentaban en el medio WPM (grupo A) con respecto a los obtenidos en el medio MSVG (grupo B) durante las tres lecturas realizadas (tabla 3.4.3.2) y que los mejores promedios a los 21 días fue con 5 μ M de IBA (grupo A), luego se ubicó la dosis 0 μ M (grupo B). A los 28 días se repitieron estas características, tan solo variaron los valores de media obtenidos para cada dosis (tabla 3.4.3.3). Los tratamientos que contienen el medio de cultivo WPM y la dosis con mayor promedio indicado de IBA es T3.

Tabla 3.4.3.1 Análisis de varianza del número de raíces.

F de V.	14 Días			21 Días		28 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	119						
Tratam	3	7.697	0.095 ns	36.911	0.0068 ns	47.052	0.0032 ns
MC	1	15.408	0.0394 *	67.500	0.0062 **	69.008	0.0086 **
DR	1	0.675	0.6636 ns	43.200	0.0275 *	72.075	0.0073 **
MC*DR	1	7.008	0.1627 ns	0.033	0.9507 ns	0.075	0.9300 ns
EE	116	3.550		8.673		9.667	

Pr>F: Valor de Probabilidad, MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis de regulador de crecimiento, para este caso AIB (Ácido indol butírico).

Tabla 3.4.3.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto del tipo de medio de cultivo en el número de raíces a los 14, 21 y 28 días.

Medio de Cultivo	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
WPM	1.583a	3.650a	3.950a
MSVG	0.867b	2.150b	2.433b

Tabla 3.4.3.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto de AIB en el número de raíces a los 14, 21 y 28 días.

Dosis Regulador	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
5 BAP	1.150	3.500a	3.967a
0 BAP	1.300	2.300b	2.417b

3.4.4 Promedio de longitud de raíces

El análisis de varianza para esta variable, durante los 14, 21 y 28 días detectó diferencias altamente significativas para el factor medio de cultivo (MC), y para el factor dosis de regulador hubieron diferencias altamente significativas a los 14 y 21 días (tabla 3.4.4.1), para la interacción MC*DR se detectaron diferencias a los 21 días. Tras realizar una separación de medias por medio de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se obtuvo que los mejores promedios, con respecto al tipo de medio de cultivo, se presentaban en el medio WPM (grupo A) con respecto a los

obtenidos en el medio MSVG (grupo B) durante las tres lecturas realizadas (tabla 3.4.4.2) y que los mejores promedios a los 14 días fue con 0 μ M IBA (grupo A), luego se ubicó la dosis 5 μ M (grupo B). A los 21 días se repitieron estos resultados, tan solo variaron los valores de media obtenidos para cada dosis (tabla 3.4.4.3). Los tratamientos que contienen el medio de cultivo WPM y 0 μ M de IBA es T1.

Tabla 3.4.4.1 Análisis de varianza del promedio de longitud de raíces.

F de V.	14 Días			21 Días		28 Días	
	GL	CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Total	119						
Tratam	3	27.328	<.0001**	277.578	<.0001**	373.900	0.0004**
MC	1	40.020	0.0005**	451.889	<.0001**	1047.055	<.0001**
DR	1	31.930	0.0018**	251.399	0.0027**	15.938	0.5987 ns
MC*DR	1	10.034	0.0759 ns	129.446	0.0298*	58.706	0.3133 ns
EE	116	3.128		26.733		57.239	

Pr>F: Valor de Probabilidad, MC: Factor Medio de cultivo, DR: Factor Dosis de regulador de crecimiento, para este caso AIB (Ácido indol butírico).

Tabla 3.4.4.2 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto del tipo de medio de cultivo en el promedio de longitud de raíces a los 14, 21 y 28 días.

Medio de Cultivo	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
WPM	1.872a	7.361a	12.083a
MSVG	0.716b	3.4801b	6.175b

Tabla 3.4.4.3 Prueba de Tukey ($p < 0.05$) para el efecto de AIB en el promedio de longitud de raíces a los 14, 21 y 28 días.

Dosis Regulador	Media aritmética		
	14 días	21 días	28 días
0 BAP	1.810a	6.868a	9.493
5 BAP	0.778b	3.973b	8.764

3.4.5 Análisis de Componentes Principales (ACP) para la fase de enraizamiento *in vitro* de Jiguerón.

La gráfica obtenida (Figura 3.4.3.6.1) muestra las correlaciones entre los tratamientos con las variables, donde; NTR es el número total de raíces, y LPR es la longitud promedio de las raíces al final de la evaluación.

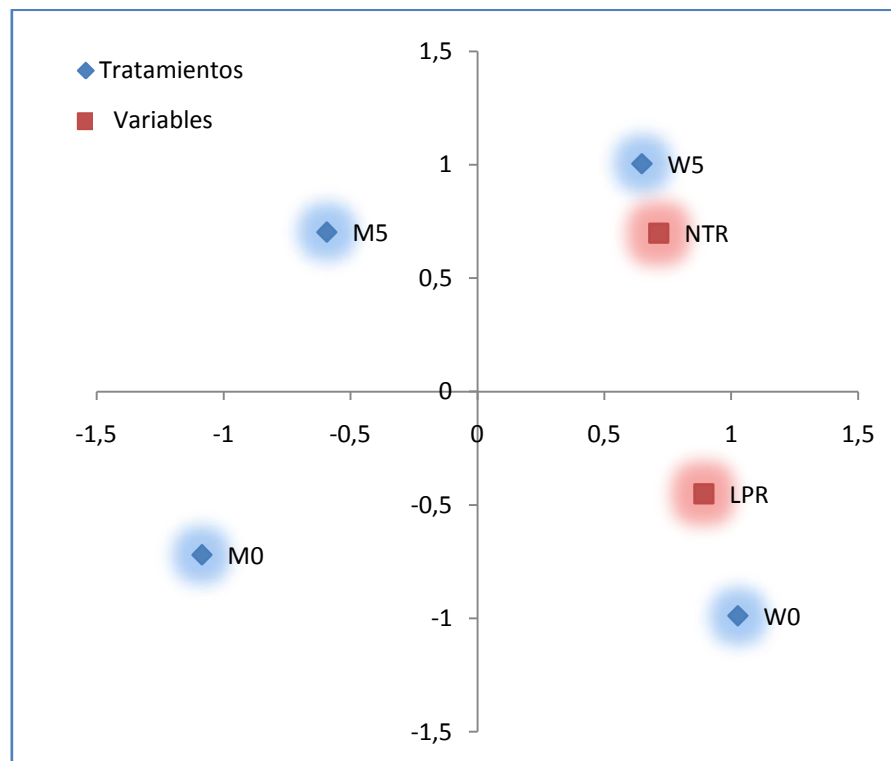


Figura 3.4.5.1 Análisis de Componentes Principales para la Fase de Enraizamiento *in vitro* de Jiguerón

3.4.5.1 Análisis del Total de Varianza Explicada

Los resultados obtenidos del análisis del total de varianza explicada para esta fase de micropropagación, se muestran en la Tabla 3.4.5.1.1. Este análisis permite conocer el número de componentes necesarios para explicar la varianza de un modelo ACP obtenido en el apartado anterior.

Tabla 3.4.5.1.1 Análisis del Total de Varianza Explicada del ACP para la fase de enraizamiento *in vitro* de Jiguerón

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	2.299	76.629	76.629	2.299	76.629	76.629
2	.701	23.371	100.000	.701	23.371	100.000
3	3.082E-6	.000	100.000	3.082E-6	.000	100.000

Extraction Method: Principal Component Analysis.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

La implementación de la técnica de cultivo *in vitro* para esta especie nativa bajo amenaza, responde a diferentes problemas en cuanto a su poca divulgación y escasa población en el país. Se espera contribuir con este estudio al desarrollo de nuevas investigaciones para esta especie puesto que no existe información preliminar *in vitro*.

4.1 Fase de Desinfección

El manejo de especies leñosas en condiciones *in vitro* en términos generales es una tarea difícil (Martínez, 2006), por lo que constituye en éxito la obtención de un 83.3% de sobrevivencia en los explantes, esto indica que el tratamiento T3 (Hipoclorito de Calcio al 20% durante 30 minutos) probado para la fase de desinfección es eficiente para esta especie, siempre que se trabaje con el mismo tipo de material vegetal. Porcentajes muy parecidos de sobrevivencia (78.2 y 80.7%) fueron obtenidos en dos ocasiones anteriores en las que se probó este mismo tratamiento, como parte de estudios preliminares con esta especie. En algunas especies de Verbenáceas como en *Tectona grandis* L.f, el tratamiento de desinfección planteado en brotes (también tratados previamente con agentes químicos previamente, como medida fitosanitaria) con hipoclorito de calcio (6%) por 8 minutos, fue insuficiente para la eliminación de patógenos obteniéndose un 34% de sobrevivencia (Abdelnour y Muñoz, 2005), sin embargo en éste estudio resultó que aumentar la concentración y tiempo de exposición al hipoclorito de calcio, además de sumergir por un minuto y treinta segundos en alcohol al 70%, disminuyeron la incidencia de patógenos en segmentos nodales de Jiguerón durante esta fase.

Como se puede observar en la Figura 3.1.1.1, a los 10, 20 y 30 minutos de exposición a la solución de hipoclorito de sodio al 20% no hubo ningún explante muerto, todos presentaban contaminación ya sea

bacteriana, fúngica o por la interacción bacteria-hongo. Por el contrario, a los 40 y 50 minutos el número de explantes muertos fue mayor que el número de explantes contaminados. Destacó el tratamiento T3 por su bajo número de explantes descartados y los tratamientos T4 y T5 destacaron por su elevado número de explantes muertos. A pesar de que el hipoclorito de calcio es considerado como alternativa al uso de Hipoclorito de Sodio, puesto que causa menor daño en los tejidos vegetales (Roca, 1991), se observó que mayores tiempos de exposición a la solución (T4 y T5) perjudicó al tejido vegetal, esto podría deberse a la acción germicida del cloro, ya que forma ácido hipocloroso cuando se mezcla con el agua, el oxígeno liberado en esta reacción es un agente oxidante muy fuerte y los microorganismos son destruidos por su acción sobre los componentes celulares. Además, el cloro puede combinarse con enzimas y otras proteínas de la membrana celular inactivándolas (García, 1995).

La frecuencia más alta de contaminación fue debido a la contaminación por hongos con un 23%, esto puede deberse a una esterilización superficial inadecuada o a una inadecuada manipulación (Montoya, 1991). Los géneros de hongos más comunes en cultivos *in vitro* son: *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Microsporium* y *Phialophora* (Liefert & Waites, 1998). Es necesario mencionar que la contaminación por hongos fue letal, es decir el explante dejaba de crecer y en poco tiempo moría.

El segundo lugar de frecuencia de contaminación fue debido a la contaminación bacteriana que, en algunos explantes no fue tan letal, debido a que pudo tratarse de bacterias benéficas que suelen permanecer en los explantes de forma endógena y bajo condiciones *in vitro* pudieron activarse (Liefert & Waites, 1998). Sin embargo un 9% de los explantes en este estudio fueron descartados debido a la presencia de este tipo de microorganismo. Los géneros de bacteria más frecuentemente observados en cultivo de tejidos *in vitro* se muestran en el cuadro 4.1.1.

Cuadro 4.1.1 Géneros de bacteria más frecuentemente observados en cultivo de tejidos *in vitro*.

Géneros de Bacteria	Porcentaje (%)
Staphylococcus	26
Pseudomonas	19
Bacillus	13
Enterobacter	12
Lactobacillus	11

Fuente: Liefert & Waites, 1998

4.2 Fase de establecimiento *in vitro* del cultivo (Fase 1).

En esta fase no se observó la formación de callo en los nudos de los explantes sino que la formación de los brotes se dió directamente. La organogénesis directa a partir de la regeneración de yemas axilares asegura la estabilidad genética de las plantas regeneradas y es útil cuando el objetivo es la propagación clonal a gran escala (Severin, 2005).

Los análisis permitieron determinar que el factor: medio de cultivo, influyó significativamente en cuanto a la obtención de un mayor número de brotes, nudos y longitudes, a partir de segmentos nodales de Jiguerón. Lo cual indica que para la obtención de buenos resultados, en esta fase, es necesario trabajar con el medio de cultivo MSVG más que con en medio WPM, donde el crecimiento se presentó lento, el número de brotes y nudos no fue alto. Esto sugiere que el tipo de sales del medio MSVG tiene una influencia directa sobre todas estas variables. Sin embargo, estos resultados contrastan con estudios realizados con el medio WPM para la propagación *in vitro* de otras especies de algunas plantas leñosas como *Ulmus glabra* (Birosiková *et al.*, 2004) y *Taxus bacatta* (Majada *et al.*, 2000) en los que la respuesta en cuanto al número de brotes y longitudes no fueron muy altos.

El factor: dosis de regulador (BAP), influyó de formas no significativas, significativas y altamente significativas, dependiendo de la

variable analizada y de la fecha de evaluación, pero se determinó que con la dosis más alta ($8\mu\text{M}$ ($1.800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)) se obtiene un mayor número de brotes, nudos y longitudes, a partir de segmentos nodales de Jiguerón cultivados en esta fase. Las observaciones también muestran un efecto inhibitorio de formación de raíces en los explantes donde el medio contiene BAP, Sauvage y Galzy (1981) han descrito este efecto inhibitorio de citoquininas en el enraizamiento de caña de azúcar.

4.2.1 Longitud de brote uno y dos y su promedio

Debido a que visualmente algunos de los brotes, de un mismo explante, presentaron diferencias de crecimiento entre ellos, se decidió realizar un análisis por separado de sus longitudes. Los resultados mostraron que los brotes uno (de la izquierda) presentaron un crecimiento ligeramente mayor durante todo el estudio con respecto a los brotes dos (de la derecha). Sin embargo al comparar los resultados obtenidos por separado, con los del promedio entre el brote uno y dos, se encontró mucha similitud en los resultados del análisis de varianza tanto para el factor medio de cultivo (MC) como para el factor dosis de regulador (DR).

Los análisis de varianza realizados en este estudio, tanto por separado como en promedio, mostraron que con el medio MSVG y $8\mu\text{M}$ de BAP (dosis más alta) se obtienen las mejores longitudes de brotes, la tendencia general que se observó es que al aumentar la concentración de BAP, aumentaba la longitud. Sin embargo, se observaron menores longitudes al aumentar 0 a $2\mu\text{M}$ la dosis de BAP. Esta tendencia también se observó en los resultados obtenidos por Steephen *et al.* (2010) en cuanto a la respuesta de segmentos nodales de la verbenácea medicinal Lagundi (*Vitex negundo*) a diferentes concentraciones de BAP, donde con las dosis de BAP, 0.1, 0.5 y $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ la longitud de los brotes aumentaba (10.62, 18.50 y 28.10 mm, respectivamente), sin embargo al probarse con $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, la longitud disminuyó a 19.25 mm y con la máxima concentración ($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) la longitud fue 19.02 mm. Esto es contrario a lo obtenido por Cruz (2004) donde al analizar la longitud de brotes de Teca,

la mejor repuesta se presentó en el tratamiento con la dosis más baja de BAP (MS + 0.5 mg.L⁻¹), mientras que con la dosis más alta (1.5 mg.L⁻¹) las longitudes fueron menores. También, Marino *et al.* (2003) reportan menores longitudes al aumentar la concentración de citoquininas (BA) al medio de cultivo para establecimiento de *Glandularia perakii* Cov. et Schn. (*Verbenaceae*).

4.2.2 Número de brotes

El mayor número de brotes se registró con el medio MSVG y con la dosis más alta de BAP (8 µM), este resultado indica que en este medio de cultivo se incrementó el número de brotes con respecto al número natural de esta especie.

La tendencia general tras analizar esta variable fue que al aumentar la concentración de BAP, aumentaba el número de brotes (Aleman, 2000), sin embargo se presentó una excepción con la dosis 6 µM (1.350 mg.L⁻¹) de BAP con la cual se obtuvo un menor número de brotes que con la dosis anterior 4µM (0.900 mg.L⁻¹). Estos resultados se asimilan a los obtenidos por Steephen *et al.* (2010) en cuanto a la respuesta de segmentos nodales de la verbenácea medicinal Lagundi (*Vitex negundo*) a diferentes concentraciones de BAP, donde se observó que al aumentar su concentración se conseguían mayor número de brotes, sin embargo, en este estudio también se presentó una excepción, ya que al aumentar la concentración de 0.5 a 1.0 mg.L⁻¹ no se produjeron más brotes, sino que se obtuvo el mismo número de brotes.

4.2.3 Número de nudos

El mayor número de nudos se registró con el medio MSVG y con la dosis más alta de BAP (8µM). Esto indica que ésta dosis es eficiente para reducir la dominancia apical e inducir la generación de un mayor número de yemas axilares en Jiguerón (Hartmann *et al.*, 1997). Estos resultados

son contrarios a los obtenidos por Ocampo y Núñez (2007) en los que el número de nudos de guayaba (*Psidium guajaba*) es mayor en el medio de cultivo WPM. Esto podría deberse a las diferentes composiciones en sales de los medios de cultivo.

4.2.4 Análisis de Componentes Principales (ACP) para la Fase de Establecimiento *in vitro* de Jiguerón

A través de este análisis factorial de componentes principales se pudo ubicar en forma gráfica a las variables y a los tratamientos probados de acuerdo a su grado de correlación, lo cual ayuda a interpretar todos los resultados obtenidos en esta fase. Además el análisis del total de varianza explicada (tabla 3.2.8.1.1) muestra que el modelo factorial obtenido es muy eficiente ya que con dos componentes se logra explicar un 93.47% el comportamiento de la varianza de las variables evaluadas en esta fase.

Como se puede observar en la figura 3.2.8.1.1 las variables, longitud de brote uno (BRO 1), brote dos (BRO 2) y Longitud promedio de de brotes adicionales (LPbro), están sobrepuestas lo cual indica que estas variables están muy correlacionadas entre ellas. Los tratamientos que más se identifican con las variables (Nudos, LPbro, LB1, LB2) son T2, T3, T4 y T5. Los tratamientos T2 y T4 se acercan mucho a la componente Descarte, lo cual indica que en estos tratamientos hubo más muerte de explante y contaminación que en T5 y T3. El tratamiento T5 al estar más hacia la derecha se muestra como el mejor tratamiento. El tratamiento T3 tiene mayor correlación con las variables TBBG, BRO 1 y 2 y LPBro, pero se encuentra opuesto a Nudos. Los tratamientos T6 y T8 se ubican opuestos a las variables Nudos y Descarte. Los tratamientos T1, T7 y T9 se encuentran correlacionan mucho con la componente Descarte, lo cual indica que en estos tratamientos hubo más muerte de explante y contaminación que en los otros tratamientos. El tratamiento T10 al encontrarse casi en el “cero” no muestra correlación con ninguna de las componentes o variables. Todos estos resultados concuerdan con lo obtenido anteriormente (por separado) en los análisis de varianza

realizados por cada variable, donde el tratamiento T5 (MSVG + 8 μM ($1.800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) BAP) es en el que se concentran los mejores resultados de media para todas las variables bajo estudio.

4.3 Fase de Multiplicación o proliferación *in vitro* de brotes (Fase 2).

4.3.1 Primer ensayo de multiplicación

En esta fase el porcentaje de sobrevivencia fue del 90.83%, lo cual indica que las condiciones de manipulación fueron óptimas.

4.3.1.1 Longitud de brote uno, dos y su promedio

Debido a que visualmente algunos de los brotes, de un mismo explante, presentaron diferencias de crecimiento entre ellos, se decidió realizar un análisis por separado de sus longitudes. Los resultados mostraron que los brotes dos (de la derecha) presentaron un crecimiento significativamente mayor durante todo el estudio con respecto a los brotes uno (de la izquierda), de esta manera fue útil la realización de este análisis. Los resultados del promedio entre el brote uno y dos, fueron similares a los del brote dos, tanto para el factor medio de cultivo (MC) como para el factor dosis de regulador (DR).

Los análisis de varianza de longitud realizados muestran que con el medio de cultivo MSVG se obtienen longitudes mayores de los brotes con respecto al medio WPM, esto se debe a las distintas composiciones de los medios de cultivo. En cuanto a las comparaciones entre el uso de BAP y KIN para esta fase, los resultados no mostraron diferencias significativas, y aunque los mayores valores de longitud se presentan en el tratamiento T2 (MSVG + 8 μM ($1.800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) BAP), le sigue muy de cerca el tratamiento T5 (MSVG + 4 μM ($0.861 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) KIN), lo cual indica que no habría diferencia (estadística) entre añadir BAP o KIN al medio de cultivo en esas dosis, esto puede deberse a que el tiempo de evaluación fue muy corto y por eso al analizar los datos no se pudo determinar claramente si en

realidad fue igual colocar KIN o BAP en el medio de cultivo para esta especie. Este resultado es contrario a lo obtenido por Salas *et al* (2005) donde al evaluar el efecto de BAP y KIN en yemas apicales de *Morus alba L.* reporta valores superiores de longitud de brotes en los tratamientos donde se empleó el BAP en relación con aquellos en los cuales se utilizó KIN, para una misma concentración.

4.3.1.2 Número de brotes

Debido a que la formación de brotes adicionales fue muy poca y casi siempre se mantuvo el mismo número de brotes presentes en los explantes de partida, los resultados cayeron en la “no significancia estadística”. Sin embargo al observar las tablas 3.3.5.2 y 3.3.5.3 se tiene que, con el medio MSVG y con la dosis 8 μ M BAP se obtienen los resultados más altos. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Salas *et al.* (2005), donde al evaluar el efecto de BAP y KIN en yemas apicales de *Morus alba L.* reporta mayor número de brotes en los tratamientos donde se empleó el BAP en relación con aquellos en los cuales se utilizó KIN, para una misma concentración, lo cual está relacionado con los efectos fisiológicos esperado del BAP.

4.3.1.3 Tasa de Multiplicación

La mayor tasa de multiplicación *in vitro* de Jiguerón que se obtuvo fue de 4 brotes/explante con los tratamientos T2 (MSVG + 8 μ M (1.800 mg·L⁻¹) BAP) y T5 (MSVG + 4 μ M (0.861 mg·L⁻¹) KIN), esto indica que tanto con 8 μ M de BAP como con 4 μ M KIN se pueden obtener (en promedio) el mismo número de yemas axilares, esto es contrario a lo reportado por Abdelnour y Muñoz (2005) donde con 2 mg·L⁻¹ BAP el número de yemas axilares obtenidas de Teca es mayor que con 0.2 mg·L⁻¹ KIN.

En este estudio, fisiológicamente, con el uso de 8 μ M BAP se contrarrestó notablemente la dominancia apical, permitiendo así el

desarrollo de un mayor número de yemas axilares, la expansión foliar fue normal tanto con 4 como con 8 μ M y se inhibió el desarrollo radicular con 4 y 8 μ M. Mientras que con el uso de KIN se contrarrestó (menos que con BAP) la dominancia apical permitiendo así el desarrollo de yemas axilares, lo que más se vio estimulada fue la expansión foliar, que con la dosis 4 μ M fue muy evidente, y con 4 y 8 μ M no se inhibió el desarrollo radicular, lo cual fue ventajoso ya que se pudo cumplir la multiplicación y enraizamiento *in vitro* en un solo paso, haciendo más eficiente el proceso de propagación (Salas *et al.*, 2005).

A pesar de que en esta fase se probó los efectos de BAP y KIN por separado y sin ninguna adición de auxinas, varios autores como Abdelnour y Muñoz (2005), Pedroza *et al.* (2007) y Rayen *et al.* (1999) sugieren que en algunos casos es necesaria la adición de auxinas en esta fase para garantizar un balance interno en los tejidos que promueven el crecimiento y diferenciación de los brotes, así como estimule el incremento de las tasas de multiplicación. Esto se debe a que, en leñosas, las auxinas promueven la actividad del cambium en el tejido vascular, estimulan la división celular, se expanden las yemas por el movimiento de las auxinas hacia los tallos y se forma tejido vascular secundario, que da como resultado la brotación de las yemas axilares.

4.3.1.4 Índice de Brotación

El índice alto de brotación para el tratamiento T2 (MSVG + 8 μ M (1.800 mg·L⁻¹) BAP) se debe a que en este tratamiento se presentaron en total 9 brotes adicionales en 6 de los explantes, lo cual hizo que se los contara para esta variable ya que sus brotes desarrollaron entre 1 y 2 nudos y a pesar de que con este mismo tratamiento los resultados anteriores mostraron mayor longitud, se presentó la distancia media más baja entre los brotes o yemas, esto se podría considerar como una desventaja, ya que al encontrarse aglomerados, su manipulación se dificulta (Pierik, 1990). El tratamiento T5 (MSVG + 4 μ M (0.861 mg·L⁻¹) KIN) se encuentra en tercer lugar en cuanto a índices más altos, pero la ventaja

que se presenta, respecto a T2, es que al tener entrenudos más largos se facilita su manipulación y su tasa de multiplicación no es menor. Aunque la tendencia se entendería como mejor con índices bajos, no siempre es tan positivo puesto que se darían casos como los que se presentaron en los tratamientos T7, T8, T6 y T3 donde hubo mayor elongación de tallos que formación de nudos (brotes axilares), lo cual disminuyó la tasa de multiplicación para estos tratamientos.

4.3.1.5 Análisis de Componentes Principales (ACP) para el primer ensayo de la Fase de Multiplicación *in vitro* de Jiguerón

A través de este análisis factorial de componentes principales se pudo ubicar en forma gráfica a las variables y a los tratamientos probados de acuerdo a su grado de correlación, lo cual ayuda a interpretar todos los resultados obtenidos en esta fase. Además el análisis del total de varianza explicada (tabla 3.3.9.1.1) muestra que el modelo factorial obtenido es eficiente ya que con dos componentes se logra explicar un 71.7% el comportamiento de la varianza de las variables evaluadas en esta fase.

De acuerdo a la gráfica se puede observar que, con el eje x (en esta fase) están muy correlacionadas las variables, Índice de Brotación y número de nudos. Con una correlación menor está la variable, total de brotes basales y con una correlación aún menor están las variables, longitud promedio de brotes basales adicionales. Longitud de brote uno y longitud de brote dos. Con el eje y está muy correlacionada la variable Descarte.

El tratamiento T2 se correlacionó mucho con las variables Nudos, índice de brotación y tasa de multiplicación, además fue el que menos se identificó con la variable Descarte. El tratamiento T5 se identificó más con las longitudes de los brotes uno y dos. Por otro lado T4, T3, T8 al estar identificados con la variable Descarte fueron los tratamientos que más número de explantes contaminados o muertos tuvieron. Los tratamientos

T3, T8 y T1 presentaron menor tasa de Multiplicación y menor longitud en los brotes iniciales. Los tratamientos T6 y T7 fueron los tratamientos con menor Descarte pero no produjeron muchos brotes basales adicionales y su longitud fue muy pequeña. Todos estos resultados concuerdan con lo obtenido anteriormente (por separado) en los análisis de varianza realizados por cada variable, donde el tratamiento T2 (MSVG + 8 μM (1.800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) BAP) es en el que se concentran los mejores resultados de media para la mayoría de variables bajo estudio, sin embargo con el tratamiento T5, se utiliza menor concentración de fitorregulador y se obtiene la misma tasa de multiplicación que con T2, además son más largos y su índice de brotación mostró ser el más equilibrado en cuanto a número de brotes/distancia entre brotes.

4.3.2 Segundo ensayo de multiplicación

En esta fase se perdieron más explantes con respecto al primer ensayo debido a contaminación (4.58%) y muerte de los explantes, esto puede deberse a una mala manipulación del material con el que se trabajó (Montoya, 1991).

El comportamiento organogénico de los explantes fue de formación directa de raíces, o de yemas axilares (nudos) para Jiguerón, lo cual concuerda a lo reportado por Plana *et al.* (2002) tras analizar el efecto de un compuesto análogo a Biobras6 en la morfogénesis de plantas de tomate (var. Amalia), donde se encontró que las dosis bajas de producto aumenta la capacidad de regeneración directa de brotes hasta en un 50% de los explantes. Algunos autores como González *et al.* (1998) sugieren una posible acción de los brasinoesteroides como promotores de la diferenciación celular, aunque por ahora se desconozcan los mecanismos por los cuales se llevan a cabo.

4.3.2.1 Longitud de brote uno, dos y su promedio

Debido a que visualmente algunos de los brotes, de un mismo explante, presentaron diferencias de crecimiento entre ellos, se decidió realizar un análisis por separado de sus longitudes. Los resultados mostraron que los brotes uno (de la izquierda) presentaron un crecimiento significativamente mayor durante todo el estudio con respecto a los brotes dos (de la derecha). De esta manera fue útil la realización de este análisis. Los resultados del promedio entre el brote uno y dos, fueron similares a los del brote uno, tanto para el factor medio de cultivo (MC) como para el factor dosis de regulador (DR).

Los análisis de varianza de longitud realizados mostraron que con la dosis más baja de Brasinolida (0.5 ppm) se obtuvo la mayor longitud en los brotes, lo cual es opuesto a los resultados obtenidos por Jiménez *et al.* (2002) donde las alturas de los brotes de plátano FHIA-21 fueron mayores al aumentar la dosis de BIOBRAS-6, de 0.01 a 0.05 mg.L⁻¹.

4.3.2.2 Número de brotes

Debido a que no hubo la formación de brotes adicionales, es decir, no se dio ningún caso en el cual se hayan generado más brotes basales, aparte de los que ya estaban presentes en los explantes de partida, más bien se observó la formación de raíces, los resultados cayeron en la “no significancia estadística”. Esto podría deberse a que no se adicionó BAP al medio de cultivo, lo cual produjo un desbalance en la relación auxina-citoquinina provocando que se tenga como resultado un claro efecto auxínico de la Brasinolida, tenido como resultado la formación de raíces. Esto concuerda con lo obtenido por Jiménez *et al.* (2002) donde el efecto de la Brasinolida (BIOBRAS-6) en la fase de multiplicación de la variedad de plátano FHIA-21, tuvo también un efecto auxínico en ausencia de BAP; el número promedio de raíces en los explantes fue de 6.1 y 7.9, mientras que el número de brotes disminuyó de 3.8 a 1.7/explante.

4.3.2.3 Tasa de Multiplicación

Las tasas de multiplicación no mostraron diferencias estadísticas, sin embargo la mayor cantidad de yemas axilares o vástagos se obtuvo con la dosis más baja de Brasinolida (0.5 ppm), esto concuerda con lo obtenido por Jiménez *et al.* (2002), donde con la dosis más baja de Biobras-6 se obtuvieron el mayor número de yemas axilares, esto también es una consecuencia de lo mencionado anteriormente en cuanto al comportamiento organogénico provocado en los explantes.

4.3.2.4 Índice de Brotación

Un índice alto de brotación indica que los brotes se encuentran muy cerca, es decir los espacios entre los nudos no es muy grande, esto puede ser una desventaja, puesto que al encontrarse muy cerca los brotes axilares, su manipulación se dificulta (Pierik, 1990). Por el contrario, un índice de brotación bajo indica que los espacios entre los nudos es mayor y esto corresponde a crecimientos más normales, y es un indicativo de que los tallos se han desarrollado más en los explantes con estos índices. Como se pudo observar, la media de la distancia entre brotes durante las tres fechas de evaluación fue mayor para el tratamiento BRA1 (MSVG + 0.5 ppm BRA), esto muestra que con esta dosis los explantes se desarrollan bien, forman nuevas yemas axilares y éstas no se encuentran aglomeradas. Lo obtenido concuerda coherentemente con los resultados anteriores, donde con esta misma dosis se obtuvieron explantes con mayor longitud.

4.3.2.5 Análisis de Componentes Principales (ACP) para la Fase de Multiplicación *in vitro* de Jiguerón con Brasinolida

A través de este análisis factorial de componentes principales se pudo ubicar en forma gráfica a las variables y a los tratamientos probados de acuerdo a su grado de correlación, lo cual ayuda a interpretar todos los resultados obtenidos en esta fase. Además el análisis del total de varianza

explicada (tabla 3.3.2.8.1.1) muestra que el modelo factorial obtenido es totalmente eficiente ya que con dos componentes se logra explicar un 100% el comportamiento de la varianza de las variables evaluadas en esta fase.

De acuerdo a la gráfica (figura 3.3.2.8.1) se puede observar que, con el eje x (en esta fase) están muy correlacionadas las variables BRO1 y BRO2. Con una correlación menor está la variable Nudos, ya que ésta se correlaciona más con la con el eje y. El IBRot está correlacionado con el eje y positivo, y con el eje x negativo. El tratamiento T3 (1.5 BRA) no se identifica ni con longitud del Brote ni con índice de brotación y es opuesto a Nudos. El tratamiento T2 (1.0 BRA) se encuentra muy correlacionado con el índice de brotación, menor correlación con Nudos y aún menor es la correlación con la longitud de los brotes. El tratamiento T1 (0.5 BRA) tiene alta correlación con Nudos, menor correlación con la longitud de los brotes y aún menor es la correlación con el índice de brotación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente mediante al análisis de varianza, donde con la dosis 0.5 de Brasinolida se obtienen los mejores resultados en todas las variables.

4.4 Fase de enraizamiento *in vitro* de plántulas regeneradas (Fase 3).

En esta fase el porcentaje de sobrevivencia es mayor al 90%, lo cual indica que las condiciones asépticas fueron óptimas y también que las vitroplantas se adaptaron de forma idónea a las nuevas condiciones de sustrato (Pierik, 1990).

En especies leñosas esta fase es complicada debido a su limitada capacidad rizogénica (Echenique *et al.*, 2004). Sin embargo en este estudio no solo hubo desarrollo de raíces, sino que su formación fue directa en los explantes, es decir, sin la formación de callo basal. La rizogénesis directa también fue observada por varios autores Sansberro y Mroginski (1995) en *Aloysia polystachia*.

4.4.1 Porcentaje de vitroplantas enraizadas

El efecto del tipo medio de cultivo en la rizogénesis fue determinante, teniéndose así que el medio MSVG no presentó ser efectivo para esta fase ya que al observar los resultados de porcentajes de vitroplantas enraizadas, tanto en el tratamiento M0 y M5, los porcentajes fueron los más bajos. Esto puede deberse a los contenidos de sales de este medio de cultivo.

Los porcentajes más altos de plantas enraizadas se presentaron en los tratamientos con el medio WPM a la mitad de la concentración, esto indica que las sales contenidas en este permitieron el desarrollo radicular en las vitroplantas de Jigueron; además del medio de cultivo se observó que la presencia de auxina también aumentó el número de raíces por vitroplanta, lo cual era esperando ya que las propiedades de las auxinas consisten en promover el desarrollo radicular.

4.4.2 Número de raíces

El mayor número de raíces se registró en el tratamiento W5 (WPM/2 + 5 μ M IBA) esto indica que la presencia de la fitohormona aumentó la producción de raíces por cada vitroplanta, este resultado coincide con lo obtenido por Cruz (2004), Abdelnour y Muñoz (2005), cuyos mejores tratamientos en cuanto al número de raíces de teca (*Tectona grandis*), fue con la adición de la fitohormona IBA al medio de cultivo.

4.4.3 Promedio de longitud de raíces

El mayor promedio de longitud de raíces se registró en el tratamiento W0 (WPM/2 + 0 μ M IBA), este resultado se asimila a los obtenido por Cruz (2004), cuyo mejor tratamiento en cuanto a la longitud de raíz de Teca obtenida fue aquel que no contenía fitohormonas (testigo), Sin embargo estos resultados fueron contrarios a los obtenidos por Ramos (2000), cuyo testigo (sin fitohormonas) obtuvo la menor longitud de raíz.

4.4.4 Análisis de Componentes Principales (ACP) para la fase de enraizamiento *in vitro* de Jiguerón.

A través de este análisis factorial de componentes principales se pudo ubicar en forma gráfica a las variables y a los tratamientos probados de acuerdo a su grado de correlación, lo cual ayuda a interpretar todos los resultados obtenidos en esta fase. Además el análisis del total de varianza explicada (tabla 3.4.3.6.1.1) muestra que el modelo factorial obtenido es totalmente eficiente ya que con dos componentes se logra explicar un 100% el comportamiento de la varianza de las variables evaluadas en esta fase.

De acuerdo a la gráfica (figura 3.4.3.6.1) se puede observar que, con la componente x (en esta fase) están muy correlacionadas las variables LPR y DC. Con una correlación menor está la variable NTR, ya que ésta se correlaciona más con la componente y . Los tratamientos W5 y M5 se identificaron más con la variable número total de raíces y fueron contrarios a la variable longitud promedio de raíz. Los tratamientos W0 y M0 se identificaron más con la variable longitud promedio de raíz y fueron contrarios a la variable número total de raíces. Lo cual indica que al adicionar la auxina IBA al medio de cultivo aumenta el número de raíces, pero disminuye la longitud de estas. Y por el contrario, si no se adiciona la auxina al medio de cultivo, el número de raíces es reducido pero sus longitudes son mayores. Estos resultados concuerdan con lo obtenido anteriormente a través del análisis de varianza.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. El Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*) pudo ser micropropagado *in vitro* en los medios de cultivo MSVG y WPM y mediante la utilización de los biorreguladores, BAP, KIN, Brasinolida y AIB.
2. Con el tratamiento T3 (Hipoclorito de Calcio al 20% durante 30 minutos) propuesto para la fase de desinfección, se logró el porcentaje de contaminación más bajo (16.7%), además del menor número total de explantes descartados (5 unidades), y por lo tanto la mayor cantidad de explantes libres de contaminantes microbianos exógenos.
3. Mayores tiempos de exposición a la solución de hipoclorito de calcio al 20%, causaron la muerte del tejido en varios explantes. Por el contrario, tiempos más bajos al tratamiento óptimo (T3) produjeron más explantes descartados por la presencia de contaminantes.
4. En la fase de Establecimiento *in vitro*, en el tratamiento T5 (MSVG + 8 μ M de BAP) se concentraron los valores más altos de media para las variables: número de nudos, longitud promedio de brotes adicionales, número de brotes y promedio de longitud de brote uno y dos, por lo tanto fue el mejor tratamiento para esta fase.
5. En la fase de Multiplicación *in vitro* (primer ensayo), el tratamiento T2 (MSVG + 8 μ M de BAP) es en el que se concentra el valor más alto de media para la variable total de brotes basales, por lo tanto mayor número de brotes. Sin embargo su alto índice de brotación (3.3 brotes/milímetro) muestra que se encuentran muy cerca y esto dificulta su posterior manipulación, por el contrario con el tratamiento T5 (MSVG + 4 μ M KIN) aunque disminuye en número de brotes basales, su bajo índice de brotación (1.5 brotes/milímetro) muestra que la longitud de los entrenudos es mayor y por lo tanto su manipulación se facilita.

6. La mayor tasa de multiplicación de Jiguerón que se obtuvo en el primer ensayo fue de 4 brotes/explante con los tratamientos T2 (MSVG + 8 μ M de BAP) y T5 (MSVG + 4 μ M KIN), esto indica que tanto con 8 μ M de BAP como con 4 μ M KIN se pueden obtener (en promedio) el mismo número de yemas axilares y considerando que, con 4 μ M de KIN no se inhibe el desarrollo radicular, se puede entonces prescindir de una fase de enraizamiento al trabajar con este tratamiento.
7. Para las fases de Establecimiento y Multiplicación *in vitro* de Jiguerón, el tipo de medio de cultivo mostró siempre diferencias estadísticas significativas, siendo el medio MSVG sobre el cual se presentaron los mejores valores de medias para todas las variables analizadas en estas fases.
8. En el segundo ensayo de Multiplicación *in vitro* de Jiguerón el efecto de la adición de Brasinolida al medio MSVG fue significativa únicamente para la variable: promedio de brotes uno y dos con la dosis 0.5 ppm.
9. La mayor tasa de multiplicación de Jiguerón en el segundo ensayo fue de 3 brotes/explante con el tratamiento BRA1 que contiene la dosis más baja de Brasinolida (0.5 ppm).
10. Para la fase de Enraizamiento *in vitro* de Jiguerón, el tipo de medio de cultivo mostró siempre diferencias estadísticas significativas, siendo el medio WPM sobre el cual se presentaron los mejores valores de medias para todas las variables: número de raíces y promedio de longitud de raíces.
11. En la fase de Enraizamiento *in vitro* el mayor número de raíces se logró con en el tratamiento W5 (WPM/2 + 5 μ M IBA) con un 90% de plantas enraizadas, con un promedio de 5.08 raíces/vitroplanta.
12. La adición de la auxina IBA al medio de cultivo (MSVG y WPM) promovió el desarrollo radicular de las vitroplantas regeneradas, sin embargo disminuyó la longitud de las mismas.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Para reducir los porcentajes contaminación de las especies que se introducen al laboratorio, recomiendo adecuar un cuarto para un pre-tratamiento de plantas madre bajo condiciones de sanidad más controladas.

Para posteriores ensayos de multiplicación con Brasinolida se recomienda probar también la adición de BAP al medio de cultivo puesto que sin ella se promueve más la formación de raíces en los explantes, minimizando las tasas de multiplicación en esta etapa.

Para posteriores ensayos de multiplicación sería recomendable probar, junto con el BAP y KIN, concentraciones bajas de auxinas en el medio de cultivo para examinar su efecto fisiológico en esta fase.

Para acelerar el proceso de aclimatación recomiendo que el enraizamiento sea probado directamente sobre sustratos sólidos, previo un tratamiento de inmersión en soluciones concentradas de auxinas.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Abdelnour, A., & Muñoz, A. (2005). Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). Revista Forestal Kurú (Costa Rica), 2(5).

Birosiková, M., K. Spisàková, S. Liptak & V. Pichler. (2004). Micropropagation of mature wych elm (*Ulmus glabra* Hud). Plant Cell, 22. 640-644.

Bustos, H. (2008). Manual de Educación Ambiental. Ecuador: Corporación Editorial Nacional.

CESA (Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas). (1992). Usos tradicionales de las especies forestales nativas en el Ecuador. Quito: FEPP.

Coloma, L. y Ron, S. (2001). Ecuador Megadiverso. Quito: PUCE

Cruz, N. (2004). Micropropagación Clonal *In vitro* de árboles Seleccionados de *Tectona grandis* L. (Teca). Extraído el 3 de marzo, 2011 del sitio web de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo: www.uteq.edu.ec/u_investigacion/biotecnologia/5.pdf

Dodds, J.H. (1991). In Vitro Methods for Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman y Hall, London, 240 pp.

Clouse, S.D., & Sasse, J.M. (1998). Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* Plant Mol. Biol. 49, 27-51

Costa-Lotufo, LV. (2004). Antiproliferative effects of abietane diterpenes from *Aegiphila lhotzkyana*. Extraído el 11 de enero, 2011, del sitio web del Department of Physiology and Pharmacology. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14994200

De la Torre, E. (2008.) Enciclopedia de plantas útiles del Ecuador. Quito: PUCE

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

Escalante, VJ. (1995). Biotecnología vegetal, su conservación y uso de los recursos genéticos. Costa Rica: CATIE.

Estrella R. (1996). Biología y Ecología. Parques y reservas protegidos en el Ecuador. Ecuador

Falk, D. (1989). The Theory of Integrated Conservation Strategies for Biological Diversity. En: Proceedings of the Natural Areas Association. Syracuse, NY, 6-9

Gangotena, E. *et al*, (1990). El ecosistema forestal urbano en Quito. Tipología de los espacios urbanos para aplicaciones de silvicultura. Quito. Ecuador

García, V. (1995). Introducción a la microbiología. Editorial de la Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. 268 p

Garnica, T. *et al.* (2005). Cultivo y Propagación in vitro de Cactaceas, Agavaceas, Nolináceas y Especies Forestales.

Gillman, M. (1997). Plant Population Ecology. London: Chapman y Hall.

González, S. *et al.* (1998). Actividad biológica de diferentes brasinoesteroides en *Rhaphanus sativus* L. y *Saccharum officinarum*. Tesis previa a la obtención del título de Máster en Biotecnología Vegetal.

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

Hofstede, R., J. Lips, W. Jongsma, y Sevink, J. (1998). Geografía, Ecología y Forestación de la Sierra Alta del Ecuador. Ecuador: Abya Yala.

Hummer, K. (1999). Biotechnology in Plant Germplasm Acquisition. En: Plant Conservation Biotechnology. Benson, E. (ed.). Taylor y Francis, London, pp. 25-39

Iriondo, J.M. & Pérez, C. (1999). Propagation from Seeds and Seed Preservation. London: Manson Publishing.

Iriondo, J. M. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). Investigaciones Agronómicas, 16 (1), 2001

Jiménez, F. *et al.* (2002). Empleo del BIOBRAS-6 en la micropropagación del cultivar de plátano FHIA-21 (AAAB). Biotecnología Vegetal, 2(3), 131-136.

Jørgensen, P. & León-Yané, S. (1999). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden. Quito: PUCE

López, R. (2004). Biología alimentaria. México: Limusa S.A.

Liefert, F., & Waites, S. (1998). Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. Plant Cell Volume 52, 83-88.

Loyola, V. (2006). Plant Cell Culture Protocols. New Jersey: Humana Press

Mack, R., *et al.* (2000). Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. Issues in Ecology, 5-15.

Majada, J., Sierra, M., y Sánchez, R. (2000). One step for taxane production through enhanced *Taxus* propagation. Plant Cell Rep 18, 825-830

Mandava, B.N, (1988). Plant growth promoting brassinosteroids. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol 39. pp 23–52.

Marino, C. *et al.* (2003). Micropropagation of *Glandularia perakii* Cov. et Schn. (Verbenaceae), a native species with ornamental potential. Extraído el 12 de marzo, 2011, del sitio web de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, Argentina. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12847915>

Martínez, M. *et al.* (2006). Cultivo *in vitro* de cuatro diferentes tejidos de *Casimiroa edulis* Llave et Lex para identificación de alcaloides totales. Revista mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 37 (004), 5-11.

Miller, K., Allegretti M.H., Johnson N. & Jonsson B., (1995). Measures for Conservation of Biodiversity and Sustainable Use of its Components. Cambridge: UNEP Cambridge University Press.

Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Plimmer, J.R., and Smith, M.V. (1970). Brassins, A new family of plant hormones from rape pollen. Nature 225.

Moldenke, H. A. (1934). A monograph of the genus *Aegiphila*. Quito: Brittonia.

Murashige, T y Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15, 473 – 497

Ocampo, F. y Nuñez, V. (2007). Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmento nodales. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria 8(1), 22-27.

Pedroza, J. *et al.* (2007). Micropropagación de *Dodonea viscosa* (L) Jacq: Una especie en vías de extinción. Revista Colombiana de Biotecnología IX, 002.

Pence, V. (1999). The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants. London: Taylor y Francis.

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

Plana, D. *et al.* (2002). Efecto del BIOBRAS-6 en la morfogenesis *in vitro* de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) Var. Amalia. Cultivos tropicales, 23.

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

Ramanatha, R. & Riley K.W. (1994). The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. Plant Genetic Resources Newsletter, 97, 3-19.

Ramos, L. (2000). Algunos avances en la morfogénesis de la teca (*Tectona grandis* L.). Tesis para optar por el grado de máster en ciencias. Universidad de Ciego de Avila, Cuba.

Rayen, P., Evert. R., & Eichhorn, S,. (1999). Biology of plants. USA: Freeman and Company Worth Publishers.

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

Rojas, D. *et al.* (2003). Propagación asexual de plantas. Colombia.

Salas, E. *et al.* (2005). Propagación *in vitro* de *Morus alba* L. en medio de cultivo semisólido. Biotecnología Vegetal, 5(2), 81 – 87.

Sánchez P, (2001). Flórula del Parque Nacional Cahuita, Costa Rica: editorial universidad estatal a distancia.

Sansberro, P. y Mroginski, L. (1995). Micropropagación de *Aloysia polystachia* (Verbenaceae). Agriscentia XII : 83-86.

Santiana, J. & Pitman, N. (2004). *Aegiphila ferruginea*. IUCN Red List of Threatened Species.

Sauvaire D, Galzy R (1981). *Micropropagation de la canne a sucre par bouturage in vitro Action d'une auxine et d' une cytokinine*. L'Agronomie Tropicale (1), 65-68.

Severin, C. *et al.* (2005). Regeneración *in vitro* de plantas de *Aloysia citriodora Palau* (Verb.). Revista de investigaciones de la facultad de ciencias agrarias, 8 (5).

Smith, T. (2007). Ecología. España: Pearson Educaci.

Stephen, M. *et al.* (2010). Phloroglucinol and silver nitrate enhances axillary shoot proliferation in nodal explants of *Vitex negundo* L. –an aromatic medicinal plant. Iranian Journal of Biotechnology, 8 (2).

Suárez, D. (2008), Formación de un corredor de hábitat de un bosque montano alto en un mosaico de páramo en el norte del Ecuador. Ecología Aplicada, 7. 9-15.

Styer, D. y Chin, T. (1983). Meristems and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germoplasms conservation. Horticolal Reviews.

Ulloa, C. & Jørgensen. (1995). Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador. Quito: Abya-Yala.

Valencia, R., Pitman, N., León-Yané, S. y Jørgensen, P.M. (2000). Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Quito: Herbario QCA de la PUCE.

ANEXO A

Listado de las principales especies de la flora de las áreas del DMQ.

Familia	Nombre Científico	Nombre Común
ARALIACEAE	<i>Oreopanax mucronulatus.</i>	Pumamaqui
ASTERACEAE	<i>Baccharis floribunda</i>	Chilca negra
ASTERACEAE	<i>Baccharis riparia</i>	Chilca blanca
ASTERACEAE	<i>Barnadesia spinosa</i>	Yana sachá
ASTERACEAE	<i>Gynoxys</i> sp.	Piquil
BERBERIDACEAE	<i>Berberis conferta</i>	Chuspillay
BORAGINACEAE	<i>Tournefortia fuliginosa</i>	Pirais
BORAGINACEAE	<i>Tournefortia ramosissima</i>	Pirais
BUDDLEJACEAE	<i>Buddleja incana</i>	Quishuar
CAESALPINACEAE	<i>Cassia canescens</i>	Llin Llin
ELAEOCARPACEAE	<i>Vallea stipularis</i>	Sacha capuli
CAPRIFOLIACEAE	<i>Viburnum</i> sp.	Dana
FABACEAE	<i>Dalea</i> sp.	Escobilla
MYRICACEAE	<i>Myrica pubescens</i>	Laurel
PASSIFLORACEAE	<i>Passiflora</i> sp.	
SYMPLOCACEAE	<i>Symplocos</i> sp.	
MELATOMATAACEAE	<i>Brachyotum</i> sp.	
MELATOMATAACEAE	<i>Miconia corymbiformis</i>	Colca
MYRSINACEAE	<i>Cybianthus</i> sp.	
PIPERACEAE	<i>Piper</i> sp.	Mucuchacla
POLYGALACEAE	<i>Monnina crasifolia</i>	Iguilan
ROSACEAE	<i>Hesperomeles heterophylla</i>	Pujin
ESCALLONIACEAE	<i>Escallonia myrtilloides</i>	Chachacoma
SOLANACEAE	<i>Cestrum peruvianum</i>	
SOLANACEAE	<i>Solanum</i> sp.	Pulug
BETULACEAE	<i>Alnus acuminata</i>	Aliso
VERBENACEAE	<i>Citharexylum montanum</i>	Pendo
BORAGINACEAE	<i>Tournefortia scabrida</i>	Punde
MYRACACEAE	<i>Mirica pubescens</i>	Laurel de cera
MELIACEAE	<i>Cedrela rosei</i>	Cedro
MYRTACEAE	<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalypto
BUDDLEJACEAE	<i>Buddleja longifolia</i>	Quishuar
LEGUMINOSAE	<i>Caesalpinia spinosa</i>	
EUPHORBIACEAE	<i>Crotón lecheri</i>	
MYRTACEAE	<i>Eugenia</i> sp.	Arrayan
MELIACEAE	<i>Guarea Khunthiana</i>	
CHLORANTACEAE	<i>Hedyosmun</i> sp.	Chavarquero
EUPHORBIACEAE	<i>Hyeronima macrocarpa</i>	
MYRTACEAE	<i>Myrcianthes</i> sp.	
LAURACEAE	<i>Nectandra</i> sp.	
LAURACEAE	<i>Ocotea</i> sp.	
ROSACEAE	<i>Hesperomeles heterophylla</i>	Urco galo
ROSACEAE	<i>Polylepis lanuginosa</i>	Yagual
CUNONIACEAE	<i>Weinmannia fagaroides</i>	Sarar
CAPRIFOLIACEAE	<i>Viburnum</i> sp.	Juanico

SOLANACEAE	<i>Datura sanguinea</i>	Guanto
MELASTOMATACEAE	<i>Miconia salicifolia</i>	Moral
MYRSINACEAE	<i>Rapanea dependens</i>	Samil
ROSACEAE	<i>Osteomeles lanuginosa</i>	Pujin
BERBERIDACEAE	<i>Berberis conferta</i>	Chuspillay
MYRISCACEAE	<i>Rapanea dependens</i>	Samal
PODOCARPACEAE	<i>Podocarpus sprucei</i>	Romerillo
POLYGALACEAE	<i>Monnia pseudostipula</i>	Iguilam
ROSACEAE	<i>Polylepis lanuginosa</i>	Quinual
ROSACEAE	<i>Cestrum sp.</i>	San guicel
→ VERBENACEAE	<i>Aeigiphila ferruginea</i>	Jigueron
PODOCARPACEAE	<i>Promnipitys montana</i>	trensa
	<i>Badilloa salicina</i>	
	<i>Senecio sp.</i>	
	<i>Maytenus sp.</i>	
	<i>Coriaria sp.</i>	
	<i>Syphocampylus sp.</i>	
	<i>. Brachyotum sp.</i>	
	<i>Cybianthus sp.</i>	

Fuente: CESA, Universidad Central, Herbario Nacional, Oleoducto de Crudos pesados.

ANEXO B

Criterios de Clasificación de la UICN

La Unión Internacional de la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN) es la autoridad internacional que cataloga, evalúa y monitorea el estado de conservación de las plantas raras o en peligro a nivel mundial (Valencia *et al*, 2000), basada en la probabilidad de extinción. El sistema presenta tres niveles representativos:

1. Las especies en peligro crítico de extinción tienen una probabilidad de extinción del 50% o más en los próximos 10 años o 3 generaciones, cualquiera que fuese la de mayor duración.
2. Las especies en peligro de extinción tienen una probabilidad de extinción del 20% en los próximos 20 años o 5 generaciones.
3. Las especies vulnerables tienen una probabilidad de extinción del 10% en los próximos 100 años.

La asignación de determinada especie a una de estas categorías precisa contar con al menos uno de los siguientes tipos de información:

1. La reducción observable en la cantidad de individuos.
2. El área geográfica ocupada por una especie y la cantidad de poblaciones.
3. La cantidad total de individuos vivos y la de individuos en reproducción
4. La disminución estimada en la cantidad de individuos si las tendencias actuales y estimadas de declive poblacional o destrucción del hábitat continúan.
5. La probabilidad de que la especie se extinga en determinada cantidad de años o generaciones (Smith, 2007).

Un taxón está en Peligro cuando la mejor evidencia disponible indica que cumple con cualquiera de los criterios A a E y por tanto se considera que corre un riesgo alto de extinción en estado silvestre:

- A. Reducción de la población, basadas en observaciones, estimaciones, inferencias o sospechas mayor o igual al 30% durante los últimos 10 años o tres generaciones, seleccionando la que sea más larga, donde las causas de la reducción pueden no haber cesado o ser entendidas o reversibles.

- B. Rango geográfico, bajo los criterios de: extensión de presencia, área de ocupación y ambos criterios juntos.

- C. Población estimada en números menores de 10 000 individuos maduros.

- D. Población estimada en un número menor de 1000 individuos maduros.

- E. Un análisis cuantitativo muestra que la probabilidad de extinción en el estado silvestre es de por lo menos el 10% dentro de los siguientes 100 años.

ANEXO C

A. Componentes del medio de cultivo MSVG


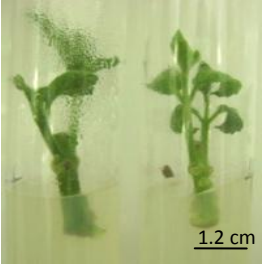


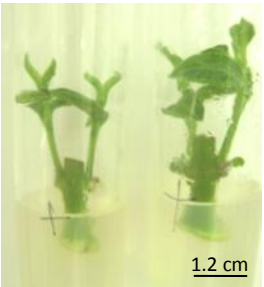
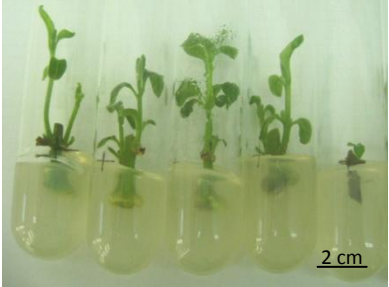
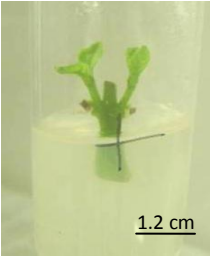
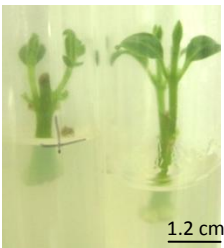


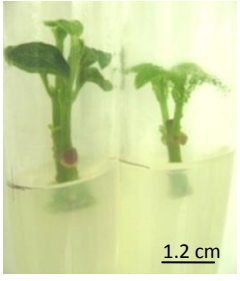
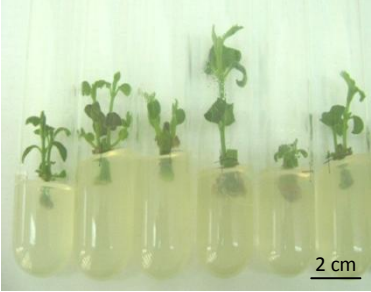
ELEMENTOS	CONCENTRACIÓN (mg.L ⁻¹)
Macronutrientes (MS)	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
Micronutrientes (MS)	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025
Compuestos orgánicos (VG)	
Myo- Inositol	100
Ácido nicotínico	1,0
Piridoxina-HCl	1,0
Tiamina-HCl	10,0
Sacarosa	30000
Agar	8000

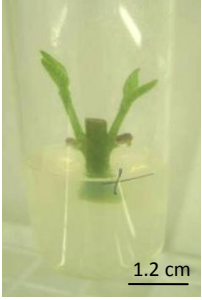
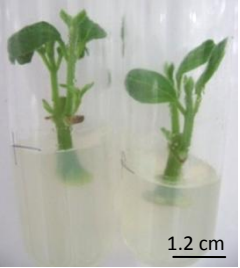
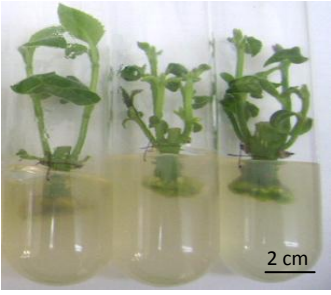
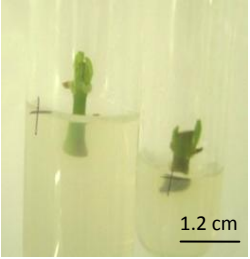

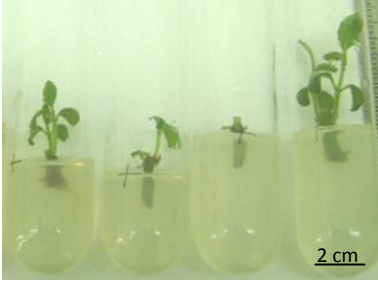
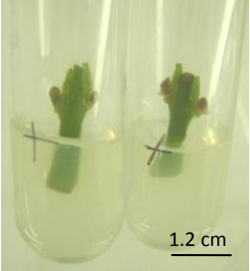

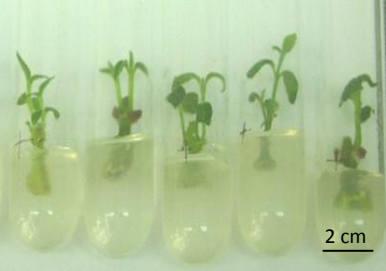
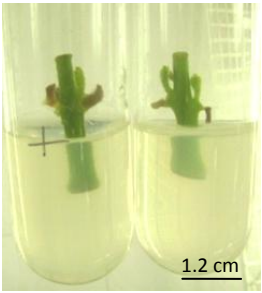

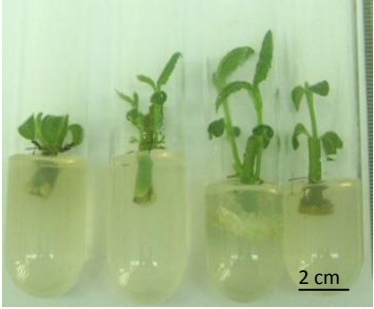
B. Componentes del medio de cultivo WPM

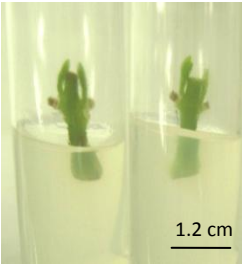

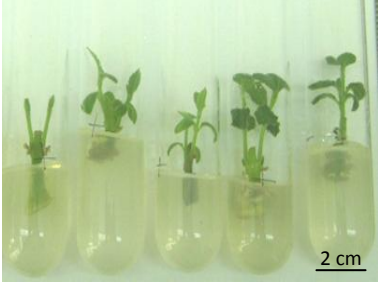
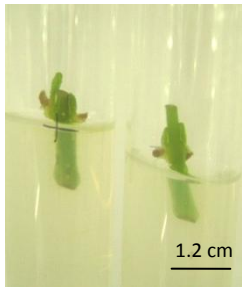


ELEMENTOS	CONCENTRACION (mg.L⁻¹)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	400
MgSO ₄	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	96
Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	556
K ₂ SO ₄	990
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	37,2
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
Compuestos orgánicos	
Myo- Inositol	100
Tiamina-HCl	0,4
Sacarosa	30000
Agar	8000

ANEXO D

Resultados de la Fase de Establecimiento *in vitro* de Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*)

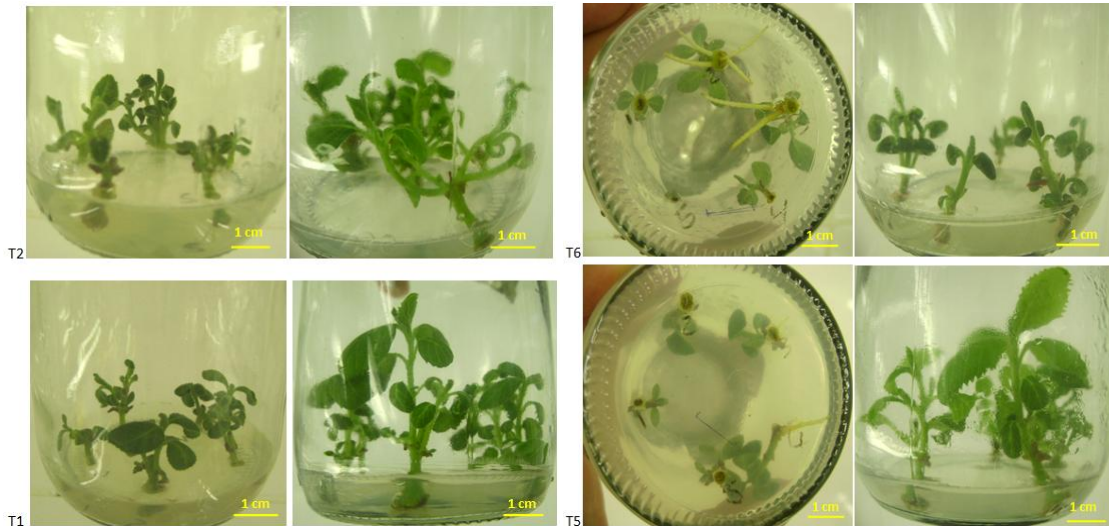
	7 días	14 días	21 días
Tratamiento 1	 1.2 cm	 1.2 cm	 2 cm
Tratamiento 2	 1.2 cm	 1.2 cm	 2 cm
Tratamiento 3	 1.2 cm	 1.2 cm	 2 cm
Tratamiento 4	 1.2 cm	 1.2 cm	 2 cm

Tratamiento 5			
Tratamiento 6			
Tratamiento 7			
Tratamiento 8			

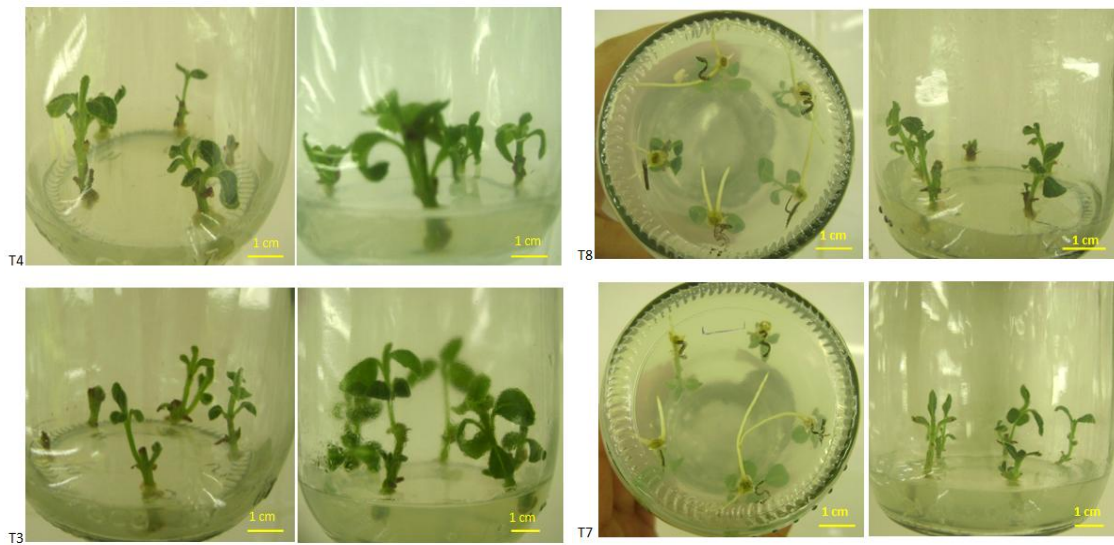
<p>Tratamiento 9</p>			
<p>Tratamiento 10</p>			

ANEXO E

Resultados del primer ensayo para la Fase de Multiplicación in vitro de Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*)



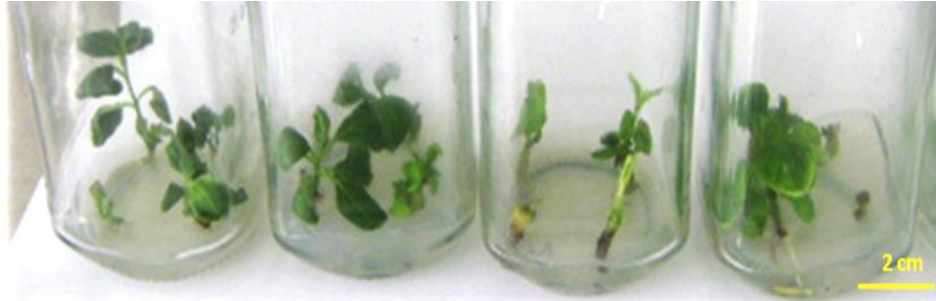
Explantos cultivados en medio MSVG (T1, T2, T5 y T6).



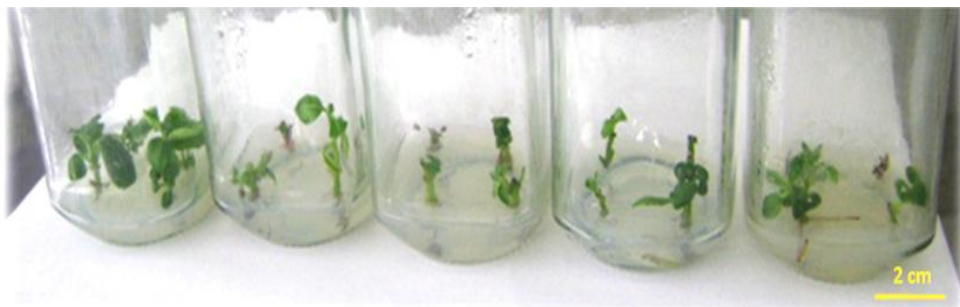
Explantos cultivados en medio WPM (T3, T4, T7 y T8).

ANEXO F

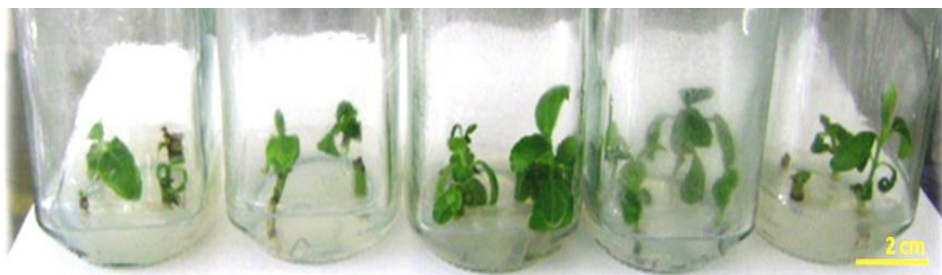
Resultados del segundo ensayo para la Fase de Multiplicación in vitro de Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*)



Tratamiento BRA1 (MSVG + 0.5 ppm BRA) a los 36 días



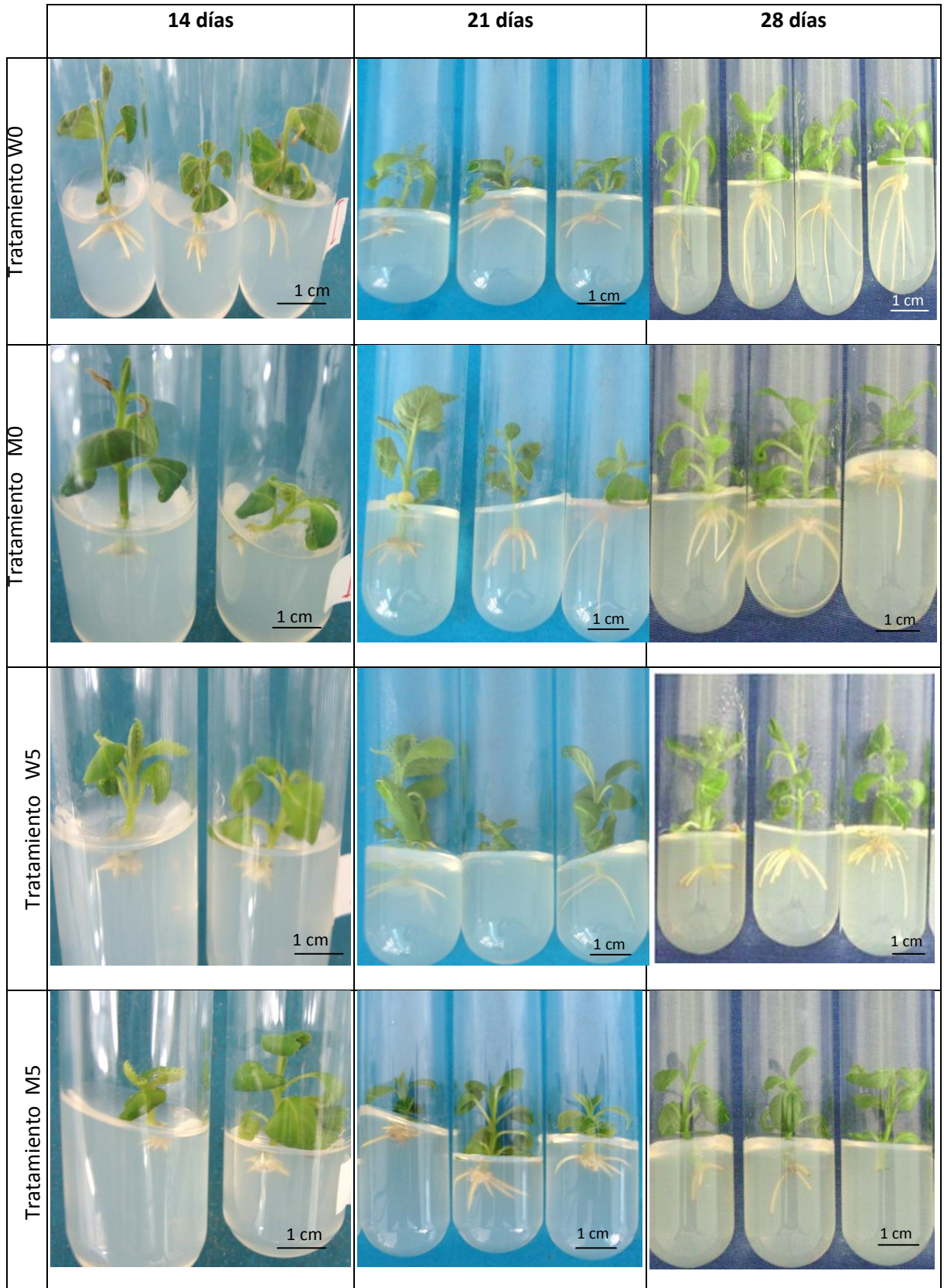
Tratamiento BRA2 (MSVG + 1.0 ppm BRA) a los 36 días



Tratamiento BRA3 (MSVG + 1.5 ppm BRA) a los 36 días

ANEXO G

Resultados de la Fase de Enraizamiento *in vitro* de Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*)



CERTIFICACIÓN

MSc. Norman Soria

Ing. Marco Taipe

Certifican:

Que el trabajo titulado “Micropropagación *in vitro* de la especie endémica: Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción”, realizado por la Srta. Adriana Soledad Jácome Tabango, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que es un trabajo para la conservación y divulgación de Jiguerón, recomendamos su publicación.

El mencionado trabajo consta de cuatro documentos empastados y dos discos compactos, que contienen los archivos en formato portátil de Acrobat(pdf). Autorizan a Adriana Jácome que lo entregue a Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 19 de Abril de 2011

MSc. Norman Soria

DIRECTOR

Ing. Marco Taipe

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Adriana Soledad Jácome Tabango

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “Micropropagación *in vitro* de la especie endémica: Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

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

Sangolquí, 19 de Abril de 2011

Nombre del autor

AUTORIZACIÓN

Yo, Adriana Soledad Jácome Tabango

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Micropropagación *in vitro* de la especie endémica: Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 19 de Abril de 2011

Nombre del autor