

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

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

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HORMONAL DE: THIDIAZURON (TDZ),
THIDIAZURON CON ÁCIDO α -NAFTALEN ACÉTICO (TDZ/ANA) VS. 6 –
BENCIL AMINO PURINA (BAP), 6 – BENCIL AMINO PURINA CON ÁCIDO α
NAFTALEN ACÉTICO (BAP/ANA); COMO INDUCTORES DE BROTES EN
LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN A PARTIR DE YEMAS APICALES DE
BALSA (*Ochroma lagopus*).**

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

WILSON DAVID DÁVILA ALDAS

SANGOLQUÍ, Noviembre del 2011

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

Wilson David Dávila Aldas

COORDINADOR DE CARRERA

Ing. Tatiana Páez

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Mario Lozada

Sangolquí, Noviembre de 2011

CERTIFICACIÓN

M. Sc. Mónica Jadán

Ing. Pedro Romero

Certifican:

Que el trabajo titulado: “Evaluación de la actividad hormonal de: Thidiazuron (TDZ), Thidiazuron con ácido α -naftalen acético (TDZ/ANA) Vs. 6 – Bencil amino purina (BAP), 6 – Bencil amino purina con ácido α -naftalen acético (BAP/ANA); como inductores de brotes en la etapa de multiplicación a partir de yemas apicales de Balsa (*Ochroma lagopus*)”., realizado por la Sr. WILSON DAVID DÁVILA ALDAS como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas estatutarias establecidas por la Escuela Politécnica del Ejército, en el Reglamento de Estudiantes.

Debido a la relevancia científica, expuesta en el presente trabajo, se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo, consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Wilson David Dávila Aldas que lo entregue a la Ing. Tatiana Páez, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, Noviembre de 2011

M. Sc. Mónica Jadán
DIRECTOR

Ing. Pedro Romero
COORDIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Wilson David Dávila Aldas

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “**Evaluación de la actividad hormonal de: Thidiazuron (TDZ), Thidiazuron con ácido α -naftalen acético (TDZ/ANA) Vs. 6 – Bencil amino purina (BAP), 6 – Bencil amino purina con ácido α -naftalen acético (BAP/ANA); como inductores de brotes en la etapa de multiplicación a partir de yemas apicales de Balsa (*Ochroma lagopus*).”**”, 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 mi autoría.

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

Sangolquí, Noviembre de 2011

Wilson David Dávila Aldas

AUTORIZACIÓN

Yo, Wilson David Dávila Aldas

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército, la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“Evaluación de la actividad hormonal de: Thidiazuron (TDZ), Thidiazuron con ácido α -naftalen acético (TDZ/ANA) Vs. 6 – Bencil amino purina (BAP), 6 – Bencil amino purina con ácido α -naftalen acético (BAP/ANA); como inductores de brotes en la etapa de multiplicación a partir de yemas apicales de Balsa (*Ochroma lagopus*).”**, cuyo contenido y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Noviembre de 2011

Wilson David Dávila Aldas

DEDICATORIA

A mi padre Wilson Dávila que me ha enseñado a perseverar y luchar por lo que sueñas en la vida.

A mi madre Rosario Aldas por su diaria lucha y ser la mejor mamá del mundo.

A mi hermana Paola y a mis hermanos Paúl y Adrian, les quiero mucho.

“Si he podido ver más allá que los demás, es porque me he parado en hombros de gigantes.”

Isaac Newton

Wilson David Dávila Aldas

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios porque siempre me ha demostrado caminar a mi lado, más aun en los momentos difíciles de mi vida.

Gracias a mi padre por demostrarnos todos los días que nos quiere; no con palabras, más bien con hechos, y ser un hombre de bien, luchador y trabajador; a mi mami por ofrecernos día a día su amor incondicional, sin su sacrificio no estuviese donde estoy ahora, los dos son los seres más importantes de mi vida, muchas gracias por todo el amor que me han dado.

A mi hermana Paola, mi mejor amiga te agradezco todo el amor que me has dado; gracias por crecer junto a mí. A mis hermanos Paúl y Adrian por depositar toda su confianza en mí e impulsarme para seguir luchando y seguir adelante, sus palabras de aliento y motivación son mi combustible para continuar.

A mi directora de tesis, Máster Mónica Jadán por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto y por confiar en mi mil veces, gracias por compartir sus conocimientos en el área académica y en la parte humana, porque me enseñó a confiar en mí; como nunca nadie lo había podido hacer. Le agradezco por contribuir en mi formación académica y enseñarme a ser una persona correcta y responsable.

A mi codirector, Ingeniero Pedrito Romero por su guía y ayuda en el desarrollo de mi tesis, gracias por compartir su tiempo y conocimiento.

A mis amigos: Alberto; Mariel, Elizabeth, Yosselin, Diana, Ana María, María Fernanda, gracias por brindarme su amistad; gracias por todos los momentos vividos son recuerdos hermosos que siempre viven en mi corazón, A mis amigos Cristian, Daniel, Alejandra, María José, Andrea, Cristina, Patty, Grace, Maggy, Mauro; les agradezco mucho por compartir junto a mi momentos buenos, malos, tristes, alegres, gracias por demostrarme su apoyo, amistad desinteresada y ayuda.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
SECRETARIO ACADÉMICO.....	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iv
AUTORIZACIÓN	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
LISTADO DE TABLAS	xiii
LISTADO DE FIGURAS	xv
LISTADO DE ANEXO DE RESULTADOS.....	xviii
LISTADO DE ANEXO ESTADÍSTICO	xix
ABREVIACIONES	xx
RESUMEN	xxi
ABSTRACT.....	xxii
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del Problema.....	1
1.2 Justificación del problema	4
1.3 Objetivos de la investigación	5
1.3.1 Objetivo General.....	5
1.3.2 Objetivos Específicos	5
1.4 Marco Teórico.....	6
1.4.1 Características generales de la especie en estudio	6
1.4.1.1 Taxonomía	6
1.4.1.2 Descripción Botánica.....	7
1.4.1.3 Hábitat.....	9
1.4.1.4 Área de Distribución Natural y de Naturalización.....	9
1.4.1.5 Crecimiento y Rendimiento	10
1.4.1.6 Usos de la Madera.....	11
1.4.2 Cultivo <i>in vitro</i>	12
1.4.2.1 Selección del material vegetal.	14
1.4.2.2. Etapa de desinfección.	14
1.4.2.3 Medio de cultivo	15

1.4.2.4 Fase de establecimiento	16
1.4.2.5 Fase de enraizamiento.....	17
1.4.2.6 Aclimatación de los explantes enraizados	18
1.4.3 Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	18
1.4.3.1 Material vegetal	18
1.4.3.2 Factores químicos	20
Agua.....	20
Agar	20
Azúcar.....	21
Nutrición mineral.....	21
Reguladores de crecimiento.....	22
1.4.4 Auxinas	22
1.4.4.1 Síntesis y degradación	23
1.4.4.2 Efectos fisiológicos de las auxinas	24
Crecimiento y formación de raíces	24
Crecimiento y elongación celular.....	24
1.4.5 Citoquininas	24
1.4.5.1 Fenilureas (actividad de citoquininas)	25
1.4.5.2 Síntesis de Citoquininas.....	26
1.4.6 Thidiazuron.....	27
1.4.6.1 Actividad química de TDZ	29
1.4.6.2 Proliferación de brotes axilares usando TDZ	30
1.4.6.3 Dosis utilizada de TDZ.....	30
1.4.6.4 Combinación de reguladores de crecimiento vegetales con TDZ	31
1.4.6.5 Formación de callo usando TDZ	31
1.4.6.6 Organogénesis inducida por TDZ.....	32
1.4.6.7 Brotes transgénicos con TDZ	32
1.4.6.8 Enraizamiento (TDZ).....	33
1.4.6.9 Elongación (TDZ).....	33
1.4.6.10 Vitricación (TDZ).....	33
1.4.6.11 Fasciación de Brotes (TDZ).....	34
CAPÍTULO 2.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1 Localización del ensayo	35
2.2 Selección, colecta y transporte del material vegetal	35
2.3 Fase de establecimiento	37
2.3.1 Medio de cultivo para la Desinfección	37

2.3.2 Desinfección de las muestras	38
Contaminación.-	42
Necrosis	42
Vivo.-	43
2.4 Inducción de brotes	43
2.4.1 Medios de cultivo para la inducción de brotes	44
Aparecimiento de brotes	45
Aparecimiento de callo.-	45
2.5 Fase de multiplicación	46
Número de brotes.-	47
Longitud de los brotes.....	48
CAPÍTULO 3.....	49
RESULTADOS	49
3.1 Etapa de desinfección	49
3.1.1 Tratamiento de desinfección: hipoclorito de sodio.....	49
3.1.1.1 Contaminación	49
Análisis exploratorio de datos.....	49
Análisis inferencial	51
3.1.1.2 Necrosis	53
Análisis exploratorio de datos.....	53
Análisis inferencial	54
3.1.1.3 Supervivencia.....	56
Análisis exploratorio de datos.....	56
Análisis inferencial	57
3.1.2 Tratamiento de desinfección: fungicidas	59
3.1.2.1 Contaminación	60
Análisis exploratorio de datos.....	60
Análisis inferencial	61
3.1.2.2 Necrosis	63
Análisis exploratorio de datos.....	63
Análisis inferencial	64
3.1.2.3 Supervivencia.....	66
Análisis exploratorio de datos.....	66
Análisis inferencial	67
3.2 Etapa de inducción.....	71
3.2.1 Aparecimiento de callo	71
Análisis exploratorio de datos.....	71

Análisis inferencial	72
3.2.2 Aparecimiento de brote.....	74
Análisis exploratorio de datos.....	74
Análisis inferencial	75
3.3. Etapa de multiplicación	77
3.3.1. Multiplicación tratamientos (BAP - ANA).....	79
Análisis exploratorio de datos.....	79
Número de brotes.....	79
Longitud de brotes	81
Análisis inferencial de datos	85
Número de brotes.....	85
Longitud de brotes	91
3.3.2 Multiplicación tratamientos (TDZ - ANA).....	95
Análisis exploratorio de datos.....	95
Número de brotes.....	95
Longitud de brotes	97
Análisis inferencial de datos	101
Número de brotes.....	101
Longitud de brotes	108
CAPÍTULO 4.....	113
DISCUSIÓN	113
4.1 Etapa I: Establecimiento <i>in vitro</i>	113
4.1.1 Etapa de desinfección.	113
4.1.2 Etapa de Inducción.....	118
4.1.3 Etapa de multiplicación.	119
4.1.3.1 BAP vs. ANA	119
Número de brotes.....	120
Longitud de los explantes	121
4.1.3.2 TDZ vs. ANA	122
Número de brotes.....	122
Longitud de los explantes	123
CAPÍTULO 5.....	125
CONCLUSIONES	125
CAPÍTULO 6.....	127
RECOMENDACIONES.....	127
CAPÍTULO 7.....	128
BIBLIOGRAFÍA	128

ANEXOS DE RESULTADOS	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO ESTADÍSTICO	¡Error! Marcador no definido.
Análisis de varianza ¹	¡Error! Marcador no definido.
Diseño completamente aleatorizado ¹	¡Error! Marcador no definido.
Método de comparaciones múltiples Fisher (LSD Fisher) ¹ ..	¡Error! Marcador no definido.
Tablas de Contingencia ¹	¡Error! Marcador no definido.
Chi cuadrado pearson ¹	¡Error! Marcador no definido.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.4 Tratamientos para inducción de brotes	44
Tabla 2.5.- Tratamientos para la etapa de multiplicación (BAP vs.ANA)	46
Tabla 2. 6.- Tratamientos para la etapa de multiplicación (TDZ vs. ANA)	47
Tabla 3.1.1- Tratamientos de desinfección utilizando hipoclorito de sodio	49
Tabla 3.1.2- Tabla de comparación de Fisher para la contaminación con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión.....	52
Tabla 3.1.3- Tabla de comparación de Fisher para la necrosis con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión.....	56
Tabla 3.1.4- Tabla de comparación de Fisher para la supervivencia con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión.....	59
Tabla 3.1.5- Tratamientos de desinfección utilizando 0,5% de hipoclorito de sodio 40 min (tratamiento uno) mas fungicidas.	60
Tabla 3.1.6- Tabla de comparación de Fisher para la contaminación con respecto a concentración de hipoclorito de sodio 0,5% - 40 min combinado con fungicidas.	62
Tabla 3.1.7- Tabla de comparación de Fisher para la necrosis con respecto a concentración de hipoclorito de sodio 0,5% - 40 min, combinado con la concentración de fungicidas	66
Tabla 3.1.8- Tabla de comparación de Fisher para la supervivencia con respecto a la concentración de fungicida y combinaciones de fungicida con el mejor tratamiento de hipoclorito de sodio (0.5% - 40 min)	69
Tabla 3.2.1.-Tratamientos para inducción de brotes.....	71
Tabla 3.2.2- Tabla de comparación de Fisher para el apareamiento de callo con respecto a la concentración de hormona BAP.	74
Tabla 3.2.3- Tabla de comparación de Fisher para la formación de brote con respecto a la concentración de hormona: BAP.	77
Tabla 3.3.1- Tratamientos para multiplicación utilizando BAP en combinación con ANA, nueve tratamientos más un testigo.	78
Tabla 3.3.2- Tratamientos para multiplicación utilizando TDZ en combinación con ANA, nueve tratamientos más un testigo.	78
Tabla 3.3.3- Categorización de datos para la longitud de los explantes obtenidos en el tratamiento de BAP vs. ANA en la etapa de multiplicación de Balsa (<i>Ochroma lagopus</i>).	83
Tabla 3.3.4- Tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2) usando las concentraciones de 6-bencilaminopurina 0,2 mg/L; 1mg/L; 2mg/L.	86
Tabla 3.3.5- Valor de p chi cuadrado de pearson para la tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2) usando las concentraciones de 6-bencilaminopurina 0,2 mg/L; 1mg/L; 2mg/L.	86
Tabla 3.3.6- Tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2) usando las concentraciones de α -ácido naftalenacético 0,2 mg/L; 0,1mg/L.	86

Tabla 3.3.7- Valor de p chi cuadrado de pearson para la tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2) usando las concentraciones de α -ácido naftalenacético 0,2 mg/L; 0,1mg/L.....	87
Tabla 3.3.8- Análisis de varianza para la formación de brotes usando BAP (6 - bencilaminopurina) vs. ANA (ácido α – naftalenacético)	88
Tabla 3.3.9 – Tabla de contingencia para la formación de brotes usando combinaciones de hormonas: BAP vs. ANA y valor de chi cuadrado de pearson	91
Tabla 3.3.10 – Valor de chi cuadrado obtenido de la tabla de contingencia en donde se evaluó la longitud de los brotes usando combinaciones de hormonas: BAP vs. ANA.....	92
Tabla 3.3.11 – Análisis de varianza para la longitud de los brotes usando combinaciones de hormonas: BAP vs. ANA.....	92
Tabla 3.3.12- Categorización de datos para la longitud de los explantes obtenidos en el tratamiento de TDZ vs. ANA en la etapa de multiplicación de Balsa (<i>Ochroma lagopus</i> ..	99
Tabla 3.3.13- Tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2, 3, 4) usando las concentraciones de Thidiazuron 0,2 mg/L; 1mg/L; 2mg/L.....	102
Tabla 3.3.14- Valor de p chi cuadrado de pearson para la tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2, 3,4) usando las concentraciones de Thidiazuron 0,2 mg/L; 1mg/L; 2mg/L.....	102
Tabla 3.3.15- Tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2, 3, 4) usando las concentraciones de α -ácido naftalenacético 0,2 mg/L; 0,1mg/L, 0 mg/L.....	103
Tabla 3.3.16- Valor de p chi cuadrado de pearson para la tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2, 3,4) usando las concentraciones de ANA (α – ácido naftalenacético) 0,2 mg/L; 1mg/L; 2mg/L.....	103
Tabla 3.3.17- Análisis de varianza y medias para la formación de brotes usando TDZ (Thidiazuron) vs. ANA (ácido α – naftalenacético)	105
Tabla 3.3.18 – Tabla de contingencia para la formación de brotes usando combinaciones de hormonas: TDZ vs. ANA, valor chi cuadro de pearson para la formación de brotes...	108
Tabla 3.3.19 – Valor de chi cuadrado obtenido de la tabla de contingencia en donde se evaluó la longitud de los brotes usando combinaciones de hormonas: TDZ vs. ANA.....	108
Tabla 3.3.20 – Análisis de varianza para la longitud de los brotes usando combinaciones de hormonas: TDZ vs. ANA.....	109

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.-El área sombreada representa la distribución natural de la balsa, <i>Ochroma lagopus</i> , en el neotrópico.	10
Figura 2.- Auxinas Naturales	23
Figura 3.-Estructura de las citoquininas	25
Figura 4.- Estructura de Fenilureas con actividad Citoquinina (A) y estructura de la anticitoquinina 4-ciclopentilamino-2-metiltiopirrol [2,3-d]-pirimidina (B),	26
Figura 2.1- (a) Plantas de balsa en condiciones de invernadero sometidas a tratamiento fitosanitario (b) medición de tamaño promedio para cumplir condiciones fenotípicas.....	36
Figura 2.2- Protocolo de Desinfección. (a)Yemas apicales. (b)Lavado en agua corriente. (c) Lavado en agua estéril. (d) combinación de fungicidas. (e) Alcohol. (f) Cloro.....	40
Figura 2.3- (a) Procedimiento mecánico para la eliminación de tricomas. (b) yema apical de Balsa, se distingue presencia de tricomas.....	41
Figura 2.4- (a) explante con contaminación fúngica, (b) explante con contaminación bacteriana	42
Figura 2.5- Yema de Balsa necrosada	42
Figura 2.6- Yema de Balsa viva.....	43
Figura 2.7- Yema apical de balsa con apareamiento de brote	45
Figura 2.8- Yema apical de balsa con apareamiento de callo.....	45
Figura 2.9.- Conteo número de brotes que contiene cada explante.	47
Figura 2.10.- Medición de longitud (mm) de explantes utilizando un calibrador.	48
Figura 3.1.1- Relación entre: explantes contaminados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio y sus tiempos de inmersión.	50
Figura 3.1.2- Grafico de densidad de puntos, para la contaminación en los tratamientos de desinfección con las concentraciones de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión.	52
Figura 3.1.3- Relación entre: explantes necrosados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio y sus tiempos de inmersión.	54
Figura 3.1.4- Grafico densidad de puntos para la necrosis en los tratamientos de desinfección con las concentraciones de hipoclorito de sodio.	55
Figura 3.1.5- Relación entre: explantes vivos, concentraciones de cloro, tiempos de inmersión en los tratamientos de hipoclorito de sodio.	57
Figura 3.1.6- Grafico de densidad de puntos para la supervivencia en los tratamientos de desinfección con las concentraciones de hipoclorito de sodio.	58
Figura 3.1.7- Explantes contaminados en los tratamientos de fungicida mas hipoclorito de sodio 0.5% - 40min.	61
Figura 3.1.8- Gráfico de densidad de puntos para la contaminación usando la concentración de hipoclorito de sodio: 0.5% - 40 min y las concentraciones empleadas de fungicida.....	63

Figura 3.1.9- Explantes necrosados en los tratamientos de fungicida más hipoclorito de sodio 0.5% - 40min: tratamiento.....	64
Figura 3.1.10- Gráfico de densidad de puntos para la necrosis usando la concentración de hipoclorito de sodio: 0.5% - 40 min y las concentraciones empleadas de fungicida.....	65
Figura 3.1.11- Frecuencia de explantes vivos en los tratamientos de fungicida mas hipoclorito de sodio 0.5% - 40 min.....	67
Figura 3.1.12- Gráfico de densidad de puntos para la supervivencia usando la concentración de hipoclorito de sodio: 0.5% - 40 min y las concentraciones empleadas de fungicida.....	68
Figura 3.2.1 – Frecuencia en formación de callo en los tratamientos de inducción para yemas de <i>Ochroma lagopus</i>	72
Figura 3.2.2 –Densidad de puntos para la formación de callo en los tratamientos de inducción para yemas de <i>Ochroma lagopus</i>	73
Figura 3.2.3 – Brotes en los tratamientos de inducción para yemas de <i>Ochroma lagopus</i>	75
Figura 3.2.4 – Densidad de puntos para la formación de brotes en los tratamientos de inducción para yemas de <i>Ochroma lagopus</i>	76
Figura 3.3.1 – Frecuencia en formación de brotes en los tratamientos de multiplicación para <i>Ochroma lagopus</i> , utilizando combinaciones de BAP y ANA.....	80
Figura 3.3.2 –Porcentaje de formación de brotes en los tratamientos de multiplicación en los que se utilizo combinaciones de BAP vs. ANA.....	81
Figura 3.3.4 –Longitud promedio de los explantes medidas en (mm), obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizo combinaciones de BAP vs. ANA.....	82
Figura 3.3.5 – Porcentaje de la longitud de los explantes, obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizo combinaciones de BAP vs. ANA.....	83
Figura 3.3.7 – Longitud promedio de los explantes, obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizo combinaciones de BAP vs. ANA.....	84
Figura 3.3.8 – Densidad de puntos para las concentraciones de BAP (1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la formación de brotes.....	89
Figura 3.3.9 – Densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la formación de brotes.....	89
Figura 3.3.10 – Densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L) y las concentraciones de BAP (1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la formación de brotes.....	90
Figura 3.3.11 – Densidad de puntos para las concentraciones de BAP (2,0 mg/L, 1,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes.....	93
Figura 3.3.12 – Densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes.....	94
Figura 3.3.13 – Densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L) y las concentraciones de BAP (2,0 mg/L, 1,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes.....	94
Figura 3.3.14 –Formación de brotes en los tratamientos de multiplicación para <i>Ochroma lagopus</i> , utilizando combinaciones de TDZ y ANA.....	96

Figura 3.3.15– Porcentaje de formación de brotes en los tratamientos de multiplicación en los que se utilizo combinaciones de TDZ vs. ANA.....	97
Figura 3.3.16 –Longitud promedio de los explantes medidas en (mm), obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizo combinaciones de TDZ vs. ANA.	98
Figura 3.3.17 – Porcentaje de la longitud de los explantes, obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizo combinaciones de TDZ vs. ANA.	99
Figura 3.3.17 – Longitud promedio de los explantes, obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizo combinaciones de TDZ vs. ANA.....	101
Figura 3.3.19 – Densidad de puntos para las concentraciones de TDZ (2 mg/L, 1 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la formación de brotes	106
Figura 3.3.18 – Densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0 mg/L) usadas para la formación de brotes	106
Figura 3.3.20 – Densidad de puntos para las concentraciones de TDZ (2 mg/L, 1 mg/L, 0,2 mg/L) y las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0 mg/L) usadas para la formación de brotes	107
Figura 3.3.21 – Gráfico de densidad de puntos para las concentraciones de TDZ (2,0 mg/L, 1,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes.....	110
Figura 3.3.22 – Gráfico de densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0 mg/L, 0,1 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes.....	111
Figura 3.3.23 – Gráfico de densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0 mg/L, 0,1 mg/L, 0,2 mg/L) vs. las concentraciones de TDZ (2,0 mg/L, 1,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes.	111

LISTADO DE ANEXO DE RESULTADOS

ANEXO 1	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 2	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 3	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 4	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 5	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 6	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 7	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 8	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 9	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 10	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 11	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 12	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 13	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 14	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 15	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 16	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO17	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO18	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO19	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 20	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 21	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 22	¡Error! Marcador no definido.

LISTADO DE ANEXO ESTADÍSTICO

Análisis de varianza ¹	¡Error! Marcador no definido.
Diseño completamente aleatorizado ¹	¡Error! Marcador no definido.
Método de comparaciones múltiples Fisher (LSD Fisher) ¹ ..	¡Error! Marcador no definido.
Tablas de Contingencia ¹	¡Error! Marcador no definido.
Chi cuadrado pearson ¹	¡Error! Marcador no definido.

ABREVIACIONES

BAP	(6-bencil amino purina)
KIN	(kinetina)
ZEA	(zeatina)
ANA	(ácido α -naftalen acético)
TDZ	(N-fenil-N' - 1, 2,3-thidiazol-5- ilurea)
NaClO	(hipoclorito de sódio)
AIA	(ácido indol acético)
AIB	(ácido indol butírico)
2,4-D	(2,4-diclorofenoxiacético)
AG₃	(ácido giberélico)
DMSO	(Dimetilsulfoxido)
DMF	(N, N-dimetilformamida)
KOH	(Hidróxido de potasio)
NaOH	(Hidróxido de sodio)

RESUMEN

El árbol de Balsa *Ochroma lagopus*, pertenece a la familia Bombacaceae, es un árbol pionero de los bosques tropicales húmedos; es considerado como recurso forestal susceptible de explotación industrial; es además una especie utilizada para recuperar zonas degradadas y utilizada en la reforestación de bosques que han sido afectados por la tala indiscriminada. Se desarrollo un protocolo para la micropropagación de Balsa a partir de yemas apicales de (*Ochroma lagopus*), se usaron plantas de invernadero sometidas a un tratamiento fitosanitario previo. Se evaluaron varios procedimientos en las etapas de desinfección, establecimiento y multiplicación. En la primera de desinfección se estableció el protocolo de desinfección basado en la inmersión de los explantes en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante 40 minutos seguida de un lavado de 15 minutos en una solución en donde se combinaron los siguientes fungicidas: oxido cuproso 0,1%; captan 0,1 % y Azoxystrobin-Difenoconazol 0,3%, donde se obtuvo una supervivencia de 50%. En la etapa de introducción la máxima inducción de brotes se obtuvo al usar una concentración de 0,2 mg/L de BAP. En la etapa de multiplicación la mejor combinación para obtener mayor número de brotes fue TDZ vs. ANA (TDZ 1 mg/L – ANA 0 mg/L); con 23 brotes en promedio por cada repetición y la mejor combinación en cuanto a elongación de brote fue: BAP vs. ANA (BAP 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L) con una altura promedio por cada repetición de 31, 32 mm. Refiriéndose a los resultados, el protocolo de micropropagación para *Ochroma lagopus*; es viable en términos experimentales aplicados.

ABSTRACT

Balsa tree *Ochroma lagopus* belongs to the family Bombacaceae, it is a pioneer tree of moist tropical forests, this forest resource is considered as susceptible of industrial exploitation, is also a used to recover degraded areas and used in the reforestation of forest have been affected by logging. We developed a protocol for the micropropagation of Balsa from apical buds (*Ochroma lagopus*). Were used greenhouse plants subjected to a treatment phytosanitary prior. Several procedures were evaluated in the early stages of disinfection, establishment and multiplication. In the first step the disinfection protocol was established based on the immersion of explants in a solution of sodium hypochlorite 0.5% for 40 minutes followed by a wash of 15 minutes in a solution which combines the following antifungal: cuprous oxide 0.1%, captan 0.1% and Azoxystrobin-Difenoconazol 0.3% which yielded a 50% survival. In the introduction stage maximum shoot induction was obtained using a concentration of 0.2 mg / L of BAP. In the multiplication stage the best combination for the greatest number of outbreaks was TDZ vs. ANA (TDZ 1 mg/ L - ANA 0 mg / L), with 23 outbreaks on average for each repetition. The best combination for the elongation of the outbreak was: BAP vs. ANA (BAP 1 mg / L - ANA 0.2 mg / L) with an average height for each repetition of 31, 32 mm. About to the results the micropropagation protocol for *Ochroma lagopus*, is feasible in experimental terms applied.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

El Ecuador ha planteado implementar y ejecutar un plan nacional de forestación y reforestación que contempla plantaciones para la protección y conservación de sistemas agroforestales y plantaciones comerciales e industriales con el fin de convertir al Ecuador en una potencia forestal. Una de las especies seleccionadas: *Ochroma lagopus*, nativa de la región, tienen un alto uso y valor comercial, es de crecimiento rápido y el objetivo del programa es utilizar material genético de origen certificado, que garantice la calidad de los productos maderables y certificar la propagación con grado de calidad genética comprobado. (Cevallos G, Vítores Pérez M, 2009).

El árbol de Balsa (*Ochroma lagopus*) crece de forma natural en nuestro país desde la provincia del Oro hasta la provincia del Carchi, y cultivos planeados en las provincias de los Ríos, Manabí y Esmeraldas. La especie se ha cultivado con menor éxito en localidades que tienen un clima similar al del Ecuador; plantaciones de la India, Malasia, Vietnam, Borneo, Islas Salomón, Filipinas y Nueva Guinea. (K. Francis, John, 2002).

La producción de madera en volumen para la balsa a una edad temprana o cosechable en rodales puros en Ecuador es de 17 a 30 m³/ha/año, para hacer una comparación con las plantaciones experimentales en Malasia que han crecido de manera un poco más lenta 10 m³/ha/año o menos (K. Francis, John, 2002).

Ecuador es actualmente el principal exportador de Balsa, con 80 – 90% del volumen exportado. (Obregon. C, 2005). Actualmente existen entre bosques naturales y reforestados más de 20 mil hectáreas de plantaciones, en

nuestro país la mayoría de las plantaciones de Balsa se encuentran en la cuenca del río Guayas, de donde se obtiene el 95 % de la cosecha mundial, a partir de las cuales ha generado exportaciones a cerca de 45 países.

La Balsa posee la cualidad de madurar temprano fisiológicamente y por lo tanto es utilizada para su explotación y reforestación de zonas afectadas por la tala en nuestro país. "El Ecuador posee una extensión territorial de 272.031 Km², la explotación forestal genera una importante fuente de impacto sobre la biodiversidad, anualmente se pierde aproximadamente 238.000 hectáreas de bosques, de los 11'450.000 hectáreas de bosques nativos, el 62% es susceptible de ser aprovechadas ya que solo el 37% se encuentra dentro del sistema de áreas protegidas del país y pocas son las áreas destinadas a cumplir funciones de bosques protectores".(MAGAP, 2000).

La balsa es pionera en el litoral húmedo, es una especie indicadora de climas tropicales, en su hábitat natural la temperatura oscila entre 27 °C y 22 °C. Prospera en terrenos no profundos y calizos. Crece en margas ricas preferiblemente arcillosas y húmedas y se desarrolla muy bien en suelos que han sido sometidos a quemadas (Beihefle, 1990).

El árbol de Balsa, Lano o Balso *Ochroma lagopus*, pertenece a la familia Bombacaceae, es un árbol pionero de los bosques tropicales húmedos, (Whitmore.T, Wooh-Khoon.G, 1993), alcanza en 5 - 6 años una circunferencia de aprox. 90 cm. (30 cm. de diámetro) y una altura de aprox. 18 - 25 metros, genera madera liviana y de buena calidad, por ello es considerada como recurso forestal y maderable susceptible de explotación industrial (Obregon. C, 2005), es una especie además utilizada para recuperar zonas degradadas; utilizada en la reforestación de bosques que han sido afectados por la tala indiscriminada o han sufrido incendios (K. Francis, John, 2002). Además sirve como refugio de especies vegetales más pequeñas gracias a su rápido crecimiento y sus hojas grandes.

La madera obtenida a partir de los árboles de Balsa (*Ochroma lagopus*) es la más comercial y más liviana en uso a nivel mundial hoy en día. Otras

especies producen una madera más liviana, pero carecen de la fortaleza necesaria. (K. Francis, John, 2002). Vista a través de un microscopio; su estructura es tipo nido de abeja, lo que le permite soportar enormes cargas distribuyéndolas de una celda a la siguiente; por el poco espacio entre sus celdas resiste al movimiento de agua a través de la misma lo que le da su característica de flotabilidad; posee resistencia a altas temperaturas y al fuego por lo que provee un gran aislamiento térmico y acústico. (Madepron, 2011). La madera comercial de la balsa por lo usual varía en densidad entre 0,10 a 0,17 g/cm³. Esto quiere decir que es una madera resistente a la ruptura soportando de 148 a 372 kg/cm² de tensión, con una elasticidad de 30.000 a 62.000 kg/cm², y una resistencia máxima a la compresión de 64 kg/cm². (K. Francis, John, 2002).

Ochroma lagopus tiene muchos usos artesanales; por ejemplo: en la industria eólica por su densidad liviana es usada en las aspas de los ventiladores eólicos, en la industria náutica por su característica de flotabilidad, en la industria de transporte es empleada en las paredes de contenedores de aviones y barcos por su peso ligero, en la maquetería para el diseño y modelo de maquetas de arquitectura, en la industria de aeromodelismo para la construcción de modelos a escala. (Madepron, 2011).

En nuestro país no se ha considerado la asistencia técnica para el manejo del cultivo y hacerlo de forma controlada ; consecuentemente no se han aplicado nuevas tecnologías que permitan el mejoramiento de la especie y poder obtener una planta con características fisiológicas y genotípicas que puedan ser clonadas, la propagación *in vitro* de Balsa es una alternativa para el mejoramiento, aprovechamiento y conservación por su importancia económica y por ser idónea para la reforestación de bosques.

Existe escasa información y publicaciones acerca de la propagación *in vitro* de esta especie, por ello este trabajo de investigación es pionero y favorece la producción de una planta con características propicias para la industria maderera y también características que la convierten en un recurso natural sustentable.

1.2 Justificación del problema

La Balsa genera subproductos de uso industrial que son la opción más viable para el desarrollo económico de las regiones de nuestro país donde se usan y explotan de manera sustentable con el fin de usarlas como forma de subsistencia. La investigación para el mejoramiento de la calidad de los productos obtenidos dista mucho de las actuales demandas. La falta de asesoramiento en los cultivos y por ende el mejoramiento del material que se produce se debe en gran parte a la utilización de propagación tradicional de estas especies que son de interés comercial nacional e internacional.

La reproducción mediante semilla (sexual) de Balsa (*Ochroma lagopus*); es lenta y en el caso vegetativo (estacas) es dificultosa, muchas presentan condiciones diocas y en algunos casos presentan problemas serios de sanidad que impiden la oferta del material sano. (Rojas Salvador, 2008), se conoce que las semillas de Balsa no pueden ser almacenadas para su cultivo *in situ*, adicional a este obstáculo para mejorar el rendimiento de germinación es necesario someter a las semillas a un tratamiento de pregerminación; para luego plantarlas y esperar su germinación. Las raíces de las plantas jóvenes producto de la germinación son delicadas dificultando el manejo y generando una pérdida de plántulas. (Nieto V, Rodriguez J, 2003).

Esta propagación tradicional no garantiza conseguir plantas que generen subproductos semejantes en cada cultivo que se realiza. El cultivo *in vitro* de Balsa tienen un gran potencial en la industria maderera ya que permite almacenar un resguardo del material clonal por largo tiempo y en un espacio relativamente pequeño, utilizando secciones específicas de la planta que aportan con la suficiente información genética para regenerar una planta completa y con las mismas características requeridas en cada cultivo que se realice.

Es por esta razón que se plantea el cultivo de tejidos como una estrategia de conservación de la especie y obtención de clones con calidad genética, para la recuperación de la misma y su futura propagación masiva,

logrando así contribuir con el medio ambiente mediante la iniciación de cultivos programados de la especie, a fin de controlar la pérdida parcial o total de este recurso en el Ecuador.

“La conservación de la diversidad biológica forestal, incluidos los recursos genéticos forestales, es fundamental para sostener los valores productivos de los bosques”(Landa A , Mendizábal J,Márquez J, 2008), El cultivo *in vitro* a gran escala de Balsa favorecerá al incremento de la comercialización de la madera garantizando la calidad y la repetitividad de la misma.

En la presente investigación se desarrollará un protocolo para la producción *in vitro* de Balsa (*Ochroma lagopus*), para el cuál no existe metodología establecida con la perspectiva del desarrollo y mejoramiento de la calidad de la especie en cuanto a su producción.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad hormonal de: Thidiazuron (TDZ), Thidiazuron con ácido α -naftalen acético (TDZ/ANA) Vs. 6 – Bencil amino purina (BAP), 6 – Bencil amino purina con ácido α -naftalen acético (BAP/ANA); en la inducción de brotes en la etapa de multiplicación a partir de yemas apicales de Balsa (*Ochroma lagopus*).”

1.3.2 Objetivos específicos

- Establecer el método de desinfección en yemas apicales de plantas de Balsa (*Ochroma lagopus*) para controlar los agentes contaminantes externos.

- Determinar las concentraciones adecuadas de 6-bencilaminopurina (BAP) en medios de cultivo para Balsa en las fase de multiplicación del cultivo *in vitro* de esta especie.
- Establecer las concentraciones adecuadas de Thidiazuron (TDZ) en medios de cultivo para Balsa en las fase de multiplicación del cultivo *in vitro* de esta especie.
- Establecer la mejor relación entre 6-bencilaminopurina (BAP) o Thidiazuron con el ácido α naftalen acético (ANA); para la fase de multiplicación *in vitro*.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Características generales de la especie en estudio

1.4.1.1 Taxonomía

El árbol de Balsa *Ochroma lagopus* pertenece a la familia Bombacaceae, a pesar de que su amplia distribución y cierto grado de variación llevó a los botánicos a proponer varias especies y variedades de *Ochroma*, el género se considera ahora como monotípico. Entre los sinónimos botánicos de *Ochroma pyramidale* se encuentran: *O. lagopus* Sw., *O. lagopus* var., *O. obtusa* Rawl., *O. tomentosa* Willd., *O. bicolor* Rowlee, *O. boliviana* Rowlee, *O. grandiflora* Rowlee, *O. lagopus* var. *bicolor*, *O. limonensis* Rowlee, *O. peruviana* Sohnst., *O. velutina* Rowlee. (Whitmore, T. Wooh-Khoon, G.1983).

Los nombres comunes: Balsa, Balso real, Tucumo, Ceiba de lana, Lano, Palo de balsa, Menudito, Balso de lana (Colombia); Topa, Huampo (Perú); Lano, Palo de lana, Tacarigua (Venezuela); Tami (Bolivia); Pau de balsa (Brasil); Enea, Pin uru, Piu, Pung, Nisperillo (Costa rica.); Balsa Wood, Guano (Estados Unidos de Norteamérica.); algodón (Salvador.); Lanilla, Tambor, Puh

(Guatemala); Guano (Honduras.); Corkwood (Puerto rico.);Gatillo, Polak (Nicaragua); Gonote real, Maho, Mo-ma-ah (México.); Bois flot(Jamaica.); Puerro (Panamá.). (Whitmore, T. Wooh-Khoon, G.1983.)

La Balsa está incluida en la siguiente clasificación taxonómica:

Nombre:	<i>Ochromalagopus</i>
Género:	<i>Ochroma</i>
Familia:	Bombacaceae
Orden:	Malvales
Clase:	Magnoliopsida
División/Phylum:	Magnoliophyta
Reino:	Plantae

1.4.1.2 Descripción botánica

Es una especie pionera de crecimiento extremadamente rápido, tan rápido es el crecimiento que puede llegar a 30 metros de altura en tan sólo 10 años. Su nombre común es Balsa, las hojas son grandes, acorazonadas. Algo vistoso en ésta especie son las grandes flores blancas o cremas en forma de copa que pueden ser de hasta 11 cm. de largo. El fruto es una cápsula alargada de hasta 25 cm. con el interior lanoso. Las semillas son numerosas envueltas en pelos largos que forman el algodón que se conoce como kapok. Las semillas son transportadas por el viento a grandes distancias. Sorpresivamente, los árboles de balsa dan flores y frutos con tan sólo 3 ó 4 años de edad. Este fenómeno se debe a que la especie es de longevidad corta, llegando a vivir hasta 40 años aproximadamente. El árbol de balsa es de mucha importancia tanto ecológica como comercialmente. En el primer caso el nutritivo néctar de las flores sirve de alimento a muchas especies como pequeños mamíferos, aves e insectos. Interesante es la polinización de esta especie, que se pensaba era exclusiva de los murciélagos. Para ello las flores se abren durante la noche y producen entre todas más de un litro de néctar, que atraen a estos mamíferos, se llenan la cara de polen y lo transportaran a otros individuos de balsa más cercanos. Resulta que las flores producen mucho

néctar en los tubos florales de los cuales se alimenta los monos cariblancos, zarigüeyas, murciélagos, aves como los caciques y colibríes, insectos como las abejas. Las fibras del kapok son usadas por colibríes para hacer sus nidos. En la importancia industrial destaca el material algodonoso que es usado para fabricar almohadas, flotadores y salvavidas. En proyectos de reforestación es ideal para recuperar suelos degradados. (K. Francis, John, 2002).

Las hojas de la Balsa están dispuestas en espiral, simples; láminas de 13 por 13 a 35 por 35 cm, grandes, casi redondas, acorazonadas, margen entero o repando; nervios principales 7 a 9, muy prominentes en el envés, pecíolo café rojo. (K. Francis, John, 2002).

El Tronco es recto y cilíndrico, con raíces tubulares pequeñas (contrafuertes) en los troncos grandes. Posee pocas ramas gruesas ascendentes, extendidas y distanciadas. La corteza externa es lisa con algunas cicatrices lineares protuberantes, pardo grisácea, con lenticelas pequeñas, suberificadas y protuberantes. La corteza interna es de color crema amarillento a rosado, cambiando a pardo rosado, fibrosa. Grosor total: 8 a 12 mm. Los frutos son cápsulas de 15 a 25 cm de largo por 3 a 5 cm de ancho, verdosos semileñosos, negros cuando maduran, alargados, con 8 a 10 costillas longitudinales prominentes, muestran ranuras y están divididas en 5 partes; contienen de 500 a 800 semillas, las semillas son elongadas muy pequeñas, de 2,5 a 4 mm. de largo por 1 a 1,5 mm. de ancho, presentan un extremo acuminado, son muy ligeras, morenas, opacas, rodeadas por un abundante vello sedoso de color café amarillento (K. Francis, John, 2002).

La forma del árbol es perennifolio, de 15 a 30 m (hasta 35 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 20 a 40 cm (hasta 60 cm), la copa ancha, abierta, redondeada o irregular. Florece en Noviembre, Diciembre a Marzo, los frutos maduran de Marzo a Junio. (K. Francis, John, 2002).

1.4.1.3 Hábitat

Se desarrolla en laderas y en sitios abiertos, claros de bosques y orilla de caminos. La especie tiene su mejor crecimiento en suelos aluviales a lo largo de ríos y es aquí en donde se le encuentra con mayor frecuencia. Se le encuentra en zonas de litoral húmedo. Especie indicadora de climas húmedos. En su hábitat natural la temperatura máxima es de 27 °C y la mínima de 22 °C, precipitación anual de 1,300 mm aproximadamente. (Beihefle, 1980).

La balsa demanda una rica provisión de nutrientes y un suelo bien drenado, se reporta que los árboles de balsa mueren con facilidad debido a las inundaciones. La balsa coloniza suelos arcillosos, margosos y limosos. Prospera en terrenos apropiados, no muy profundos; en suelos derivados de materiales calizos, metamórficos e ígneos, pero no tolera los suelos de alta salinidad. Se desarrolla muy bien en suelos que han sido sometidos a quemadas. Entre los sitios frecuentemente colonizados se encuentran los aluviones nuevos, relleno de construcción, siembras abandonadas, áreas llanas como en pendientes escarpadas, áreas severamente quemadas, áreas de corta total y claros causados por la caída de árboles. (Beihefle, 1990).

1.4.1.4 Área de distribución natural y de naturalización

El área de distribución natural de la balsa se extiende desde el sur de México hasta Bolivia, hacia el este a través de la mayor parte de Venezuela, y a través de las Antillas. Los extremos latitudinales son 22° N hasta alrededor de 15° S. (K. Francis, John, 2002).

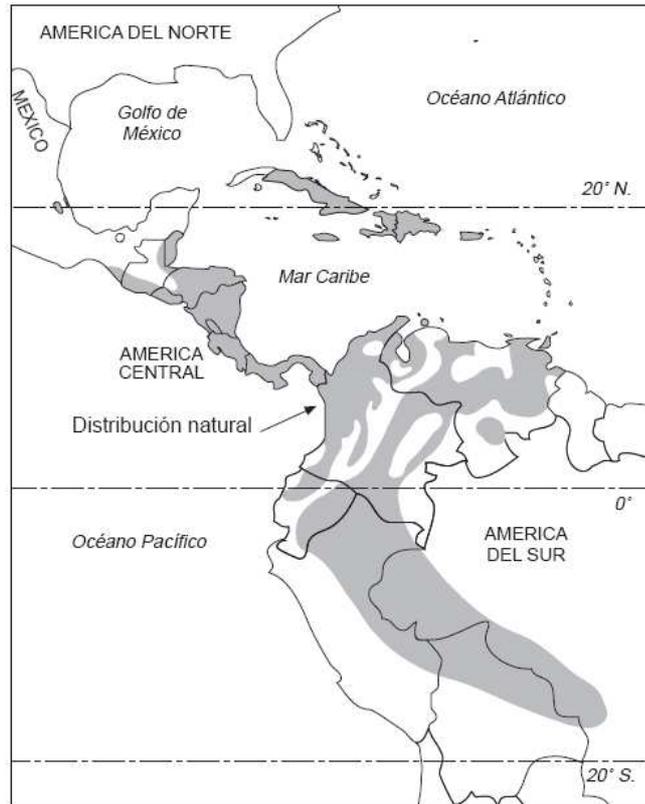


Figura 1.-El área sombreada representa la distribución natural de la balsa, *Ochroma lagopus*, en el neotrópico. Tomado de: (K. Francis, John, 2002)

1.4.1.5 Crecimiento y rendimiento

Los árboles de balsa crecen de manera extremadamente rápida. Las plántulas alcanzarán alturas de entre 1,8 y 4,5 m al final de la primera temporada y 11 m. al final de la segunda. El tamaño final podrá ser de entre 25 y 30 m. o más. Un árbol vigoroso puede alcanzar un diámetro a la altura del pecho (d.a.p.) de 40 cm. en un período de 5 a 6 años; de manera ocasional, algunos árboles alcanzan un (d.a.p.) de 100 cm. a una edad más avanzada. (K. Francis, John, 2002). Los árboles de 7 u 8 años comienzan a desarrollar un duramen saturado de agua, después de 12 a 15 años los árboles se deterioran rápidamente y muy pocos sobreviven más allá de 20 a 30 años (K. Francis, John, 2002).

Los árboles jóvenes de balsa poseen un sistema radical poco profundo. Alrededor de los 7 años, los árboles desarrollan una raíz pivotante, lo que causa que el centro del árbol se vuelva súper saturado de agua. Los árboles de gran tamaño a menudo tienen contrafuertes moderados. (Beihefle, 1990).

Debido a su tasa de crecimiento inusualmente alta, la balsa tiene la capacidad de concentrar en el tallo la mayoría de la energía asignada a la producción de madera mediante la producción de pocas ramas y de hojas grandes y sencillas con pecíolos en forma de ramas. La ramificación sigue el patrón de *Koriba*, en el cual vástagos de tamaño inicialmente igual se desarrollan en cada nudo, y luego uno de los vástagos adquiere dominancia y asume una posición erecta para convertirse en el líder. La balsa produce tres ejes en cada nudo, uno para el líder y dos para las ramas. (K. Francis, John, 2002).

1.4.1.6 Usos de la madera

El duramen de la balsa es de color marrón claro ó marrón rojizo y la albura que provee la mayor parte de la madera comercial es de color blanco a moreno claro. La madera de la balsa es de una textura de mediana a gruesa, lustrosa, de fibra recta y sin anillos anuales. (K. Francis, John, 2002).

La madera de balsa se seca rápidamente. El secado al horno, en particular con provisiones de mayor grosor, rinde un producto mucho mejor que el secado al aire. La madera de balsa tiene un 92 por ciento de aire en espacios y tiene una conductividad termal muy baja. (K. Francis, John, 2002). A pesar de poseer fibras cortas al igual que la mayoría de otras especies de madera dura, la madera de balsa se ha usado de manera limitada para la producción de pulpa y papel. En muchos de sus usos tradicionales, tal como boyas para la pesca y salvavidas. (Beihefle, 1990).

La madera de balsa tiene un contenido de lignina relativamente bajo (26,5 %). Se usa también como material aislante masivo y libre de fuerzas electrostáticas en barcos para transporte criogénico. (Beihefle, 1990).

Es posible que el hecho de que es un material orgánico que no contamina el medio ambiente ayude a mantener la demanda en el futuro. La balsa se cultiva a veces como una planta ornamental debido a sus grandes hojas y flores. La balsa se usa a menudo como una especie índice en investigaciones de las propiedades físicas de maderas y su susceptibilidad a la pudrición y los insectos. (K. Francis, John, 2002).

1.4.2 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de plantas o tejidos vegetales se define como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles de partes de una planta, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos. Se caracteriza porque ocurre a micro escala sobre una superficie pequeña; se optimizan las condiciones ambientales refiriéndose a los factores físicos, nutricionales y hormonales; además se elimina por completo la presencia de microorganismos y organismos patógenos o plagas. (Pierik.R, 1990).

Esta técnica constituye una herramienta de propagación vegetativa y al igual que en otros casos, la descendencia presenta las mismas características que la planta madre, es decir, son clones de la planta de la cual se originaron, hecho que no ocurre por la vía sexual donde se originan individuos únicos (Abdelnour.A, 1994).El éxito de esta técnica radica en la capacidad de desdiferenciar a las células del explante y devolverles su capacidad de multiplicarse y especializarse en cualquier tipo de tejido. (Cubero.J, 2003).

Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo sino con solamente una parte del mismo, se utiliza el término explante para indicar la parte del órgano ó tejido vegetal que se cultiva *in vitro*. A la dificultad de reproducir las

condiciones naturales en condiciones de laboratorio, se debe añadir en este caso la dificultad de suministrar al explante todo aquello que antes obtenía del sistema completo. En resumen, el cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante. Conviene, por tanto, conocer cuáles son los principales factores que conforman dicho ambiente y que deberán ser controlados (Castillo A, 2004).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales presenta una serie de ventajas, frente a los métodos de propagación convencionales, entre estas se pueden incluir: obtención de miles de plantas a partir de una planta madre; reducción del tiempo necesario para la multiplicación de una planta; reducción de las áreas físicas empleadas para la multiplicación, así como la reducción de costos; estricto control sobre las condiciones de sanidad del material multiplicado; facilidades en el transporte de material vegetal incluso de un país a otro, pues las restricciones aduaneras son mucho menores y la posibilidad de reproducir especies de las cuales existan pocos individuos. (Roca W, Mroginski L, 1993).

Las plantas que se escogen para someterlas a un tratamiento en condiciones *in vitro* son seleccionadas utilizando juicios como: especies difíciles de propagar, especies con problemas de regeneración *in vivo*, especies que al ser propagadas aumentan su valor comercial o especies a las cuales se pretende aplicar ingeniería genética.

Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden agruparse en cinco etapas claramente definidas: la etapa cero en la que se selecciona el material vegetal con el que se va a trabajar; la etapa uno o de establecimiento, en la cual en la que se establece un cultivo primario; la etapa dos o de multiplicación, en la que se busca obtener la mayor cantidad de plántulas; la etapa tres o de enraizamiento, donde se busca volver a la planta autotrófica y capaz de sobrevivir en condiciones de campo y la etapa cuatro o de transferencia final al campo. (Roca W, Mroginski L, 1993).

1.4.2.1 Selección del material vegetal.

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo A, 2004).

1.4.2.2. Etapa de desinfección.

Uno de los principales factores que contribuyen al establecimiento de cultivos asépticos es la desinfección exitosa de la superficie del explante a emplearse, debido a que si sobre el explante persiste algún microorganismo, ya sea hongo a bacteria, estos destruirían el cultivo pues compiten con el explante por los nutrientes del medio, siendo ellos más exitosos por sus altas tasas de multiplicación y desarrollo acelerado. (Roca W, Mroginski L, 1993).

En general, el proceso de esterilización puede resumirse en los siguientes pasos:

- Lavado del material con agua corriente, para retirar restos de tierra u otras partículas (opcional).
- Eliminación de las partes muertas e infectadas de la planta.
- Introducción de la porción de planta en alcohol diluido al 70% durante unos segundos.
- Sumergir la planta en una solución de hipoclorito de sodio (por ejemplo al 1%) con un agente tensoactivo (por ejemplo Tween 20 o Tween 80),

durante 10-15 minutos. La fuente más utilizada de hipoclorito de sodio es el cloro comercial. Éste contiene un 5% de hipoclorito de sodio como agente activo.

- Enjuague del material con agua estéril para eliminar la solución de hipoclorito de sodio. El enjuague debe tener lugar bajo condiciones de asepsia, y suele realizarse en tres veces sucesivas de 2 minutos cada una.

Otro agente esterilizante es el cloruro de mercurio, el cual se disuelve en agua a una concentración de 0,01-0,05 (p/v). El material vegetal está en contacto con el producto durante 2 a 12 minutos, para ser enjuagado con agua estéril al final del proceso. Este producto debe utilizarse bajo medidas de seguridad, ya que es nocivo para la salud (Pierik.R, 1990).

Mientras se realiza la desinfección debe buscarse eliminar la totalidad de microorganismos sin afectar la integridad del explante y su viabilidad. No es posible establecer un mismo protocolo de desinfección para cualquier explante de cualquier especie, éste debe ser diseñado en función de varios factores. (Roca W, Mroginski L, 1993).

1.4.2.3 Medio de cultivo

Una vez que se ha determinado el objetivo de cultivo *in vitro* es necesario seleccionar un medio de cultivo que contenga todos los elementos necesarios para obtener la respuesta deseada. (Roca W, Mroginski L, 1993).

Un medio de cultivo debe ser fuente de carbono, nutrimentos minerales, vitaminas, agente gelificante, reguladores de crecimiento entre otros compuestos. (Roca W, Mroginski L, 1993).

La fuente de carbono es muy importante porque escasos cultivos son autótrofos en condiciones *in vitro*, es por ello que el medio de cultivo debe

incluir una fuente de carbono como la sacarosa o cualquier otro azúcar. En cuanto a los nutrimentos minerales se deben incluir macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl). (Roca W, Mroginski L, 1993).

Las vitaminas son un elemento más del medio de cultivo pero no son indispensables. En lo que se refiere al agente gelificante, la cantidad del mismo está en función de la clase de medio de cultivo que se desee preparar, usándose concentraciones desde un 0.6% hasta un 1%. Entre los reguladores de crecimiento a usarse de modo más común están las auxinas (2,4-D, ANA, AIA, AIB), las citoquininas (KIN, BAP, ZEA) y las giberelinas (AG₃), estas pueden usarse por separado o juntas guardando un balance de acuerdo a lo que se pretenda obtener del cultivo. (Roca W, Mroginski L, 1993).

Existen además otros componentes que pueden o no incluirse en el medio de cultivo, entre ellos se encuentran: el agua de coco, extracto de levadura, extracto de tubérculos de papá, glicina o cisteína como fuentes de nitrógeno, así como otros aminoácidos. (Roca W, Mroginski L, 1993)

1.4.2.4 Fase de establecimiento

Una vez que se cuenta con el material vegetal desinfectado y los medios de cultivo preparados y estériles se da inicio a la etapa de establecimiento, en la cual el explante es introducido en el medio de cultivo bajo condiciones de asepsia total, generalmente en cabinas de flujo laminar que reduzcan al mínimo las posibilidades de contaminación del explante o del medio de cultivo. Luego de esta operación los frascos que contienen a los explantes son llevados a la sala de incubación donde permanecerán hasta presentar algún cambio, necrosis o contaminación. (Roca W, Mroginski L, 1993).

1.4.2.4 Fase de multiplicación

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivan a la fase de desinfección e introducción, originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo A., 2004).

1.4.2.5 Fase de enraizamiento

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del transplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Por ejemplo, el medio Murashige&Skoog (MS) diluído al 50% ha dado resultados positivos en diferentes especies. Así mismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, es suficiente la eliminación de las citoquininas exógenas para estimular la diferenciación del sistema radical. (Roca W, Mroginski L, 1993).

Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas

nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea. (Castillo, A. 2004).

1.4.2.6 Aclimatación de los explantes enraizados

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. Tanto si los explantes son enraizados *in vitro* como *ex vitro*, en el momento en que se extraen los explantes de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas que no están muy bien adaptados para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explante. (Castillo A, 2004).

Por otra parte crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cerosa bien desarrollada, la barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. Los explantes deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. (Castillo A, 2004).

1.4.3 Factores que influyen en el cultivo *in vitro*

1.4.3.1 Material vegetal

En condiciones adecuadas las plantas madre de las cuales se utilizara su material vegetal debieron haber permanecido en un estricto cuidado tanto en invernadero manteniendo las condiciones fitosanitarias; como en cámaras de ambiente controlado, sin embargo la mayoría de cultivos deben realizarse con explantes cultivados en el campo que pueden poseer contaminación endógena,

lo que lleva consigo un gran riesgo de contaminación, por lo que es ineludible si se utiliza este tipo de explantes:

- Impedir el contacto de la planta con insectos mediante la aplicación de insecticidas ya que estos son vectores de enfermedades.
- Utilizar fungicidas y bactericidas para controlar la proliferación de hongos y bacterias.
- Conservar la humedad tan baja como sea posible en el invernadero.
- Permitir a las plantas madre que serán las donadoras de los explantes utilizados *in vitro*, secarse parcialmente antes de iniciar la esterilización y el aislamiento.
- No mojar las plantas al regarlas, es decir añadir el agua directamente a la maceta donde se encuentra la planta, ya que el agua es un elemento importante para la reproducción y propagación de microorganismos por que puede funcionar como vector de contaminación (Pierik.R, 1990).

La selección del material vegetal adecuado extraído de la planta donadora, constituye una etapa trascendente en el proceso de cultivo *in vitro* ya que de esto depende en gran manera el éxito del desarrollo vegetal por lo que se requiere en lo posible que el material sea lo más homogéneo, es decir sano con un fenotipo adecuado y en un estado fisiológico adecuado. Si el explante es obtenido de una planta donadora adulta existen otras variables que considerar como: respuesta fisiológica, exudación de fenoles, contaminación endógena, porque esto repercutir sobre la división celular y la regeneración *in vitro* (Pierik R., 1990).

1.4.3.2 Factores químicos

Agua

El agua constituye un elemento importante en el proceso de preparación de medios de cultivo por que representa el 95% de la composición del medio por ello es necesario que sea sometida a un proceso de destilación (Pierik.R, 1990). El destilador remueve minerales y componentes orgánicos del agua. (Mejia. R, 1987).

Usar agua corriente para condiciones *in vitro* provoca efectos negativos, porque puede contener contaminantes orgánicos o microorganismos, iones de calcio que afectarían la composición del medio de cultivo precipitando componentes el mismo. (Pierik.R, 1990).

El almacenamiento del agua debe realizarse en recipientes de polietileno, ya que el vidrio posee trazas de plomo, sodio y arsénico que pueden pasar al agua (Pierik.R, 1990).

Agar

Los beneficios del agar es que no es reactivo con los componentes del medio de cultivo y no es digerido por enzimas de los tejidos de la planta. El agar no se gelifica en bajas condiciones de pH ($\text{pH} < 4.5$), la concentración de agar comúnmente usada en los medios de cultivo es entre 0.5% y 1%. La concentración de agar puede ser crítica para la respuesta de la planta en el cultivo, si el medio es demasiado suave puede producir una hiperhidratación (anormal glaseado) o si el medio es muy duro puede producir reducción en el crecimiento. (Sathyanarayana. B, 2007).

Agar es el agente solidificante comúnmente más utilizado, la alga marina roja contiene un polisacárido estructural *Agar*, que contiene dos componentes:

agarosa y agarpectina. Cuando el agar es mezclado con el líquido forma el gel que se mezcla a una temperatura de 100°C y se solidifica a una temperatura de 45°C. (Sathyanarayana. B, 2007).

Azúcar

El azúcar es un componente importante de los nutrientes del medio y es esencial para el crecimiento y el desarrollo *in vitro*. Los tejidos verdes no son suficientemente autotróficos en condiciones *in vitro*. La concentración de CO₂ también puede ser limitada por la fotosíntesis, por ello la poca concentración de CO₂ en los recipientes que contienen los explantes *in vitro* puede convertirse en toxica. Una concentración de 1 a 5% de sacarosa (disacárido) es usualmente usada *in vitro*. (Pierik. R.L.M., 1997).

La concentración escogida de azúcar para utilizarse es dependiente del tipo y la edad de crecimiento del material vegetal, generalmente el crecimiento y el desarrollo incrementa con el aumento de la concentración de azúcar, y un decrecimiento del explante con altas concentraciones de azúcar (Pierik. R.L.M., 1997).

Nutrición mineral

Las necesidades nutricionales de las plantas se separan en dos grandes grupos: nutrientes orgánicos e inorgánicos. Los nutrientes orgánicos representan el 90 y 95% del peso seco de las plantas y están constituidas por los elementos carbono, oxígeno e hidrógeno obtenidos a partir del CO₂ de la atmósfera y del agua del suelo. El restante 5 – 10%, constituye la denominada fracción mineral que desempeña un papel importante en el metabolismo de las plantas que tienen que ver con su absorción, asimilación y transporte. (Azcón.J, Talón. M, 2000).

Los micronutrientes son esenciales y se encuentran en bajas concentraciones en las plantas, la mayoría de ellos corresponde a

constituyentes enzimáticos y por ellos son necesarios en pequeñas cantidades. Los macronutrientes son elementos constituyentes de biomoléculas estructurales, tales como proteínas, lípidos o carbohidratos, o actúan como osmolitos. (Azcón.J, Talón. M, 2000).

Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento u hormonas no son nutrientes, pero influyen en el crecimiento y el desarrollo. Ellos son producidos naturalmente en las plantas en los medios de cultivo no son generados en cantidades suficientes, por lo que deben ser añadidos selectivamente al medio del cultivo. Auxinas, Citoquininas, Giberelinas, Etileno y muchas otras sustancias son usadas como hormonas y reguladores de crecimientos. Generalmente se dice que las auxinas promueven el alargamiento celular y la iniciación del enraizamiento. En cambio las citoquininas promueven la división celular y a promover la formación de brotes. Y estos efectos implican un rango de interacción entre auxinas y citoquininas. Estas hormonas también interactúan con otros compuestos químicos que también son afectados por factores ambientales, como la luz y la temperatura. (Kyte.L, Kleyn.J, 2003).

Es importante que el medio de cultivo contenga el tipo correcto de hormona y concentración correcta de hormona variante para cada planta que se inocule en un medio de cultivo. Ocasionalmente los medios de cultivo pueden inducir que los explantes se habitúen a perder la necesidad de hormonas. (Kyte.L, Kleyn.J, 2003).

1.4.4 Auxinas

La palabra auxina proviene del griego *auxein* que quiere decir aumentar o crecer y su estructura química se dedujo en 1930: ácido indol acético. (http://omv_fcien_edu.uy, 2002).

La auxina natural de mayor distribución es el ácido 3-indolacético (AIA), aun cuando el ácido 4-cloroindol-3-acético ha sido aislado de plantas superiores. En general este grupo de hormonas afecta otras características fisiológicas, además de la elongación. (Kurina, disponible:bd.unsl.edu.ar, 2009).

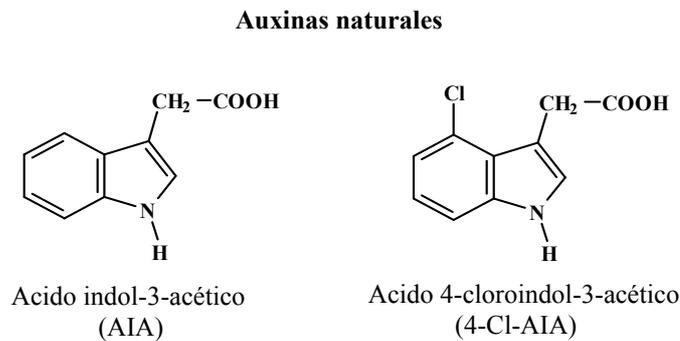


Figura 2.- Auxinas naturales, tomado de: (Kurina, disponible:bd.unsl.edu.ar, 2009)

1.4.4.1 Síntesis y degradación

Aunque las auxinas se encuentran en todos los tejidos de la planta, una mayor concentración ocurre en las regiones que están en crecimiento activo. La síntesis de IAA ocurre principalmente en meristemas apicales, hojas jóvenes y frutos en desarrollo. Plántulas de *Arabidopsis* pueden sintetizar IAA en hojas, cotiledones y raíces, siendo las hojas jóvenes las de mayor capacidad sintética. (Jordán. M, 2006).

Las plantas usan dos rutas biosintéticas para producir IAA, una dependiente del triptófano (Trp) y otra independiente de él, siendo la primera la más importante y de la que se tiene más información. La síntesis de Trp es una de las más complicadas entre todos los aminoácidos, involucrando cinco pasos desde corismato. (Jordán. M, 2006).

1.4.4.2 Efectos fisiológicos de las auxinas

Crecimiento y formación de raíces

Debido a que las auxinas influyen tanto la división, como el crecimiento y diferenciación celular, están involucradas en muchos procesos del desarrollo, en algunos de ellos interactuando con otras fitohormonas. Uno de los ensayos que caracterizan el efecto de auxinas en el desarrollo es la regulación del crecimiento radicular el cual es definido desde el desarrollo embrionario. Mientras las auxinas estimulan el crecimiento de los tallos y coleoptilos, inhiben el crecimiento de la raíz primaria, pero estimulan la formación de raíces secundarias. La concentración óptima para promover elongación de tallos es entre 10^{-6} y 10^{-5} M, sin embargo, en raíces esta concentración es muy alta y retarda su crecimiento. Las auxinas además promueven la biosíntesis de la hormona etileno que inhibe el crecimiento radicular. (Jordán. M, 2006).

Crecimiento y elongación celular.

Las auxinas promueven el crecimiento de las plantas principalmente por un aumento de la expansión celular. Las auxinas también inducen la síntesis de giberelinas, hormonas que promueven el crecimiento del tallo, por lo que las auxinas también estimularían el crecimiento en forma indirecta.

1.4.5 Citoquininas

Las citoquininas son un grupo de fitorreguladores que gobiernan la división celular y la diferenciación en tejidos vegetales, participan en el control del desarrollo y la senescencia. Se definen como citoquininas a los compuestos naturales o de síntesis que en presencia de adecuadas concentraciones de auxinas inducen la división celular en cultivos de tejidos vegetales. (Kurina, disponible:bd.unsl.edu.ar, 2009).

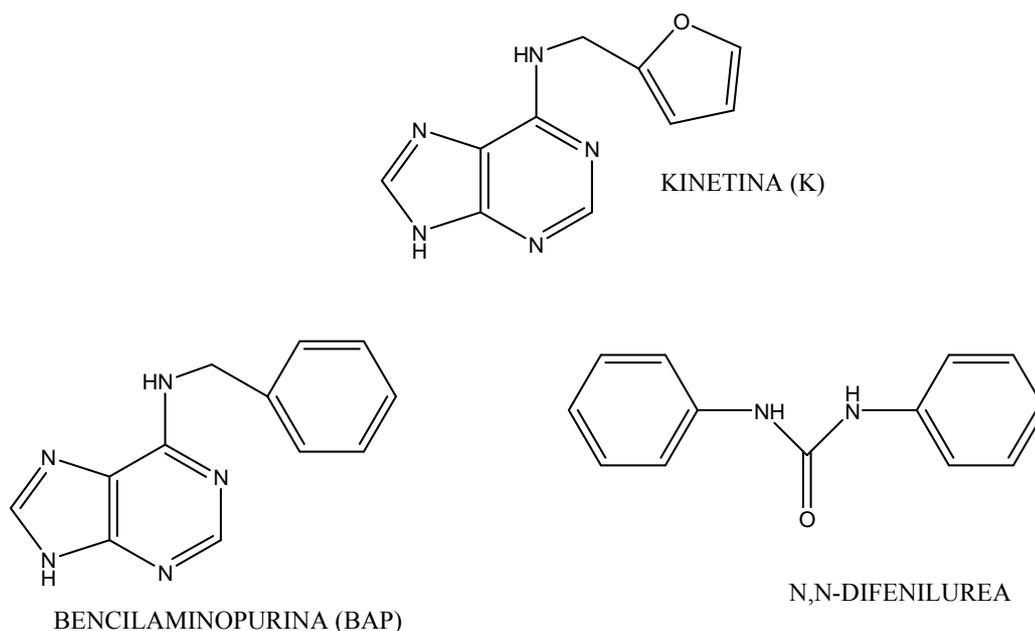


Figura 3.-Estructura de las citoquininas, tomado de: (Kurina, disponible:bd.unsl.edu.ar, 2009)

La primera citoquinina natural fue aislada de *Zea mays* (maíz) por lo que se la denominó zeatina (Z) 6-(4-hidroxi-3-metil-2-trans-butenoamil) purina (Letham, D. 1963). Posteriormente se aislaron 9-β-D-ribofuranosilzeatina ([9R] Z) y su 5'-monofosfato (Letham, D. 1973). (K. Francis, John, 2002).

Las citoquininas pueden encontrarse en las plantas como bases libres o formando conjugados con diversos compuestos químicos que se unen al anillo de purina o a la cadena lateral. (Azcón.J, Talón. M, 2000).

1.4.5.1 Fenilureas (actividad de citoquininas)

Estos compuestos son citoquininas sintéticas, aunque la 1,3-difenyilurea fue aislada de la leche de coco (endospermo líquido), su identificación como citoquinina natural es cuestionada ya que no se encontró nunca más en extractos vegetales. La fenilurea más utilizada como citoquinina sintética es el thidiazuron. En algunas plantas, inicialmente registrado como un defoliante del

algodón, es más efectivo que las citoquininas naturales en la promoción del desarrollo de yemas axilares, o la diferenciación de yemas adventicias en cultivos *in vitro*. (Azcón.J, Talón. M, 2000).

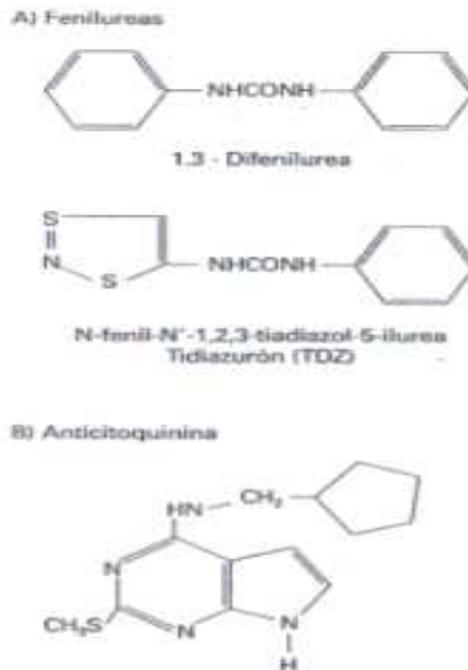


Figura 4.- Estructura de Fenilureas con actividad Citoquinina (A) y estructura de la anticitoquinina 4-ciclopentilamino-2-metilpirrolo [2,3-d]-pirimidina (B), tomado de: (Azcón.J, Talón. M, 2000).

1.4.5.2 Síntesis de citoquininas

Según su origen se pueden distinguir dos tipos de citoquininas: aquellas naturales generadas por las plantas y otras artificiales, sintetizadas por el hombre. Todas las citoquininas naturales se generan a partir de DMAPP (vía del ácido mevalónico y 5'-AMP y su síntesis acontece principalmente en la raíz, aunque también en el meristema apical y en semillas inmaduras (Kakimoto.T, 2003). La mayoría de las citoquininas naturales y artificiales conservan la base adenina, aunque a las segundas se les ha ligado diversas moléculas, generándose así, por ejemplo, la benciladenina (BA) o la furfurilaminopurina (kinetina). (Kurina, disponible:bd.unsl.edu.ar, 2009).

Posteriormente fue sintetizado otro tipo totalmente diferente de estructura, sin la base adenina, con acción biológica idéntica a las citoquininas como el thidiazuron (TDZ). Los reguladores sintéticos como BA, kinetina o TDZ, son más potentes que las hormonas naturales endógenas (zeatina, *trans*-zeatina o isopentiladenina), debido no sólo a sus particularidades específicas, sino también a que, salvo algunos reportes contrarios, las artificiales no pueden ser degradadas o metabolizadas por el tejido. TDZ es considerado uno de los inductores más potentes en la formación de nuevos brotes o embriones somáticos tanto en plantas leñosas como herbáceas (Huetteman.C, Preece.J, 1993).

1.4.6 Thidiazuron

Thidiazuron fue desarrollado originalmente por *Schering AG* para su utilización como defoliante para *Gossypium hirsutum L.* (algodón), pero *Mok* en 1982 encontró una dependencia como citoquinina en *Phaseolus lunatus L.* (frijol lima), la formación de callo fue estimulada cuando bajas concentraciones de TDZ fueron añadidas al medio de cultivo en condiciones *in vitro*. El Thidiazuron es más activo que la zeatina para la estimulación del crecimiento de callo en *Phaseolus*. Y además más efectivo utilizándolo en bajas concentraciones comparado con otras citoquininas. (Huetteman.C, Preece.J, 1993).

Investigaciones realizadas en la literatura reciente se encontró que más de 825 informes de el uso de la citoquinina sintética como regulador del crecimiento vegetal: thidiazuron (TDZ: N-fenil-N' - 1, 2,3-thidiazol-5- ilurea), para la inducción de la regeneración de plantas *in vitro*. (Maxwell.P, 2007).

El TDZ es una fenilurea sustituta(N-phehil-N-1, 2,3-thidiazol-5-ilurea) es usada como un herbicida sintético y como un regulador de crecimiento para plantas y posee un alto rango de estimulación para la proliferación de brotes axilares en muchas especies maderables. Promueve la proliferación de yemas laterales y estimula la formación de brotes en una amplia variedad de especies.

El TDZ promueve el crecimiento debido a su actividad biológica que es similar a una citoquinina N-sustituida y también induce a la síntesis y acumulación de citoquininas endógenas. (Zahoor.A, Faheem.A, 2009).

Las respuestas morfogénicas que se han encontrado respecto al TDZ son actividades similares a las de las citoquininas, por ejemplo promover la liberación de brotes laterales que se encuentra en etapas de latencia y la formación de brotes en una amplia variedad de especies de plantas. El mecanismo de acción del TDZ es aún desconocido, sin embargo hay dos hipótesis en este sentido, es posible que el TDZ promueva directamente el crecimiento debido a su actividad biológica de una manera similar a las citoquininas N6 sustituidas o es posible que induzca la síntesis y/o acumulación de citoquininas endógenas. Este último concepto está basado en los efectos de alta capacidad del TDZ en inducir citoquinina dependencia en regeneración de brotes y en la modulación de los niveles endógenos de citoquininas. (Visser.C, Javed.A, Gill R, 1992).

El TDZ puede estimular la conversión de los nucleótidos de citoquinina a nucleósidos biológicamente más activos, por esto recibido más atención en los últimos años debido a su habilidad de promover la regeneración *in vitro* en muchas especies dicotiledóneas. Particularmente en la regeneración *in vitro* en especies leñosas recalcitrantes. El TDZ es capaz de inducir la producción no solo brotes adventicios y/o axilares a través del proceso de organogénesis, sino también, embriogénesis somática en muchas especies dicotiledóneas. (Shan.X, Li.D, Qu.R, 2000).

Bajas concentraciones de TDZ (<1 μ M) induce una mayor proliferación axilar comparado con otras citoquininas, sin embargo, el TDZ puede inhibir la elongación de los brotes, en muchos de los casos es necesario transferir los brotes aun medio que contenga bajos niveles de TDZ y/o sin actividad de citoquininas. (Huetteman.C, Preece.J, 1993).

Concentraciones mayores que 1 μ M de TDZ puede estimular la formación de callo, brotes adventicios o embriones somáticos.

Subsecuentemente el enraizamiento de los microbrotes generados pueden ser no afectados o ligeramente inhibidos por la exposición al TDZ. (Huetteman.C, Preece.J, 1993).

1.4.6.1 Actividad química de TDZ

El Thidiazuron (N-fenil-N'-1, 2,3-thidiazol-5-ilurea) es uno de muchos urea sustituto que han sido investigados por su actividad semejante a la citoquinina. El Thidiazuron es una de las más potentes difenilúreas que se han evaluado para el cultivo de tejidos vegetales. Thidiazuron es muy soluble en DMSO (Dimetilsulfoxido) y DMF (N, N-dimetilformamida), ligeramente soluble en agua. Muchas publicaciones reportan el uso de DMSO como solvente para TDZ. (Huetteman.C, Preece.J, 1993).

Al adicionar 1 ml de una solución 1N de KOH es suficiente para solubilizar en grado técnico el TDZ, esto para preparar 100 ml de una solución stock de TDZ con concentración 1mM. El TDZ se lo expone a la solución de KOH 1N por lo menos un minuto, entonces se añaden 99 ml de agua destilada o agua desionizada para llevar la solución al volumen calculado, y debe ser refrigerado. No existe degradación del TDZ utilizando este método. En cambio, usando una solución de NaOH 1N se requiere de 3 horas de hervido para hidrolizar completamente el TDZ y conservarlo a 50°C, obteniendo la mitad de la actividad del TDZ si se exceden los 7 días de su uso. (Huetteman.C, Preece.J, 1993). También se utiliza etanol diluido al 50% como solvente para el TDZ que puede ser incorporado al medio de cultivo y retener su alta actividad incluso luego del autoclavado (Khawar.K, 2004).

El uso excesivo de KOH en los medios de cultivo, pueden convertir en alcalino al medio de cultivo cuando el stock de TDZ es añadido los nutrientes pueden precipitar. A diferencia de otras citoquininas que forman una solución clara con el KOH 1N. 1mM de TDZ forma una solución de color marrón clara. Las soluciones pueden ser refrigeradas por lo menos un mes sin perder actividad, estas soluciones pueden tener concentraciones tan bajas como

10pM utilizadas en cultivos de brotes de *Acer saccharinum L* (arce plateado). (Huetteman.C, Preece.J, 1993)

1.4.6.2 Proliferación de brotes axilares usando TDZ

TDZ es seleccionado para la micropropagación de especies leñosas por su enorme capacidad de estimular la proliferación de brotes. Explantes de algunas especies leñosas; especialmente árboles que tienen un hábito de crecimiento natural monopodial, las citoquininas comunes usadas en condiciones *in vitro* no tienen el suficiente poder para ser utilizadas en estas especies. El thidiazuron ofrece una alternativa que con frecuencia aumenta la producción de brotes en éstas especies superiores. (Huetteman.C, Preece.J, 1993).

Se usa TDZ para micropropagación clonal por que no solo estimula la proliferación de brotes axilares, sino también la formación de callo y organogénesis. Los altos niveles de producción son frecuentemente deseables para tener una eficiente micropropagación que pueden incluir brotes adventicios y axilares. (Huetteman.C, Preece.J, 1993).

1.4.6.3 Dosis utilizada de TDZ

Concentraciones extremadamente bajas de TDZ estimulan la proliferación de brotes axilares de muchas especies leñosas. Las comparaciones entre TDZ y otras citoquininas en concentraciones equimolares complican el análisis estadístico porque diferentes citoquininas tienen similar efectividad en rangos de (1 a 10 μ M), el mismo rango utilizado con TDZ promueve la formación de callo y la interrupción del crecimiento del brote. Cuando se diseñan experimentos de micropropagación es necesario utilizar un bajo rango de TDZ comparado con otras citoquininas. (Huetteman.C, Preece.J, 1993).

La razón por la cual se tiene una alta o baja actividad del TDZ en la micropropagación de plantas leñosas no ha sido aun investigada a nivel molecular. (Mok.M.C, 1987).

1.4.6.4 Combinación de reguladores de crecimiento vegetales con TDZ

La adición de TDZ a un medio que contiene BA incrementa la proliferación de brotes. Es interesante la combinación de citoquininas en la proliferación de brotes que al ser usadas individualmente. Esto puede ser indicado por la absorción, reconocimiento efectuado por las células o los mecanismos de acción de las citoquininas. La interacción que ocurre entre dos compuestos para obtener la misma respuesta morfológica en plantas amerita más estudios. (Huetman.C, Preece.J, 1993).

1.4.6.5 Formación de callo usando TDZ

Para el crecimiento de callo e inducir variación somaclonal, para estudios fisiológicos; el thidiazuron es una potente citoquinina para promover la formación de callo a partir de especies leñosas, especialmente cuando se usa concentraciones mayores a 0,1 μM . (Huetman.C, Preece.J, 1993).

Altas concentraciones de TDZ estimulan la formación de callo en muchas especies leñosas, frecuentemente a expensas de la proliferación de brotes axilares. Por ejemplo, altas concentraciones de TDZ (1 – 50 μM) producen callos no friables en un estudio realizado en nogal a expensas del crecimiento de brotes axilares, concentraciones ≥ 1 μM de TDZ estimulan la formación de callo en maple plata, pero inhiben el crecimiento de brotes axilares; cultivos de maple plata producen grandes cantidades de callo los cuales tienen muchos brotes. (Huetman.C, Preece.J, 1993).

Adicionalmente, altas concentraciones de TDZ (100nM) produce gran cantidad de callo y a la vez alto número de brotes axilares a partir de explantes de nogal negro y además es posible inhibir la formación de callo con

concentraciones extremadamente altas de TDZ (1000 μM), pero esta concentración a la vez puede ser letal. (Huetttman.C, Preece.J, 1993).

1.4.6.6 Organogénesis inducida por TDZ

Aunque la producción de brotes adventicios es generalmente indeseable en la micropropagación clonal, esto representa una gran oportunidad para regenerar plantas a partir de estos tejidos manipulados a través de la biotecnología. (Huetttman.C, Preece.J, 1993).

Bajas concentraciones de TDZ pueden estimular solo la formación de brotes axilares, altas concentraciones pueden resultar en la producción de brotes adventicios y axilares. Los explantes más comunes para la regeneración adventicia en especies leñosas son los cotiledones que provienen de semillas maduras o inmaduras y tejidos de hoja provenientes de cultivos *in vitro*. Las semillas son usadas como explantes en las especies leñosas porque investigadores han tenido gran éxito con su regeneración. Las plantas leñosas han sido segregadas por sus características fenotípicas cuando fueron propagadas por semilla. Los explantes (cotiledones), no son ideales para asegurar la uniformidad y las características que se desean tener en las plantas adultas. (Huetttman.C, Preece.J, 1993).

1.4.6.7 Brotes transgénicos con TDZ

Thidiazuron se está convirtiendo en parte integral de la regeneración después de la inserción de genes extraños en algunas especies leñosas. La razón de un pretratamiento fue promover la formación de regiones meristemáticas e incrementar la receptividad de los tejidos; todo esto previo a los bombardeos en los que se utilizó partículas de oro cubiertas de ADN. (Huetttman.C, Preece.J, 1993).

1.4.6.8 Enraizamiento (TDZ)

El enraizamiento de microbrotes puede ser dificultoso por que conllevan consigo el efecto de la citoquinina en el medio de cultivo usado para la proliferación de brotes, este caso puede presentarse al usar una citoquinina tan potente como el TDZ, aunque la mayoría de especies de TDZ no inhiben la formación raíces adventicias una vez que los brotes son trasplantados.

1.4.6.9 Elongación (TDZ)

El TDZ puede inhibir la elongación de los brotes que se generan en condiciones *in vitro*, la elongación de brotes adventicios se da de mejor manera cuando se combina 0,01 o 0,1 μM de TDZ combinado con 100 μM de BA o zeatina. El problema de la elongación de los brotes puede tratarse con el traspaso de los brotes a un nuevo medio de cultivo que no contenga TDZ o con un diferente balance en los reguladores de crecimiento. (Huetteman.C, Preece.J, 1993).

1.4.6.10 Vitrificación (TDZ)

Las plantas hiperhídricas o vitrificadas se caracterizan por una apariencia acuosa y transparente de sus tejidos. Este fenómeno es frecuente y relacionado con la acumulación de etileno, concentración o tipo del agente gelificante, composición del medio de cultivo, el incremento de la concentración de TDZ puede incrementar la incidencia de vitrificación. Algunos clones son más propensos a este problema que otros, si los cultivos son mantenidos normalmente, los brotes elongan y pierden su apariencia vitrificada. Es mucho mejor esperar por la elongación de los brotes por que estos enraízan y se aclimatan más fácilmente que siendo pequeños y vitrificados, el uso de un segundo medio de cultivo promueve la proliferación y controla la vitrificación relacionada con el TDZ y también favorece al enraizamiento. (Huetteman.C, Preece.J, 1993).

1.4.6.11 Fasciación de Brotes (TDZ)

Un fenómeno común relativo al uso prolongado de TDZ es la fasciación de los brotes establecidos en los cultivos de genotipos similares. Brotes en los cuales ocurre este fenómeno son diferentemente marcados de los brotes normales, aparecen como si varios brotes se fusionan para formar un tallo gordo. Este fenómeno ha sido observado en los cultivos de brotes de arce plateado, el grupo fenil del TDZ puede ser el causante de la fasciación, pero esto no ha sido comprobado experimentalmente. (Huetteman.C, Preece.J, 1993).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización del ensayo

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

2.2 Selección, colecta y transporte del material vegetal

Las plantas de Balsa se obtuvieron de la Hacienda SAN ANTONIO, de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA II, especialidad de Ciencias Agropecuarias ubicada en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, cantón Santo Domingo de los Colorados, y se extiende desde los Km 24 al Km 54 de la vía Santo Domingo-Quevedo, las muestras fueron seleccionadas por el Ing. Forestal Patricio Jiménez, tomando en cuenta factores como: condiciones fitosanitarias y fisiológicas.

Las plantas se encontraban en fundas de plástico con tierra del lugar donde fueron muestreadas para mejorar su aclimatación y transporte; que se realizó vía terrestre en cubetas adecuadas para evitar el maltrato mecánico para luego ubicarlas en los invernaderos del laboratorio.

La selección del material vegetal es importante, se escogieron las plantas con las mejores características fenotípicas, fitosanitarias para entonces denominarlas plantas madre; que fueron las plantas donadoras de los explantes para su introducción *in vitro*.

Las plantas tenían una altura mínima de 20 a 30 cm; Figura 2.1, también libres de contaminación endógena. La sección de la planta que nos interesa son las yemas apicales para la obtención de plantas clones, se utilizará yemas apicales por su característica de no poseer sus sistemas de transporte endógeno desarrollados (xilema, floema), es por esto que la mayoría de virus no logran afectar estas estructuras vegetales y además la tasa de división celular en las yemas es mayor comparada con la de multiplicación de virus, por todo lo descrito es recomendable utilizar esta sección del material vegetal.



Figura 2.1- (a) Plantas de balsa en condiciones de invernadero sometidas a tratamiento fitosanitario (b) medición de tamaño promedio para cumplir condiciones fenotípicas.

Las plantas fueron sometidas a un tratamiento fitosanitario para eliminar contaminaciones fúngicas, el tratamiento consistió de aplicación foliar de un fungicida de contacto con principio activo: óxido cuproso (50%) en una solución al 0,1%, durante un mes con una aplicación cada 3 días.

Además, se consideró la edad del material vegetal muestreado; ya que mientras más joven sea, se logrará reducir la cantidad de fenoles excretados por la planta en el momento de seccionar y utilizar sus yemas en el proceso *in*

in vitro de micropropagación, esto con la finalidad de reducir la oxidación del medio o el explante en el momento de la siembra.

Las condiciones del invernadero en las que se aclimató las plantas fueron: humedad controlada mediante calor concentrado en piedras sumergidas en agua (valores entre $50\pm 10\%$ Hr.), la temperatura controlada con la ventilación del invernadero, (valores entre $25\pm 5^{\circ}\text{C}$) mediante la apertura y cierre de ventanales, el fotoperiodo vario entre 10h oscuridad y 12h luz, (condiciones ambiente).

Las plantas de Balsa (*Ochroma lagopus*) que fueron aclimatadas y sometidas a los tratamientos fitosanitarios en el invernadero se utilizaron en el proceso de micropropagación *in vitro*, se seccionó las yemas apicales el mismo día en el que se realizó la introducción para evitar la oxidación del material.

2.3 Fase de establecimiento

2.3.1 Medio de cultivo para la desinfección

El medio de cultivo base que se utilizó en la etapa de desinfección para las yemas de Balsa *Ochroma lagopus* fue el medio Murashige&Skoog 1962, sus componentes se detallan en la siguiente tabla 2.1.

Para realización de este medio se utilizó a la mitad de concentración la primera Stock (NH_4NO_3 , KNO_3), para evitar la oxidación y como medida preventiva (Suárez E.I., 2006), la sacarosa está involucrada en el medio, son causantes de procesos de oxidación fenólica de los explantes. (Batista J, 1999).

En la fase de desinfección la concentración de agar fue de 6,5 g/L; 25 g/L de azúcar, Sulfato de adenina 0,5 mg/L; L – Cisteina 30 mg/L; ácido ascorbico 30 mg/L; Carbon activado 200 mg/L; Inositol 100 mg/L; 50 ul/L de

Amistar TOP (Azoxystrobin, Difenoconazol); pH 5,7. El medio de cultivo fue esterilizado en la autoclave durante 30 minutos a 121°C y 15 PSI.

Tabla 2.1 Componentes del medio M&S 1962, utilizado en la etapa de desinfección

Medio Murashige&Skoog	
Componentes	Concentración mg/L
NH₄NO₃	1650
KNO₃	1900
MgSO₄.7H₂O	370
MnSO₄.H₂O	16,9
ZnSO₄.7H₂O	8,6
CuSO₄.5H₂O	0,025
CaCl₂.2H₂O	440
KI	0,83
CoCl₂.6H₂O	0,025
KH₂PO₄	170
H₃BO₃	6,2
Na₂MoO₄.2H₂O	0,25
FeSO₄.7H₂O	27,84
Na₂EDTA	37,24

2.3.2 Desinfección de las muestras

Realizado el tratamiento fitosanitario previo, a las plantas de Balsa (*Ochroma lagopus*) se seccionó las yemas apicales de un tamaño promedio de 3 a 4 cm. tratando de no maltratar el material vegetal.

El protocolo de desinfección establecido fue, descrito en la Figura 2.2; se cortó las yemas apicales del tamaño descrito (3 a 4 cm.) se lavó con agua corriente durante 30seg. cada explante, en seguida se las sumergió en una solución de Tween 20 al 1,25% durante 45 min., inmediatamente: se ensayó concentraciones de fungicida experimentadas en pruebas de desinfección previas, estas concentraciones se probaron solas o en combinación con los fungicidas a continuación descritos: Captan a una concentración de 0,1% (Captan 80 PM) mas Tween 20 al 1,25%, durante 15 min., Óxido cuproso al 0,1% (Cobre Nordox 50) mas Tween 20 al 1,25% durante 15 min., Azoxystrobin; Difenconazol al 0,1% ó 0,3% (Amistar Top) más Tween 20 al 1,25% durante 15 min.

Luego se realizó un lavado con una solución del alcohol al 70% durante 3min. e inmediatamente se probaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión adecuados a la concentración que se implementó para impedir el menor proceso de necrosamiento de los explante; soluciones de cloro (0,5%-2.5%) más Tween 20 al 6,25% con tiempos de inmersión desde 10 a 40 min. Finalmente se realizó tres lavados de los explantes que se iban a introducir en la cámara de siembra con agua destilada estéril, cada lavado con una duración de 5 min. Concluido el proceso de desinfección se procede a la siembra de las yemas apicales. La cámara de siembra previamente fue esterilizada con luz ultravioleta por 15 minutos seguidos por flujo de aire estéril igualmente por 15 minutos, bajo condiciones completamente asépticas.

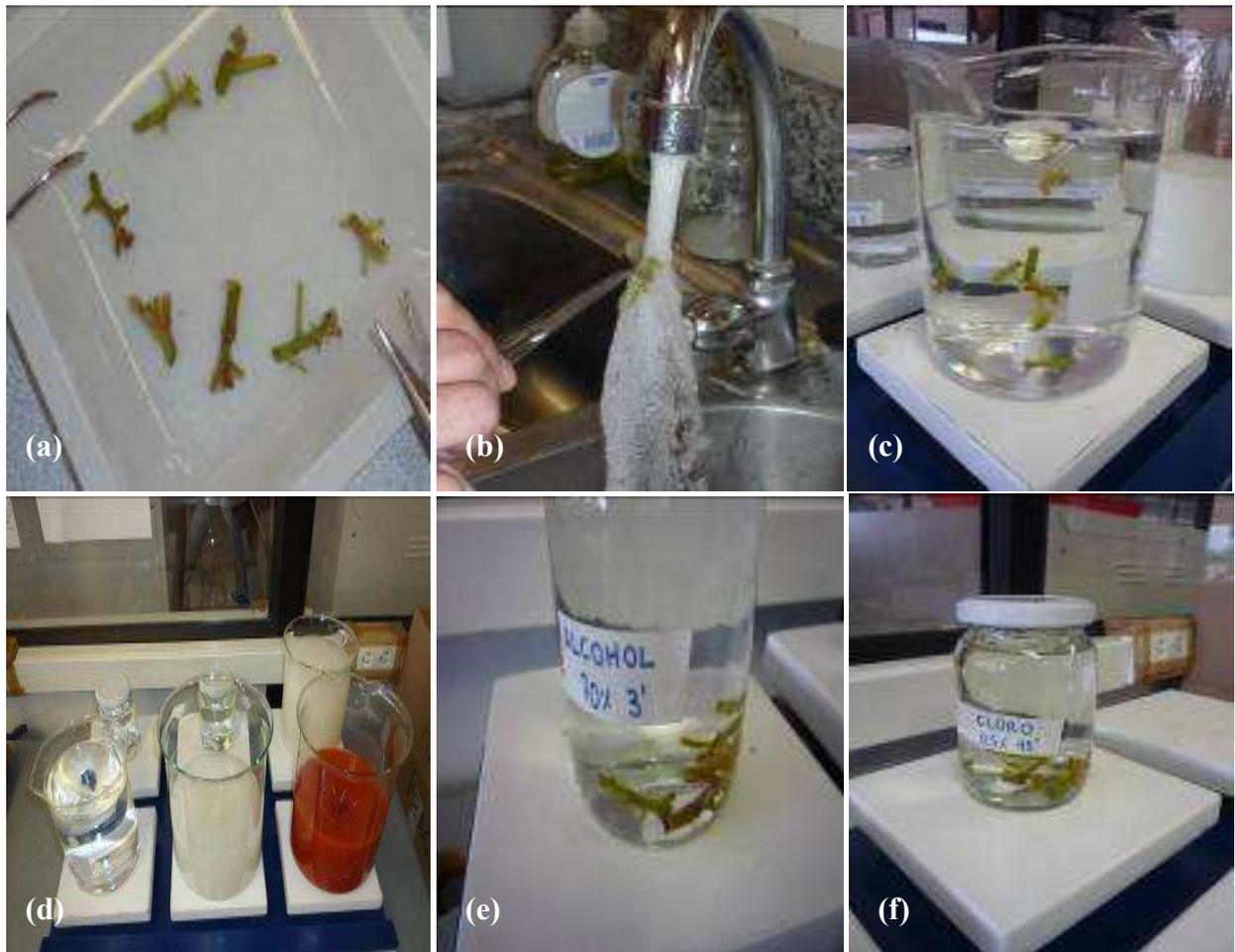
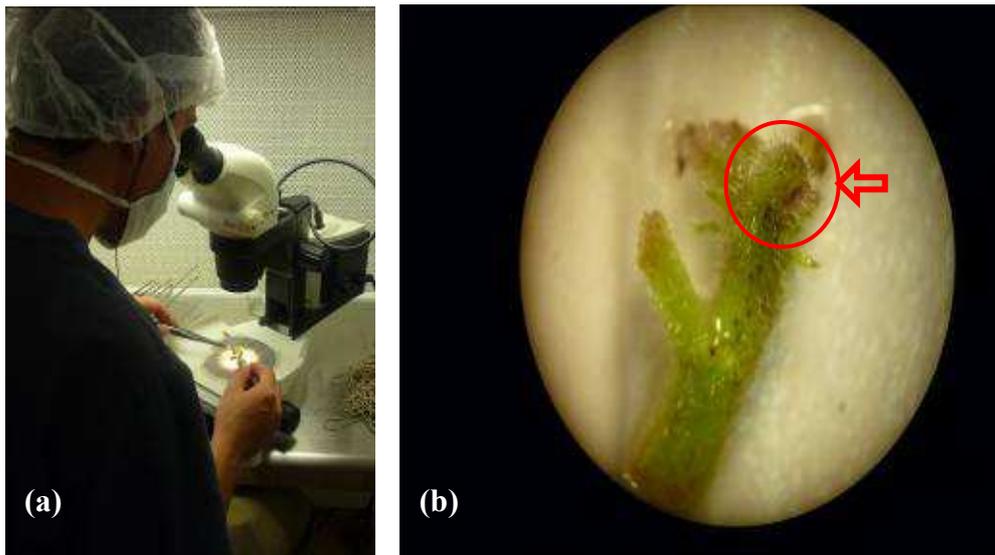


Figura 2.2- Protocolo de desinfección. (a)Yemas apicales. (b)Lavado en agua corriente. (c) Lavado en agua estéril. (d) combinación de fungicidas. (e) Alcohol. (f) Cloro.

En el procedimiento de siembra; Figura 2.3, se realizó utilizando un estereomicroscopio dentro de la cámara de flujo laminar para poder eliminar mecánicamente la mayor cantidad de tricomas que posee la planta; por ser considerados fuente de retención de cepas de bacterias y esporas de hongos, posibles fuentes de la contaminación persistente que presenta la especie en condiciones *in vitro*. Este procedimiento también con el objetivo de no maltratar el material vegetal y dejar intacto el tejido meristemático.



**Figura 2.3- (a) Procedimiento mecánico para la eliminación de tricomas.
(b) yema apical de Balsa, se distingue presencia de tricomas**

Los parámetros a medir en esta etapa fueron número de yemas contaminadas, muertas (necrosadas) o vivas. En la tabla 2.2 y 2.3 se detallan los tratamientos de desinfección utilizados.

Tabla 2.2. Tratamientos aplicados para la desinfección de yemas (cloro)

Tratamiento	Concentración de cloro %	Tiempo de Inmersión (min)
1	0,5	40
2	1,0	30
3	1,5	20
4	2,5	10

**Tabla 2.3. Tratamientos aplicados para la desinfección de yemas
(fungicidas)**

Tratamiento	Concentración de fungicida %	Tiempo de Inmersión (min)
5	Captan 0,1	15
6	Cobre Nordox 0,1	15
7	Amistar 0,1	15
8	Amistar 0,3	15
9	Captan 0,1+Cobre Nordox 0,1	15
10	Amistar 0,1+Captan 0,1	15
11	Amistar 0,1+Cobre Nordox 0,1	15
12	Amistar 0,3+Captan 0,1	15
13	Amistar 0,3+Cobre Nordox 0,1	15
14	Amistar 0,3+Cobre Nordox 0,1+Captan 0,1	15

Se realizó 6 repeticiones por cada tratamiento, siendo la unidad experimental un frasco con una yema (el explante), las cuales se incubaron a temperatura 25°C y humedad relativa de 45% y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. Las variables de respuesta evaluadas fueron:

Contaminación.- Mediante observación se determinó la presencia de colonias bacterianas o fúngicas y se cuantificó el número de explantes contaminados (Figura 2.4).

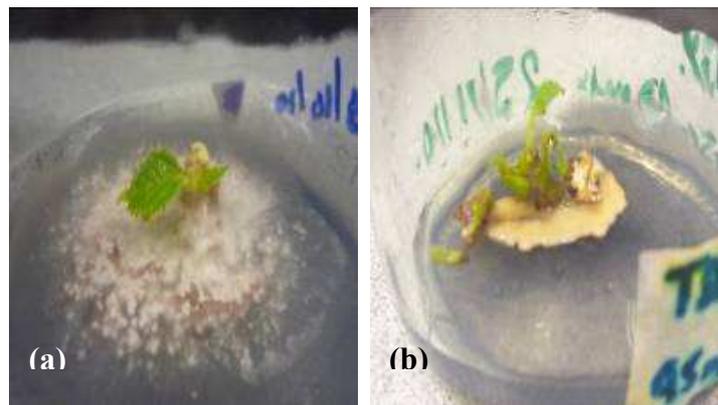


Figura 2.4- (a) explante con contaminación fúngica, (b) explante con contaminación bacteriana

Necrosis.- Mediante la observación se determinó si un explante presentó necrosis, es decir coloración negruzca del tejido que anula la viabilidad y crecimiento del explante y se enumeró cada frasco (Figura 2.5).

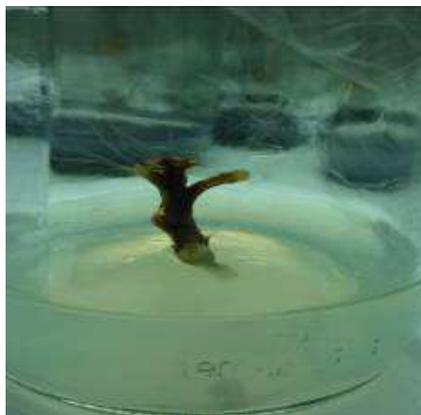


Figura 2.5- Yema de Balsa necrosada

Vivo.- Mediante la observación se determinó si un explante está vivo es decir una coloración verde del tejido que favorece la viabilidad y crecimiento del explante y se contabilizaron los frascos (Figura 2.6).



Figura 2.6- Yema de Balsa viva

La evaluación se realizó al cabo de un mes para el análisis estadístico y exploratorio de datos con gráfico. Se desarrollo un análisis inferencial mediante análisis de varianza ADEVA utilizando la prueba de LSD Fisher.

2.4 Inducción de brotes

Ya establecido el mejor tratamiento de desinfección se continuó con la siguiente etapa del proceso *in vitro*, en la cual se indujo la formación de brotes capaces de regenerar plantas completas (Roca W, Mroginski L, 1993).

En esta etapa se introdujeron yemas apicales de *Ochroma lagopus* de un tamaño promedio de tres a cuatro centímetros, previamente sometidas al que resultó ser el mejor tratamiento de desinfección.

2.4.1 Medios de cultivo para la inducción de brotes

El medio de cultivo que se utilizó para esta etapa fue el de Murashige y Skoog (M&S) enriquecido con 25 gL⁻¹ de sacarosa y 6.5 gL⁻¹ de agar, se trabajó a pH 5,7 - 5,8; suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de (0,1-0,2-0,3-0,4-0,5 mgL⁻¹).

Los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave durante 30 minutos a 121°C de temperatura y 15 psi de presión y posterior a la siembra se incubaron a 25 ± 2 °C de temperatura, 40 – 50 % de humedad relativa 725 – 750 luxes y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Para esta etapa se planteó un diseño completamente al azar (DCA) en el que se probaron 5 tratamientos (Tabla 2.2) con 8 repeticiones cada uno, teniendo como unidad experimental a una yema inoculada en un frasco con medio de cultivo.

Tabla 2.4 Tratamientos para inducción de brotes

Tratamiento	BAP mg/L
1	0,1
2	0,2
3	0,3
4	0,4
5	0,5

En esta etapa se evaluaron como variables:

Aparecimiento de brotes.- Se observó y se contabilizó el aparecimiento de brote generado por el explante introducido. (Figura 2.7).



Figura 2.7- Yema apical de balsa con aparecimiento de brote

Aparecimiento de callo.- Se observó y se contabilizó el aparecimiento de callo generado por el explante introducido. (Figura 2.8).



Figura 2.8- Yema apical de balsa con aparecimiento de callo

La evaluación se realizó al cabo de un mes y para el análisis estadístico exploratorio de datos con gráficos y un análisis inferencial realizando análisis de varianza ADEVA utilizando la prueba de LSD Fisher.

2.5 Fase de multiplicación

Los explantes con brotes que resultaren de la etapa de inducción, serán utilizados en esta fase de multiplicación; la evaluación se realizará variando la concentración de reguladores de crecimiento (citoquininas y auxinas) en el medio de cultivo para determinar las concentraciones óptimas para la multiplicación.

Los tratamientos incluirán concentraciones de: 6-bencilaminopurina (BAP) (0,2 a 2,0 mg /L) o thidiazuron (0,2 a 2,0 mg /L) con (0,1 y 0,2 mg/L) de ácido α naftalen acético (ANA) arreglados en 9 tratamientos más un testigo; con esto se espera obtener una múltiple aparición de brotes

Tabla 2.5.- Tratamientos para la etapa de multiplicación (BAP vs.ANA)

Tratamiento	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)
T0	0	0
T1	0,2	0
T2	1,0	0
T3	2,0	0
T4	0,2	0,1
T5	1,0	0,1
T6	2,0	0,1
T7	0,2	0,2
T8	1,0	0,2
T9	2,0	0,2

Tabla 2. 6.- Tratamientos para la etapa de multiplicación (TDZ vs. ANA)

Tratamiento	TDZ (mg/L)	ANA (mg/L)
T0	0	0
T1	0,2	0
T2	1,0	0
T3	2,0	0
T4	0,2	0,1
T5	1,0	0,1
T6	2,0	0,1
T7	0,2	0,2
T8	1,0	0,2
T9	2,0	0,2

Se realizó 5 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental se define como un frasco con un brote inducido en yema y las variables que se evaluaron se describen a continuación.

Número de brotes.- se contó los brotes que contenga cada explante. (Figura 2.9)

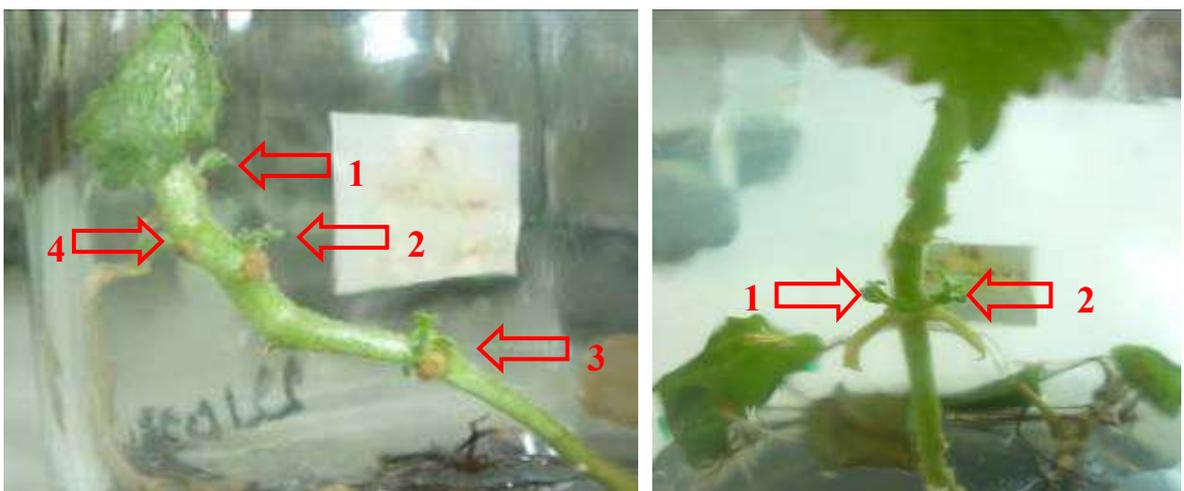


Figura 2.9.- Conteo número de brotes que contiene cada explante.

Longitud de los brotes.- se midió la longitud de los brotes (mm) obtenidos en esta fase con la ayuda de un calibrador. (Figura 2.10).



Figura 2.10.- Medición de longitud (mm) de explantes utilizando un calibrador.

La evaluación se realizó al cabo de un mes para el análisis estadístico y exploratorio de datos con gráficos y también se desarrollo un análisis inferencial mediante tablas de contingencia.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Etapa de desinfección

Durante la etapa de desinfección se evaluó contaminación, necrosis y explantes vivos de yemas apicales de balsa, *Ochroma lagopus* introducidas, utilizando tratamientos con hipoclorito de sodio y fungicidas en distintas concentraciones y tiempos de inmersión.

3.1.1 Tratamiento de desinfección: hipoclorito de sodio

3.1.1.1 Contaminación

Análisis exploratorio de datos

Los tratamientos de desinfección planteados al usar hipoclorito de sodio fueron: tiempos de inmersión 40 – 30 – 20 - 10 min. y concentraciones de: 0.5% - 1.0% - 1.5% - 2.5%; correspondidos respectivamente.

Tabla 3.1.1- Tratamientos de desinfección utilizando hipoclorito de sodio

Tratamiento	Concentración de cloro %	Tiempo de Inmersión (min)
1	0,5	40
2	1,0	30
3	1,5	20
4	2,5	10

La concentración 0,5 % - 40 min (tratamiento uno) de hipoclorito de sodio permite una buena descontaminación del material vegetal, pero a medida que aumenta la concentración de hipoclorito de sodio hasta; 2,5% - 10 min (tratamiento cuatro) se obtuvo incremento de la descontaminación, la concentración de 1,0 % - 30 min (tratamiento dos) muestra un similar nivel de contaminación al compararlo con el tratamiento uno. Pero al comparar los tratamientos uno, dos y cuatro con el tratamiento tres, la contaminación que mostró fue superior; ver anexo 1. El tiempo de inmersión de los explantes en las soluciones de hipoclorito de sodio tiene que ver con la contaminación; a medida que aumenta el tiempo de inmersión disminuye la contaminación; en este caso a excepción del tratamiento tres; ver Figura 3.1.1.

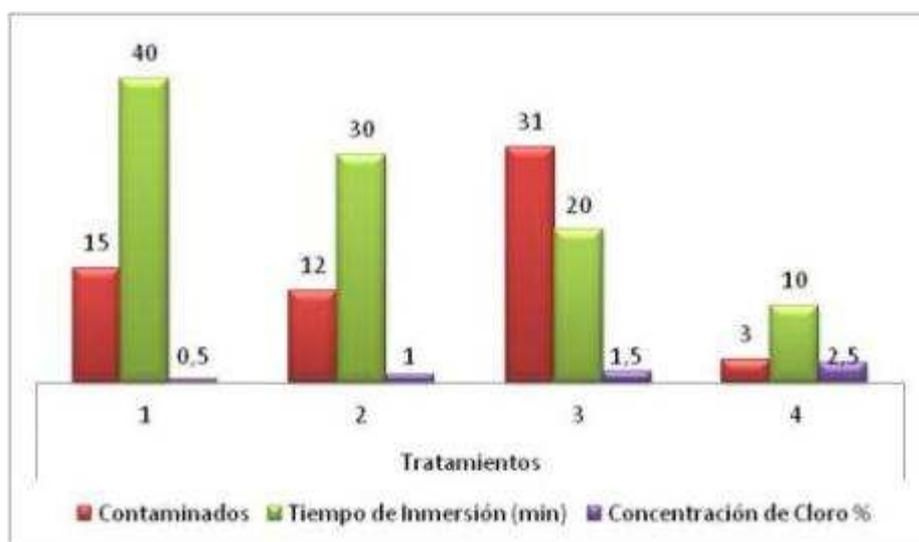


Figura 3.1.1- Relación entre: explantes contaminados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio y sus tiempos de inmersión.

Análisis inferencial

Para la comparación de las medias para el nivel de contaminación, respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión aplicada en el protocolo de desinfección, se seleccionó el método de comparaciones múltiples propuesto por LSD Fisher, ver anexo estadístico, aplicando este análisis se observó diferencias estadísticamente significativas, obteniendo como resultado un valor de p inferior al 5%, representado en el cuadro de análisis de varianza; ver Tabla 3.1.2, el cual se indica que existe una dependencia entre estas tres variables y demostrar que existe diferencia entre los tratamientos, en la que se obtuvo un valor- p <0,0001.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre: 0.5% - 40 min y 1.0% - 30min (tratamientos uno y dos) respectivamente, es decir; se encuentran dentro de un mismo grupo estadístico letra B, ver Tabla 3.1.2. El gráfico de densidad de puntos, revela una mayor densidad en el tratamiento tres; ver Figura 3.1.2, hay diferencias estadísticamente significativas entre: las concentraciones 1.5% - 20min y 2.5% - 40 min (tratamientos tres y cuatro), respectivamente y estos tratamientos al compararlos con los (tratamientos uno y dos) forman parte de otro grupo estadístico, grupo estadístico letra A; tratamiento cuatro y grupo estadístico letra C (tratamiento tres), ver Tabla 3.1.2.

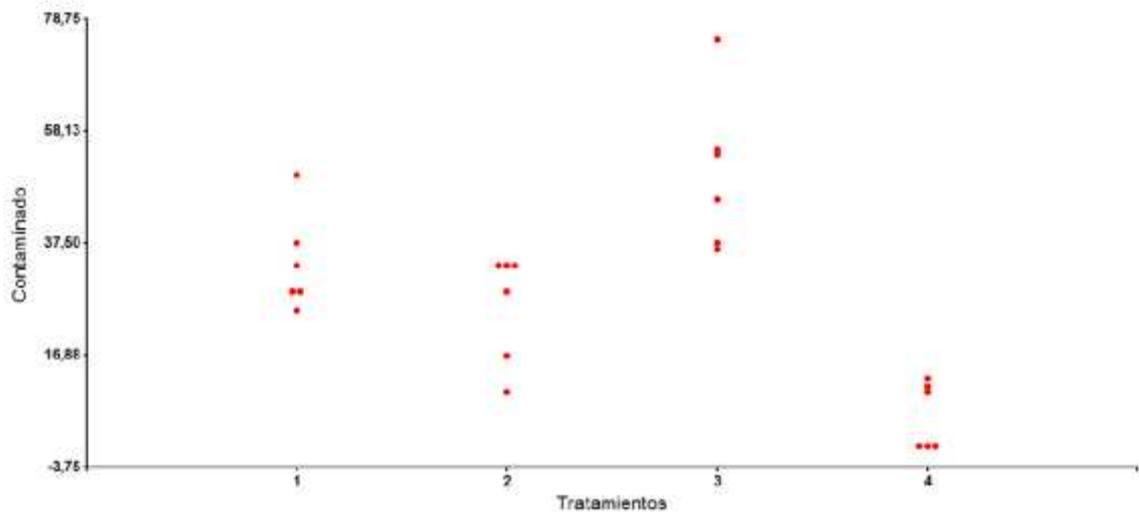


Figura 3.1.2- Gráfico de densidad de puntos, para la contaminación en los tratamientos de desinfección con las concentraciones de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión.

Tabla 3.1.2- Tabla de comparación de Fisher para la contaminación con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Contaminado	24	0,75	0,71	35,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6244,44	3	2081,48	19,52	<0,0001
Tratamiento	6244,44	3	2081,48	19,52	<0,0001
Error	2132,95	20	106,65		
Total	8377,39	23			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=12,43715

Error: 106,6473 gl: 20

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
4	5,60	6	4,22	A
2	25,87	6	4,22	B
1	33,83	6	4,22	B
3	50,45	6	4,22	C

3.1.1.2 Necrosis

Análisis exploratorio de datos

En los tratamientos de desinfección en los que se utilizó las concentraciones de cloro y sus respectivos tiempos de inmersión, establecieron como el mejor tratamiento para evitar el necrosamiento de los explantes al tratamiento uno; ver Figura 3.1.3.

Al contrario de la contaminación en donde se observó que el tratamiento cuatro (2.5% - 10 min) mostró el más bajo nivel de contaminación; en este caso muestra el mayor número de explantes necrosados. Por esto el tiempo de inmersión en el tratamiento cuatro es muy corto comparado con el tiempo de inmersión del tratamiento uno adicional a una alta concentración de hipoclorito de sodio de 2.5%, que resultó determinante para el alto nivel de necrosis; ver Figura 3.1.3.

El tratamiento uno: 0,5% - 40 min, muestra el nivel más bajo en cuanto al número de explantes necrosados, por ello la concentración de hipoclorito de sodio utilizada en este tratamiento, es la adecuada para obtener la frecuencia de necrosis deseada; ver Figura 3.1.3.

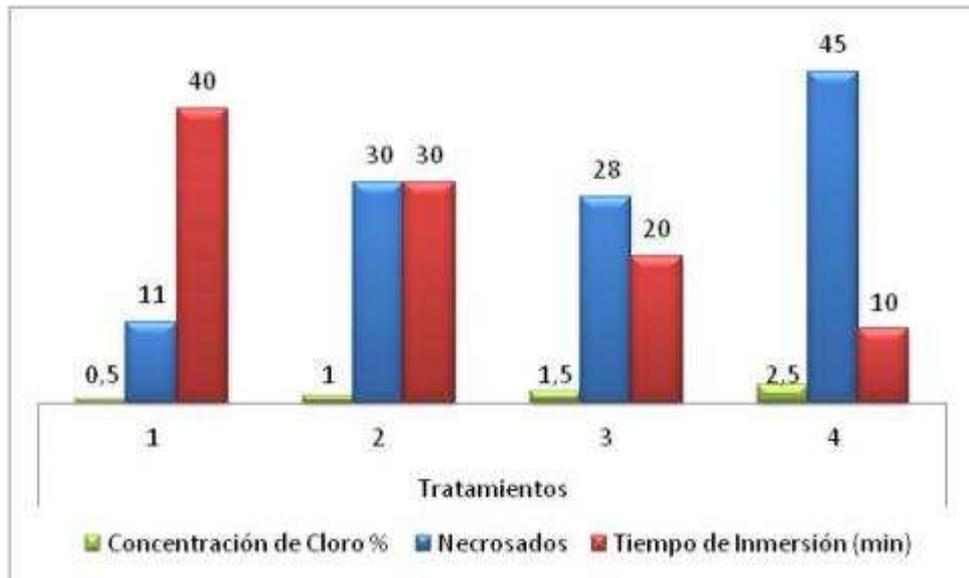


Figura 3.1.3- Relación entre: explantes necrosados respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio y sus tiempos de inmersión.

Análisis inferencial

Para realizar este análisis se seleccionó el método de comparaciones múltiples propuesto por LSD Fisher; ver anexo estadístico, se observó diferencias estadísticamente significativas, obteniendo como resultado un valor de p inferior al 5%, representado en el cuadro de análisis de varianza; ver Tabla 3.1.3, el cual se indica que existe una dependencia entre estas tres variables y demostrar que existe diferencia entre los tratamientos, en la que se obtuvo un valor $p < 0,0001$.

Los tratamientos dos, tres y cuatro (1.0% - 30 min; 1.5% - 20 min; 2.5% - 10 min), exhiben una elevada necrosis al compararla con el tratamiento uno, y a medida que aumenta la concentración de hipoclorito de sodio aumenta el nivel de necrosis; ver anexo 2.

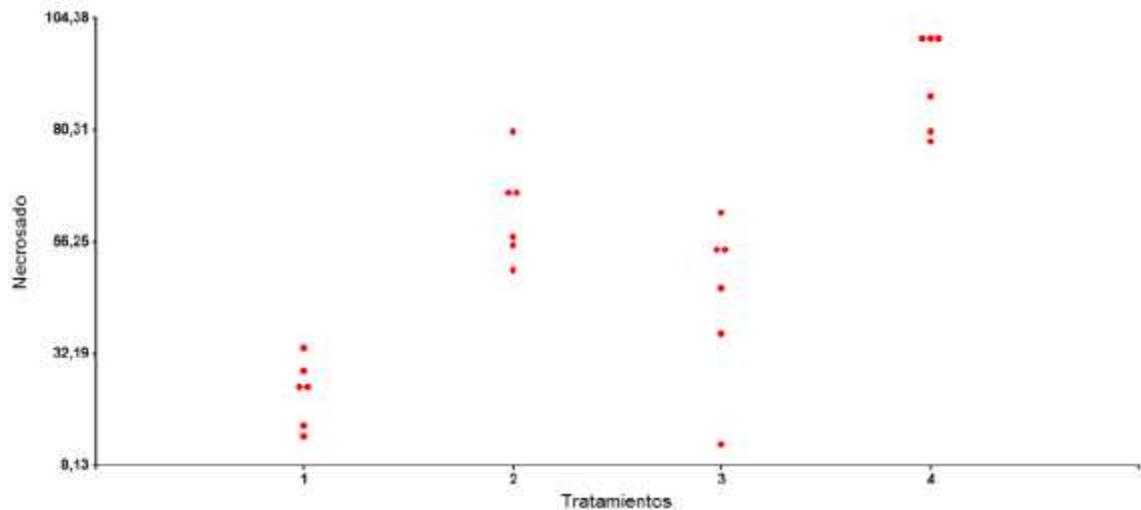


Figura 3.1.4- Gráfico densidad de puntos para la necrosis en los tratamientos de desinfección con las concentraciones de hipoclorito de sodio.

En el análisis de Fisher se comparó las medias de los tratamientos para el necrosamiento y se obtuvo un ordenamiento de las mismas de menor a mayor colocando como al tratamiento con la menor mediana al número uno, y la que mostraba la mayor mediana al número cuatro, lo cual fue corroborado con el gráfico de densidad de puntos; ver Figura 3.1.4 y Tabla 3.1.3. Todos los tratamientos para la necrosis son diferentes por que se encuentran en diferentes grupos estadísticos: tratamiento uno – letra A, tratamiento dos – letra B, tratamiento tres – letra C, tratamiento cuatro – letra D.

Tabla 3.1.3- Tabla de comparación de Fisher para la necrosis con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Necrosado	24	0,83	0,80	22,09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	14579,29	3	4859,76	32,38	<0,0001
Tratamiento	14579,29	3	4859,76	32,38	<0,0001
Error	3001,61	20	150,08		
Total	17580,90	23			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=14,75395

Error: 150,0807 gl: 20

Tratamiento Medias n E.E.

1	23,81	6	5,00	A
3	44,44	6	5,00	B
2	62,67	6	5,00	C
4	90,88	6	5,00	D

3.1.1.3 Supervivencia

Análisis exploratorio de datos

El tratamiento uno (0.5% - 40 min), resultó el mejor tratamiento de los planteados, evidenciando una mejor supervivencia comparado con la necrosis que mostró cada tratamiento; ver Figura 3.1.5, y también resulta el mejor tratamiento cuando se compara el resultado de supervivencia con el de contaminación; ver anexo 4, tomando en cuenta que el número de explantes vivos y muertos es ampliamente diferente; ver anexo 5, pero comparado con los demás tratamientos en cuanto a explantes vivos es el más representativo; ver anexo 3. En la Figura 3.1.5 se muestran la relación de los tiempos de inmersión, concentraciones de hipoclorito de sodio y explantes vivos, se observa que al utilizar una concentración baja de hipoclorito de sodio combinada con un tiempo de inmersión elevado, es más viable en cuanto a

magnificar la supervivencia de los explantes. Y también se muestra el caso contrario en la que se utilizó un corto tiempo de inmersión y la concentración de cloro más elevada propuesta para estos tratamientos de desinfección (2.5% - 10 min) en donde se demuestra la poca viabilidad del tratamiento. En el anexo 6, se observa la comparación de estas tres variables: contaminación, necrosis y supervivencia.

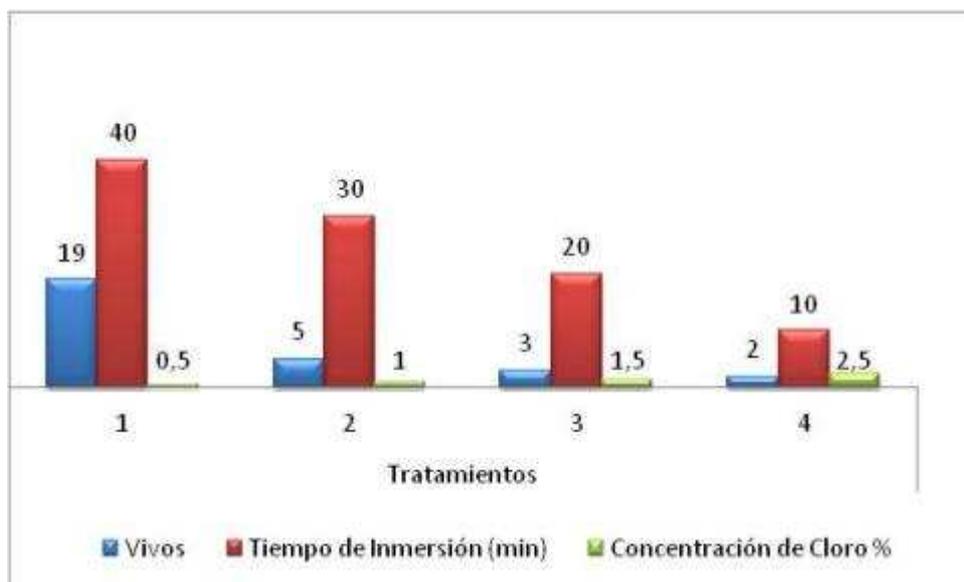


Figura 3.1.5- Relación entre: explantes vivos, concentraciones de cloro, tiempos de inmersión en los tratamientos de hipoclorito de sodio.

Análisis inferencial

Para este análisis se realizó la prueba de LSD Fisher, ver anexo estadístico, para la supervivencia existe una diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento uno y los tratamientos dos, tres, cuatro. El valor de p fue inferior al 5% fue de $p < 0.0001$; ver Tabla 3.1.4.

Los tratamientos dos, tres, cuatro; forman parte de un solo grupo estadístico, grupo letra A; a diferencia del tratamiento uno que representa un solo grupo estadístico letra B como se observa en la Tabla 3.1.4. Además los tratamientos dos, tres, cuatro evidencian un nivel bajo de supervivencia en

Tabla 3.1.4- Tabla de comparación de Fisher para la supervivencia con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión

Variable	N	R ^s	R ^s Aj	CV
Vivo	24	0,86	0,84	44,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5935,21	3	1978,40	40,65	<0,0001
Tratamiento	5935,21	3	1978,40	40,65	<0,0001
Error	973,44	20	48,67		
Total	6908,65	23			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=8,40206

Error: 48,6721 gl: 20

Tratamiento	Medias	n	E.E.
4	3,52	6	2,85 A
3	5,11	6	2,85 A
2	11,46	6	2,85 A
1	42,36	6	2,85 B

3.1.2 Tratamiento de desinfección: fungicidas

Realizada la primera etapa de la desinfección aplicando los tratamientos de desinfección con las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión se obtuvo como al mejor tratamiento al número uno (0.5% NaClO - 40 min), por mostrar la media más alta en cuanto a supervivencia y más baja en lo que se refiere a necrosis.

Como la contaminación no alcanzó un promedio aceptable, para eliminarla se combinó al mejor tratamiento de hipoclorito de sodio; (Tratamiento uno: 0.5% NaClO - 40 min) con fungicidas para disminuir la media en cuanto al número de explantes contaminados, manteniendo constante el tiempo de exposición al fungicida; 15 min. Los tratamientos con fungicida se designaron a continuación del último tratamiento de desinfección tratamiento cuatro (2.5% - 10 min) en donde se utilizó solamente hipoclorito de sodio, comenzando desde

el tratamiento cinco (captan 0.1%) hasta el tratamiento catorce (Amistar 0.3% - Cobre Nordox 0.1% – Captan 0.1%); ver Tabla 3.1.5.

Tabla 3.1.5- Tratamientos de desinfección utilizando 0,5% de hipoclorito de sodio 40 min (tratamiento uno) mas fungicidas.

Tratamiento	Concentración de fungicida %	Tiempo de Inmersión (min)
5	Captan 0,1	15
6	Cobre Nordox 0,1	15
7	Amistar 0,1	15
8	Amistar 0,3	15
9	Captan 0,1+Cobre Nordox 0,1	15
10	Amistar 0,1+Captan 0,1	15
11	Amistar 0,1+Cobre Nordox 0,1	15
12	Amistar 0,3+Captan 0,1	15
13	Amistar 0,3+Cobre Nordox 0,1	15
14	Amistar 0,3+Cobre Nordox 0,1+Captan 0,1	15

3.1.2.1 Contaminación

Análisis exploratorio de datos

La concentración (0,5 % - 40 min) de hipoclorito de sodio combinado con: Amistar 0,3% - Cobre Nordox 0,1% - Captan 0,1% (Tratamiento catorce) permite una buena descontaminación, en este caso la concentración (0,5% - 40 min) de hipoclorito de sodio combinado con: Amistar 0,1% - Cobre Nordox 0,1% (Tratamiento once) muestra el nivel más alto de contaminación al compararlo con el resto de tratamientos; ver Figura 3.1.7. El tiempo de inmersión en las soluciones que tienen hipoclorito de sodio (0,5% - 40 min) combinado con los fungicidas no es relevante porque se planteó un tiempo constante, ver Tabla 3.1.5.

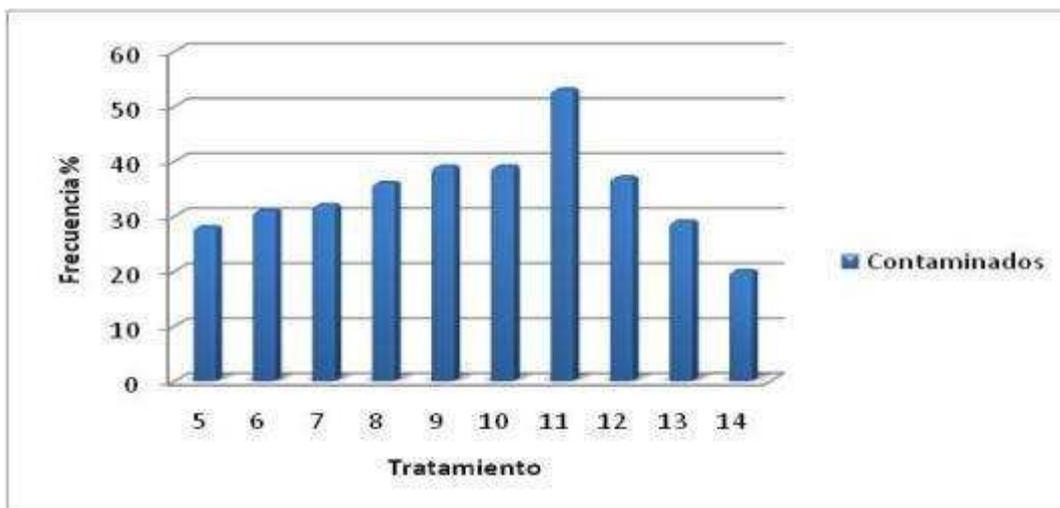


Figura 3.1.7- Explantes contaminados en los tratamientos de fungicida más hipoclorito de sodio 0.5% - 40min.

Análisis inferencial

Para analizar la relación de dependencia o independencia entre la contaminación, la concentración de hipoclorito de sodio 0,5% - 40 min. combinada con la concentración de fungicida y la mejor combinación de fungicidas, en esta etapa de desinfección, se seleccionó el método de comparaciones múltiples propuesto por LSD Fisher; ver anexo estadístico, se realizó una tabla de comparación en la cual se observó diferencias estadísticamente significativas con resultados inferiores al 5%, representado en el cuadro de análisis de varianza; ver Tabla 3.1.6, el cual indica que existe una dependencia entre estas variables y demostrar que existe diferencia entre los tratamientos, en la que se obtuvo un valor p bajo $<0,0001$.

De los 10 tratamientos con fungicida: tratamiento cinco (Captan 0.1% - 15 min), tratamiento seis (Cobre Nordox 0,1% - 15 min), tratamiento siete (Amistar 0.1% - 15 min), tratamiento ocho (Amistar 0.3% - 15 min), tratamiento nueve (Captan 0.1% - Cobre Nordox 0.1% - 15 min), tratamiento diez (Amistar 0.1% - Captan 0.1% - 15 min), tratamiento once (Amistar 0.1% - Cobre Nordox 0.1% - 15 min), tratamiento doce (Amistar 0.3% - Captan 0.1% - 15 min),

tratamiento trece (Amistar 0.3% - Cobre Nordox 0.1% - 15min), tratamiento catorce (Amistar 0.3% - Captan 0.1% - Cobre Nordox 0.1% -15 min). Los tratamiento once y catorce pertenecen a grupos estadísticos diferentes letra E y letra A, respectivamente; por lo que podemos decir que muestran diferencias estadísticamente significativas entre los dos y con el resto de tratamientos aplicados, el tratamiento catorce mostró la media más baja y la menor media de contaminación; ver Tabla 3.1.6 y el tratamiento once la media más alta y la mayor frecuencia; en cuanto a contaminación lo cual también se puede observar en el gráfico de densidad de puntos; Figura 3.1.8. Los tratamientos cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, doce, trece, comparten grupos estadísticos similares: letra B, letra C, letra D; es decir, estos tratamientos no muestran diferencia estadística significativa.

Tabla 3.1.6- Tabla de comparación de Fisher para la contaminación con respecto a concentración de hipoclorito de sodio 0,5% - 40 min combinado con fungicidas.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Contaminado	60	0,67	0,62	19,87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12204,94	9	1356,10	11,50	<0,0001
Tratamiento	12204,94	9	1356,10	11,50	<0,0001
Error	5894,89	50	117,90		
Total	18099,83	59			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=12,59147

Error: 117,8977 gl: 50

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
14	28,12	6	4,43	A
13	43,77	6	4,43	B
12	47,62	6	4,43	B C
5	50,74	6	4,43	B C
7	51,39	6	4,43	B C
6	54,69	6	4,43	B C D
9	59,07	6	4,43	C D
8	60,00	6	4,43	C D
10	65,00	6	4,43	D
11	85,98	6	4,43	E

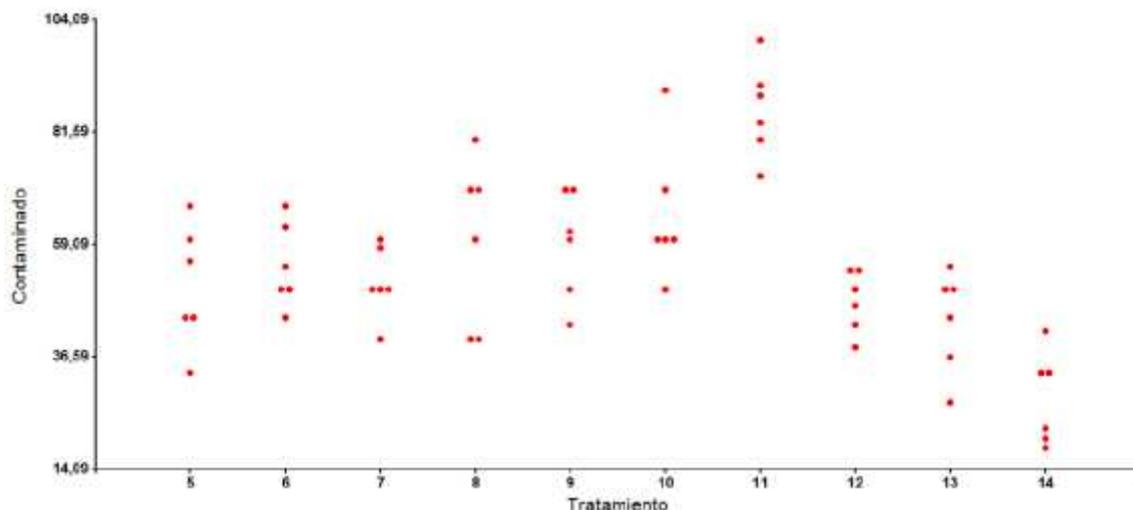


Figura 3.1.8- Gráfico de densidad de puntos para la contaminación usando la concentración de hipoclorito de sodio: 0.5% - 40 min y las concentraciones empleadas de fungicida.

3.1.2.2 Necrosis

Análisis exploratorio de datos

La concentración (0,5 % - 40 min) de hipoclorito de sodio combinado con: tratamiento once (Amistar 0.1% - Cobre Nordox 0.1% - 15 min), resulta en el más bajo nivel de necrosis, en este caso la concentración (0,5% - 40 min) de hipoclorito de sodio combinado con: tratamiento doce (Amistar 0.3% - Captan 0.1% - 15 min), muestra el nivel más alto de necrosis al compararlo con el resto de tratamientos; ver Figura 3.1.9. El tiempo de inmersión en las soluciones que tienen hipoclorito de sodio (0,5% - 40 min) combinado con los fungicidas no es relevante porque se planteó un tiempo constante; ver Tabla 3.1.5.

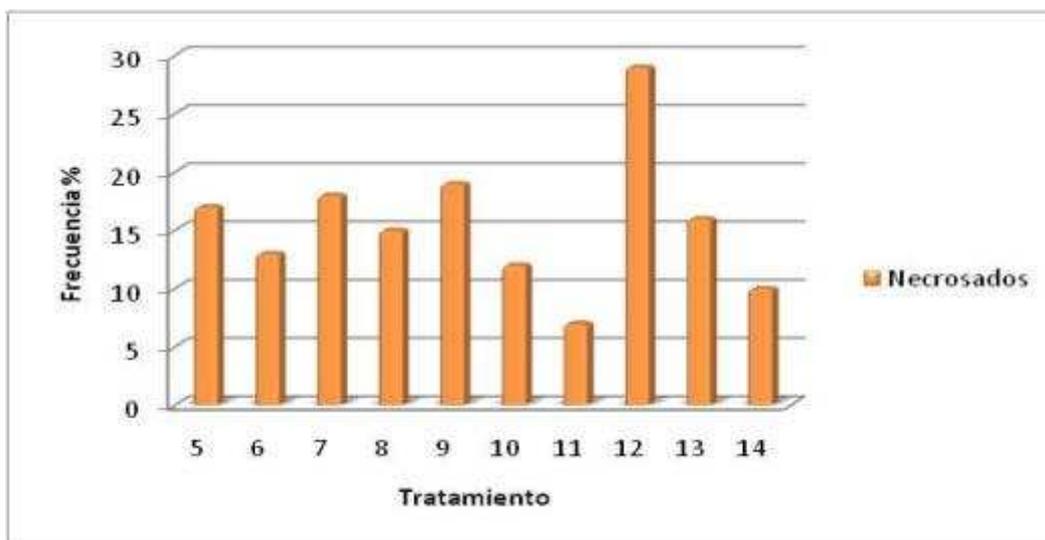


Figura 3.1.9- Explantes necrosados en los tratamientos de fungicida más hipoclorito de sodio 0.5% - 40min: tratamiento.

Análisis inferencial

Para analizar la relación de dependencia o independencia entre la necrosis, la concentración de hipoclorito de sodio 0,5% - 40 min. combinada con la concentración de fungicida y la mejor combinación de fungicidas, en el protocolo de desinfección, se seleccionó el método de comparaciones múltiples propuesto por LSD Fisher; ver anexo estadístico, se realizó una tabla de comparaciones en la cual se observó diferencias estadísticamente significativas con resultados inferiores al 5%, representado en el cuadro de análisis de varianza; ver Tabla 3.1.7, el cual indica que existe una dependencia entre estas variables y demostrar que existe diferencia entre los tratamientos, en la que se obtuvo un valor $p < 0,0001$.

El tratamiento once presenta la media y la frecuencia más bajas en cuanto a necrosis; ver Figura 3.1.9 y Tabla 3.1.7. Y este forma parte de un grupo estadístico letra A; en el cual se encuentran también el tratamiento catorce y el tratamiento diez, es decir, tiene un valor de $p < 0.05$, por lo tanto existe diferencia estadística cuando comparamos estos tratamientos con los demás. El tratamiento doce, cinco y siete forma parte de otro grupo estadístico letra E y presentan como resultado la media más alta en cuanto a la necrosis;

ver Tabla 3.1.7 y además se confirma con el gráfico de densidad de puntos; ver Figura 3.1.10.

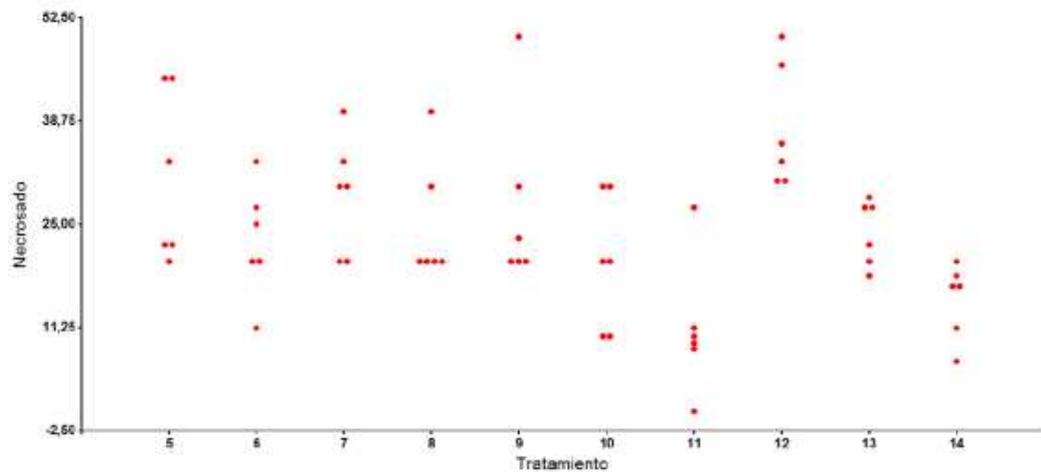


Figura 3.1.10- Gráfico de densidad de puntos para la necrosis usando la concentración de hipoclorito de sodio: 0.5% - 40 min y las concentraciones empleadas de fungicida.

Los dos únicos tratamientos que destacan y están solo dentro de un grupo estadístico solo los tratamientos once que está dentro del grupo estadístico letra A, el tratamiento doce que está dentro del grupo estadístico letra E, es decir se encuentran separados y por ello existe una diferencia estadística significativa al compararlos entre sí por esto el tratamiento 11 es el más adecuado para evitar necrosis.

Tabla 3.1.7- Tabla de comparación de Fisher para la necrosis con respecto a concentración de hipoclorito de sodio 0,5% - 40 min, combinado con la concentración de fungicidas.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Necrosado	60	0,47	0,38	35,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3272,91	9	363,66	4,99	0,0001
Tratamiento	3272,91	9	363,66	4,99	0,0001
Error	3643,33	50	72,87		
Total	6916,24	59			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=9,89893

Error: 72,8667 gl: 50

Tratamiento	Medias	n	E.E.				
11	10,97	6	3,48	A			
14	14,88	6	3,48	A	B		
10	20,00	6	3,48	A	B	C	
6	22,79	6	3,48		B	C	D
13	23,92	6	3,48		B	C	D
8	25,00	6	3,48			C	D
9	27,18	6	3,48			C	D
7	28,89	6	3,48			C	D E
5	31,11	6	3,48				D E
12	37,79	6	3,48				E

3.1.2.3 Supervivencia

Análisis exploratorio de datos

La concentración (0,5 % - 40 min) de hipoclorito de sodio combinado con: tratamiento once (Amistar 0.1% - Cobre Nordox 0.1% - 15 min), resulta en el más bajo nivel de supervivencia, en este caso la concentración (0,5% - 40 min) de hipoclorito de sodio combinado con: el tratamiento catorce (Amistar 0.3% - Captan 0.1% - Cobre Nordox 0.1% -15 min), muestra el nivel más alto de supervivencia al compararlo con el resto de tratamientos; ver Figura 3.1.11. El tiempo de inmersión en las soluciones que tienen hipoclorito de sodio (0,5% - 40 min) combinado con los fungicidas no es relevante porque se planteó un tiempo constante; ver Tabla 3.1.5.

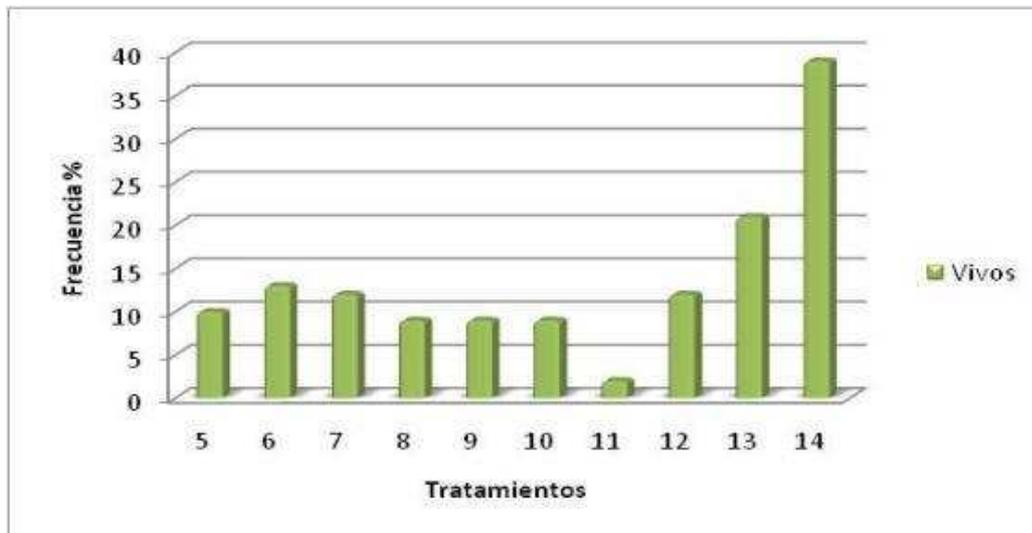


Figura 3.1.11- Frecuencia de explantes vivos en los tratamientos de fungicida más hipoclorito de sodio 0.5% - 40 min.

Análisis inferencial

Para analizar la relación de dependencia o independencia entre la supervivencia, la concentración de hipoclorito de sodio (0,5% - 40min) en combinación con la concentración de fungicida y la mejor combinación de fungicidas, en el protocolo de desinfección, se seleccionó el método de comparaciones múltiples propuesto LSD Fisher; ver anexo estadístico, se realizó una tabla de comparaciones en la cual se observó diferencias estadísticamente significativas con resultados inferiores al 5%, representado en el cuadro de análisis de varianza; ver Tabla 3.1.8, el cual indica que existe una dependencia entre estas variables y demostrar que existe diferencia entre los tratamientos, en la que se obtuvo un valor $p < 0,0001$.

El tratamiento once presenta la media más baja en cuanto a supervivencia resultado similar a la necrosis, lo cual es confirmado con el gráfico de densidad de puntos; ver Figura 3.1.12. Y esta forma parte de un solo grupo estadístico letra A; ver Tabla 3.1.8, es decir, tiene un valor de $p < 0.05$, por lo tanto existe diferencia estadística cuando comparamos este tratamiento con los demás.

El tratamiento catorce presenta la media más alta en cuanto a supervivencia; ver anexo 7. Y forma parte de un solo grupo estadístico letra D; ver Tabla 3.1.8, es decir, tiene un valor de $p < 0,05$ por esto existe diferencia estadística cuando comparamos este tratamiento con los demás.

El resto de tratamientos: cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, doce y trece; comparten dos grupos estadísticos: letra B y letra C, son similares entre sí por tener similares valores de sus medias; ver Tabla 3.1.8.

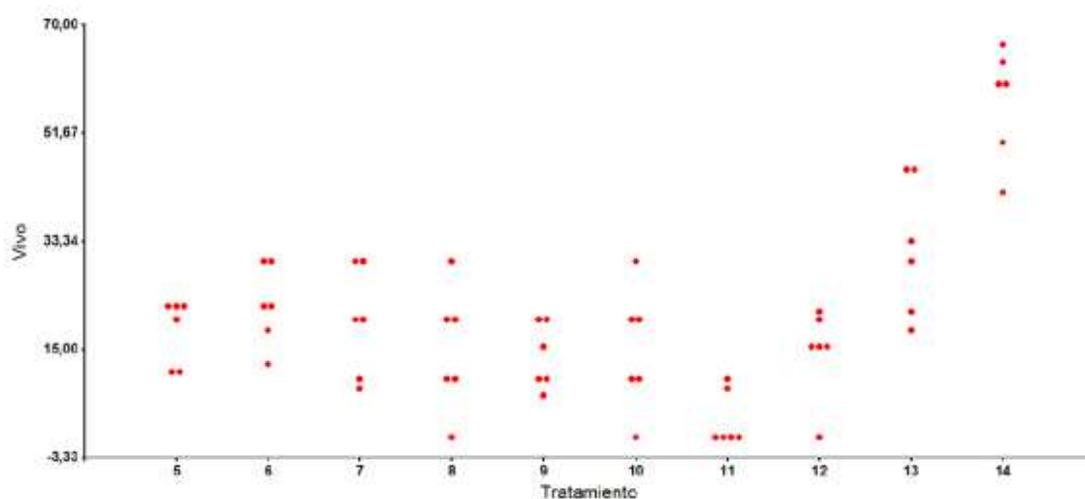


Figura 3.1.12- Gráfico de densidad de puntos para la supervivencia usando la concentración de hipoclorito de sodio: 0.5% - 40 min y las concentraciones empleadas de fungicida

Tabla 3.1.8- Tabla de comparación de Fisher para la supervivencia con respecto a la concentración de fungicida y combinaciones de fungicida con el mejor tratamiento de hipoclorito de sodio (0.5% - 40 min).

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vivo	60	0,76	0,72	40,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11538,77	9	1282,09	17,88	<0,0001
Tratamiento	11538,77	9	1282,09	17,88	<0,0001
Error	3585,40	50	71,71		
Total	15124,17	59			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=9,81991

Error: 71,7080 gl: 50

Tratamiento	Medias	n	E.E.
11	3,06	6	3,46 A
9	13,75	6	3,46 B
12	14,60	6	3,46 B
10	15,00	6	3,46 B
8	15,00	6	3,46 B
5	18,15	6	3,46 B
7	19,72	6	3,46 B
6	22,52	6	3,46 B C
13	32,31	6	3,46 C
14	57,00	6	3,46 D

El tratamiento catorce (Amistar 0.3% - Captan 0.1% - Cobre Nordox 0.1% -15 min) resultó el mejor tratamiento, por la combinación de fungicidas e hipoclorito de sodio al 0.5% durante 40 min, evidenciando una mejor supervivencia comparado con la necrosis que mostró cada tratamiento; ver anexo 8, y también resulta el mejor tratamiento cuando se compara el resultado de supervivencia con el de contaminación, tomando en cuenta que la frecuencia de explantes vivos y muertos es diferente, pero comparado con los demás tratamientos en cuanto a explantes vivos es el más representativo. En el anexo 9 se muestran las tres variables establecidas en estos tratamientos, se observa claramente que la contaminación tiene un crecimiento progresivo desde el tratamiento cinco hasta el tratamiento once, a partir de este comienza a decrecer la contaminación hasta llegar al tratamiento catorce, en el anexo 9, observamos el incremento de la viabilidad hasta llegar al tratamiento catorce. El comportamiento de la necrosis es alto al compararlo con la viabilidad desde el tratamiento cinco hasta el tratamiento doce, a partir de este la viabilidad es

mayor al compararlo con la necrosis específicamente los tratamientos trece y catorce.

Los tratamientos de desinfección en los que se utilizó concentraciones de hipoclorito de sodio: tratamiento uno (0.5% - 40 min), tratamiento dos (1.0% - 30 min), tratamiento tres (1.5% - 20 min), tratamiento cuatro (2.5% - 10 min). y en los tratamiento con fungicida mas hipoclorito de sodio 0.5% - 40 min: tratamiento cinco (Captan 0.1% - 15 min), tratamiento seis (Cobre Nordox 0,1% - 15 min), tratamiento siete (Amistar 0.1% - 15 min), tratamiento ocho (Amistar 0.3% - 15 min), tratamiento nueve (Captan 0.1% - Cobre Nordox 0.1% - 15 min), tratamiento diez (Amistar 0.1% - Captan 0.1% - 15 min), tratamiento once (Amistar 0.1% - Cobre Nordox 0.1% - 15 min), tratamiento doce (Amistar 0.3% - Captan 0.1% - 15 min), tratamiento trece (Amistar 0.3% - Cobre Nordox 0.1% - 15min), tratamiento catorce (Amistar 0.3% - Captan 0.1% - Cobre Nordox 0.1% -15, el tratamiento más eficiente en cuanto a disminuir la contaminación al referirnos a los que solo se utilizó hipoclorito de sodio, es el tratamiento cuatro y en la combinación de hipoclorito de sodio 0.5% - 40 min de inmersión más fungicidas fue el tratamiento catorce que complemento su efectividad con la combinación de fungicida; ver anexo 10, obteniendo así como el mejor tratamiento al tratamiento catorce.

Los resultados que se refieren a la necrosis al comparar los tratamientos en los que solo se utilizó hipoclorito de sodio y en los que se utilizó una concentración específica de hipoclorito de sodio más una combinación de fungicidas, dieron como resultado que al utilizar las concentraciones de hipoclorito de sodio la necrosis fue mayor que al aplicar la combinación de fungicidas más la solución específica de hipoclorito de sodio 0,5%.; ver anexo 11.

En cuanto se refiere a supervivencia es evidente que los mejores tratamientos son el tratamiento uno y el tratamiento catorce; la combinación de concentración de hipoclorito de sodio más la combinación de fungicidas resultó con una mejor frecuencia de supervivencia; ver anexo 12.

3.2 Etapa de inducción

Una vez que se cuenta con el material vegetal desinfectado se dio inicio a la etapa de establecimiento, en la cual el explante fue introducido en el medio de cultivo bajo condiciones de asepsia total, utilizando cabinas de flujo laminar que reduzcan al mínimo las posibilidades de contaminación del explante o del medio de cultivo. Luego de esto los frascos que contienen a los explantes son llevados a la sala de incubación donde permanecieron hasta presentar el apareamiento de callo o brote.

3.2.1 Apareamiento de callo

Análisis exploratorio de datos

En esta de inducción se utilizaron cinco tratamientos para la inducción de brotes a partir de yemas apicales de Balsa (*Ochroma lagopus*):

Tabla 3.2.1.-Tratamientos para inducción de brotes

Tratamiento	BAP mg/L
1	0,1
2	0,2
3	0,3
4	0,4
5	0,5

El tratamiento dos (BAP 0.2 mg/L); resultó el más adecuado para la inducción de callo a partir de yema apical de balsa, la formación de callo comienza a disminuir a medida que aumenta la concentración de hormona en este caso en presencia de la citoquinina BAP; ver Figura 3.2.1.

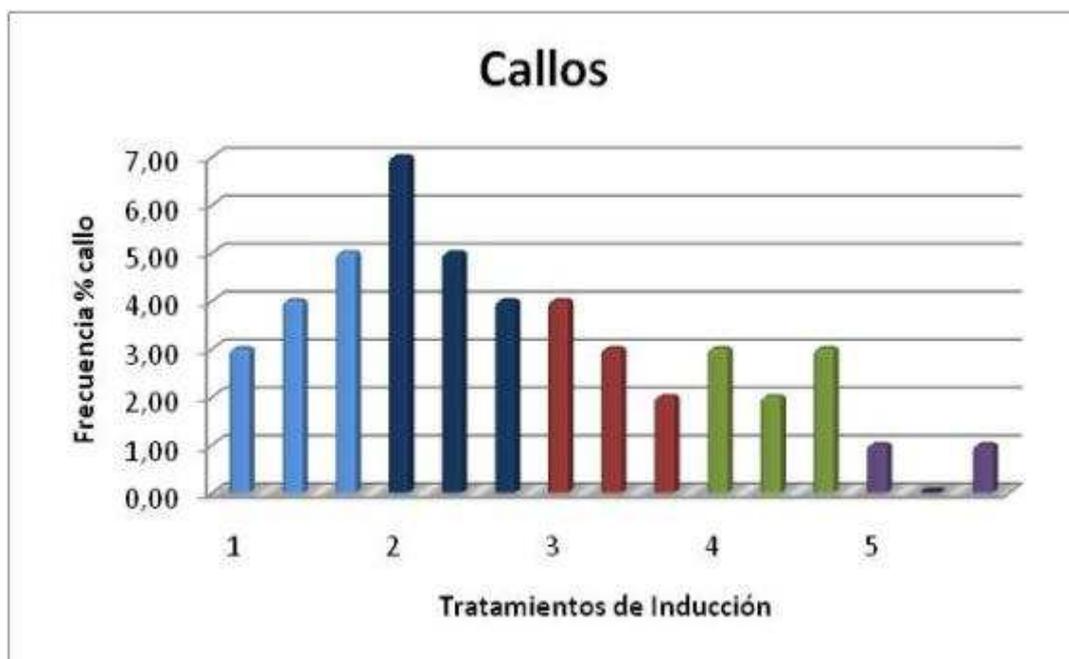


Figura 3.2.1 – Frecuencia en formación de callo en los tratamientos de inducción para yemas de *Ochroma lagopus*.

Análisis inferencial

Para analizar la relación de dependencia o independencia en la concentración de hormona BAP y el aparecimiento de callo, se seleccionó la prueba de LSD Fisher; ver anexo estadístico.

Para esto se realizó una tabla de comparaciones en la cual se observó diferencias estadísticamente significativas con resultados inferiores al 5%, representado en el cuadro de análisis de varianza; ver Tabla 3.2.2, el cual indica que existe una dependencia entre estas variables y demostrar que existe diferencia entre los tratamientos, en la que se obtuvo un valor $p < 0,0003$.

En esta etapa lo que interesa por la especie y por el objetivo planteado es la de obtener la formación de brotes a partir de yemas de *Ochroma lagopus*, por lo tanto los resultados obtenidos con el tratamiento uno (BAP 0.1mg/L) que obtuvo la media más alta; ver Tabla 3.2.2, en cuanto al aparecimiento de callo

es la menos adecuada para el propósito de la investigación, es decir, mayor aparecimiento de callo.

El tratamiento uno (BAP 0.1 mg/L) forma parte de un único grupo estadístico letra A, es decir existe diferencia estadísticamente significativa entre este tratamiento y los demás tratamientos: dos, tres, cuatro, cinco (BAP: 0.2 mg/L, 0.3 mg/L, 0.4 mg/L, 0,5 mg/L). Los tratamientos: dos, tres, cuatro forman parte de un solo grupo estadístico letra B, es decir, no hay diferencia estadística entre ellos, es decir que los tratamientos son iguales.

El tratamiento uno presenta la media más alta: 87.78; en cuanto al aparecimiento de callo y el tratamiento cinco la media más baja: 11.43 para la misma variable; ver Tabla 3.2.2, de igual manera se observó en el gráfico de densidad de puntos; Figura 3.2.2.

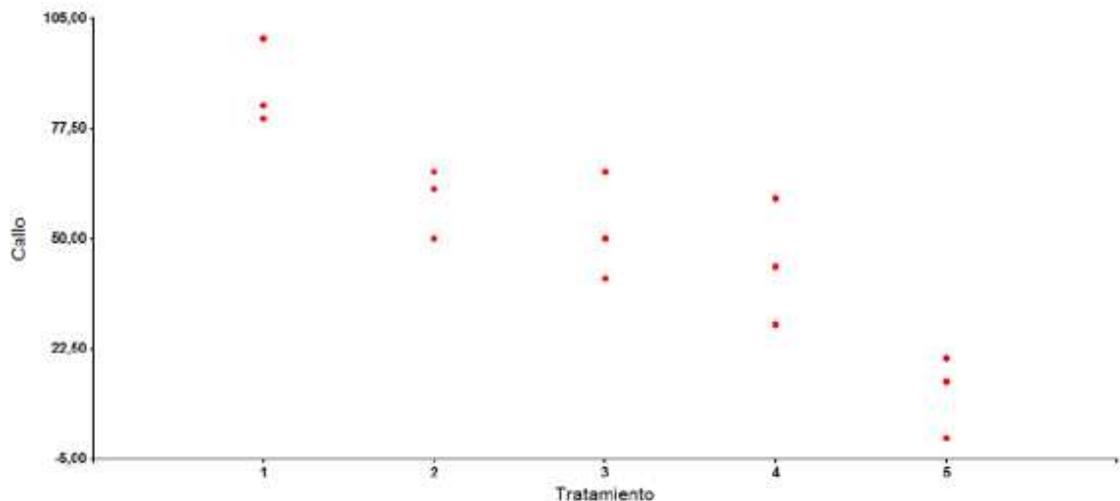


Figura 3.2.2 –Densidad de puntos para la formación de callo en los tratamientos de inducción para yemas de *Ochroma lagopus*.

Tabla 3.2.2- Tabla de comparación de Fisher para el aparecimiento de callo con respecto a la concentración de hormona BAP.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Callo	15	0,86	0,81	23,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9143,33	4	2285,83	15,76	0,0003
Tratamiento	9143,33	4	2285,83	15,76	0,0003
Error	1450,54	10	145,05		
Total	10593,87	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=21,91095

Error: 145,0539 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
5	11,43	3	6,95	A
4	43,81	3	6,95	B
3	52,22	3	6,95	B
2	59,72	3	6,95	B
1	87,78	3	6,95	C

3.2.2 Aparecimiento de brote

Análisis exploratorio de datos

En esta etapa de inducción se utilizaron cinco tratamientos para la inducción de brotes a partir de yemas apicales de Balsa (*Ochroma lagopus*); ver Tabla 3.2.1.

El tratamiento cinco (BAP 0.5 mg/L); resultó el más adecuado para la inducción de brotes a partir de yema apical de balsa, la formación de brote comienza al aumentar con la concentración de hormona en este caso de citoquinina BAP, aunque también el tratamiento dos es efectivo para la formación de brotes pero además es adecuado para la formación de callo; ver Figura 3.2.2 y Figura 3.2.3.



Figura 3.2.3 – Brotos en los tratamientos de inducción para yemas de *Ochroma lagopus*.

Análisis inferencial

Para analizar la relación de dependencia o independencia en la concentración de hormona BAP y la formación de brote, se seleccionó la prueba de LSD Fisher; ver anexo estadístico.

Para esto se realizó una tabla de comparaciones en la cual se observó diferencias estadísticamente significativas con resultados inferiores al 5%, representado en el cuadro de análisis de varianza; ver Tabla 3.2.3, el cual indica que existe una dependencia entre estas variables y demostrar que existe diferencia entre los tratamientos, en la que se obtuvo un valor $p < 0,0003$.

El tratamiento uno (BAP 0.1 mg/L) forma parte de un único grupo estadístico letra A, es decir existe diferencia estadísticamente significativa entre este tratamiento y los demás tratamientos: dos, tres, cuatro, cinco (BAP: 0.2 mg/L, 0.3 mg/L, 0.4 mg/L, 0,5 mg/L) respectivamente; esto significa que existe diferencia entre tratamientos; ver Tabla 3.2.3.

Los tratamientos: dos, tres, cuatro forman parte de un solo grupo estadístico letra B, es decir, no hay diferencia estadística entre ellos, es decir que los tratamientos son iguales, el tratamiento uno la media más baja: 12,22 y la media más alta para la formación de brote es 88,57 del tratamiento cinco; ver Tabla 3.2.23 y además se corrobora con el gráfico de densidad de puntos; ver Figura 3.2.4.

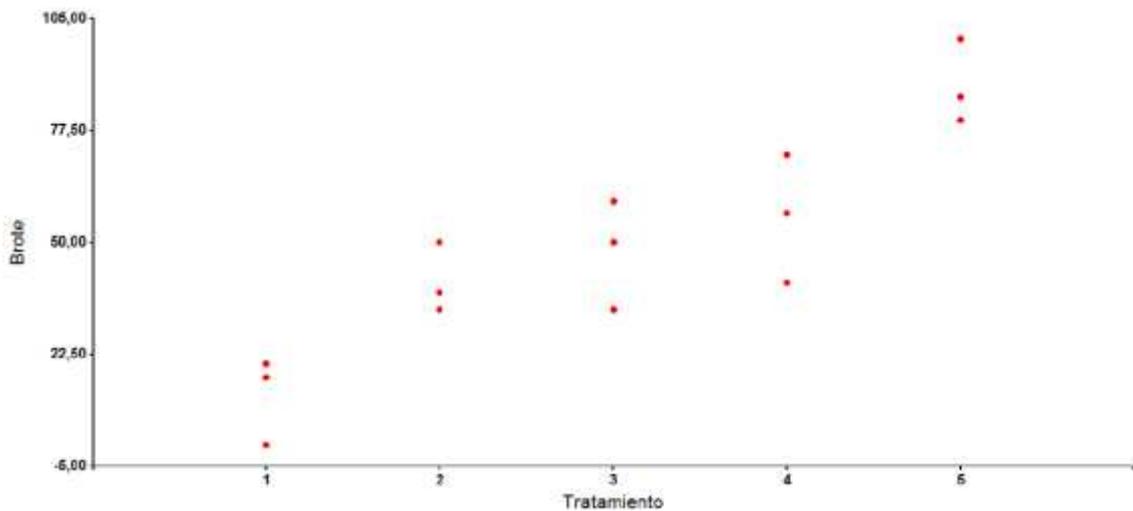


Figura 3.2.4 – Densidad de puntos para la formación de brotes en los tratamientos de inducción para yemas de *Ochroma lagopus*.

Al comparar los tratamientos empleados en esta etapa de inducción; se puede observar la diferencia de respuesta de cada uno de ellos en cuanto a la formación de brotes o aparecimiento de callo, por ello tenemos que el tratamiento uno (BAP 0.1 mg/L) es favorable para la formación de callo, esto en contraste con el tratamiento cinco (BAP 0.5mg/L) el cual es favorable a la formación de brotes; ver Figura 3.2.1 y Figura 3.2.3.

En el anexo 14, se observó la comparación del efecto del 6 – Bencil amino purina (BAP) en lo que se refiere a las concentraciones en mg/L utilizadas en esta investigación, tanto para la inducción de callo o formación de brote.

Tabla 3.2.3- Tabla de comparación de Fisher para la formación de brote con respecto a la concentración de hormona: BAP.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Brote	15	0,86	0,81	24,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9143,33	4	2285,83	15,76	0,0003
Tratamiento	9143,33	4	2285,83	15,76	0,0003
Error	1450,54	10	145,05		
Total	10593,87	14			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=21,91095

Error: 145,0539 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
1	12,22	3	6,95	A
2	40,28	3	6,95	B
3	47,78	3	6,95	B
4	56,19	3	6,95	B
5	88,57	3	6,95	C

3.3. Etapa de multiplicación

Durante esta etapa lo que se esperó fue que los explantes que sobrevivan a la fase de desinfección e inducción, originen brotes con varias hojas. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, 2004).

El medio utilizado será el M&S, 6-bencilaminopurina (BAP) (0,2 a 2,0 mg/L) o thidiazuron (0,2 a 2,0 mg/L) solos o en combinación con (0,1 y 0,2

mg/L) de ácido α naftalen acético (ANA), arreglados en 9 tratamientos más un testigo; con esto se espera obtener una múltiple aparición de brotes

Posteriormente, los brotes serán subdivididos y traspasados a medios frescos. Las variables evaluadas durante esta fase serán el número de brotes y longitud de los brotes. Las condiciones ambientales seguirán siendo las mismas empleadas en la fase de establecimiento.

Tabla 3.3.1- Tratamientos para multiplicación utilizando BAP en combinación con ANA, nueve tratamientos más un testigo.

Tratamiento	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)
1	0	0
2	0,2	0
3	0,2	0,1
4	0,2	0,2
5	1	0
6	1	0,1
7	1	0,2
8	2	0
9	2	0,1
10	2	0,2

Tabla 3.3.2- Tratamientos para multiplicación utilizando TDZ en combinación con ANA, nueve tratamientos más un testigo.

Tratamiento	TDZ (mg/L)	ANA (mg/L)
1	0	0
2	0,2	0
3	0,2	0,1
4	0,2	0,2
5	1	0
6	1	0,1
7	1	0,2
8	2	0
9	2	0,1
10	2	0,2

3.3.1. Multiplicación tratamientos (BAP - ANA)

Análisis exploratorio de datos

Número de brotes

En esta etapa de multiplicación se utilizaron diez tratamientos para evaluar la formación de brotes y la longitud del explante; para ello se utilizaron combinaciones de BAP (6 – Bencil aminopurina) con ANA (α - Ácido naftalen acético), nueve tratamientos más un testigo: tratamiento testigo-tratamiento uno (BAP 0 mg/L –ANA 0 mg/L), tratamiento dos (BAP 0,2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento tres (BAP 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento cuatro (BAP 0,2 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento cinco (BAP 1 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento seis (BAP 1 mg/L- ANA 0,1 mg/L), tratamiento siete (BAP 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento ocho (BAP 2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento nueve (BAP 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento diez (BAP 2 mg/L – ANA 0,2 mg/L); ver Tabla 3.3.1.

Los resultados que se obtuvieron en cuanto a la formación de brotes, fueron: tratamiento tres (BAP 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L); presenta la más alta formación de brotes que fueron siete; uno por cada repetición en promedio, este promedio fue obtenido de por lo menos diez repeticiones que se realizaron para cada tratamiento, tratamiento diez (BAP 2 mg/L – ANA 0,2 mg/L); se obtuvieron seis brotes; de igual manera en promedio, los resultados que se obtuvieron en los tratamientos señalados fueron comparados con los tratamientos restantes en los que se utilizó esta combinación hormonal específica; ver Figura 3.3.1.

Los tratamientos uno (Testigo) (BAP 0 mg/L –ANA 0 mg/L), cinco (BAP 1 mg/L – ANA 0 mg/L), seis (BAP 1 mg/L- ANA 0,1 mg/L), ocho (BAP 2 mg/L – ANA 0 mg/L), nueve (BAP 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L), ocasionaron apenas tres

brotos en los tratamientos uno y cuatro, dos brotes en los tratamientos seis, ocho, nueve, ver Figura 3.3.1.

El mayor porcentaje en cuanto a la formación de brotes que dio como resultado en la aplicación de estos tratamientos fue el tratamiento tres (BAP 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L); con un porcentaje de 18,42%, el porcentaje que le sigue es el que presenta el tratamiento diez (BAP 2 mg/L – ANA 0,2 mg/L), con un valor de 15,79%; ver Figura 3.3.2.

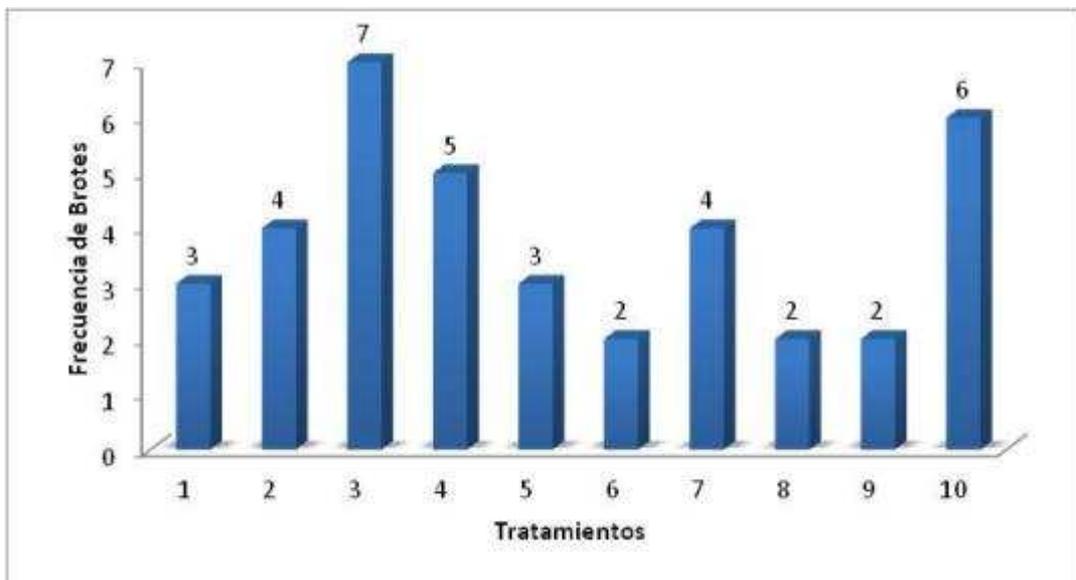


Figura 3.3.1 – Frecuencia en formación de brotes en los tratamientos de multiplicación para *Ochroma lagopus*, utilizando combinaciones de BAP y ANA.

Los resultados de formación de brote que mostraron los porcentajes menos elevados fueron los de los tratamientos seis (BAP 1 mg/L- ANA 0,1 mg/L), ocho (BAP 2 mg/L – ANA 0 mg/L) y nueve (BAP 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L) con apenas el 5,26% para los tres casos.

Los resultados de la formación de brotes en la aplicación de la combinación de BAP vs. ANA para estos diez tratamientos esta descrita en porcentajes en la Figura 3.3.2 con una escala que tiene como valor más alto el 20%, que hacen más visibles los resultados.

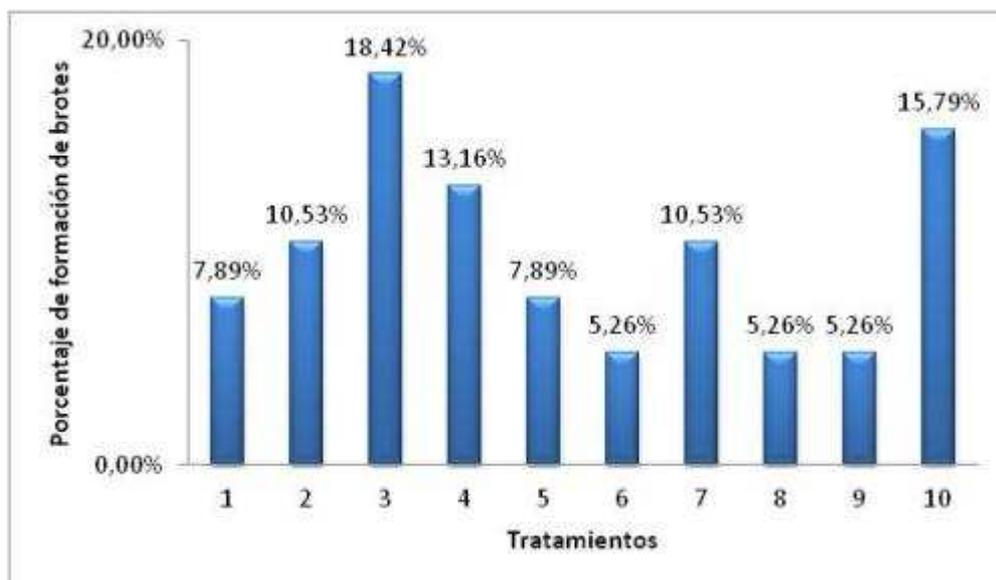


Figura 3.3.2 –Porcentaje de formación de brotes en los tratamientos de multiplicación en los que se utilizó combinaciones de BAP vs. ANA.

Longitud de brotes

En lo que se refiere a la longitud obtenida en la aplicación de estos tratamientos, se la evaluó en mm.; el tratamiento que produjo la mayor elongación de los explantes fue el tratamiento siete (BAP 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L), con una altura promedio de 31,32 mm; seguido no por mucha diferencia por el tratamiento cuatro (BAP 0,2 mg/L – ANA 0,2 mg/L), con una altura promedio de 29,18 mm; los tratamientos uno (testigo) (BAP 0 mg/L – ANA 0 mg/L) con una altura promedio de 29,18 mm., seis (BAP 1 mg/L- ANA 0,1 mg/L), con una altura promedio de 22,62 mm., cinco (BAP 1 mg/L – ANA 0 mg/L), con una altura promedio de 21,68 mm., nueve (BAP 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L), con una altura promedio de 22,08 mm. y diez (BAP 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L), con una altura promedio de 20,90 mm., muestran una elongación del explante similar, los tratamientos tres (BAP 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L) y ocho (BAP 2 mg/L – ANA 0 mg/L), decaen en cuanto a la longitud alcanzada con una longitud promedio de 18,96 mm. y 18,35 mm.; respectivamente. El tratamiento que muestra la longitud promedio más baja fue la del tratamiento dos (BAP 0,2

mg/L – ANA 0 mg/L) con apenas 10,20 mm. de longitud del explante; ver Figura 3.3.4.

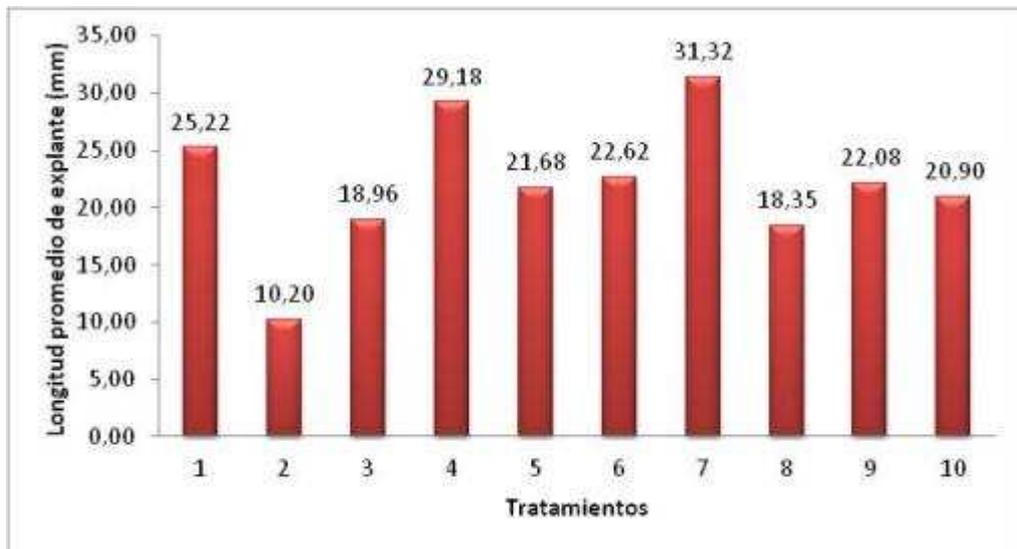


Figura 3.3.4 –Longitud promedio de los explantes medidas en (mm), obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizó combinaciones de BAP vs. ANA.

Los valores de longitud alcanzados están representados en porcentaje en la Figura 3.3.5, y los porcentajes alcanzados más representativos son los de los tratamientos: siete 14,20%; cuatro 13,23% y dos 4,63%.

Para la variable; longitud del explante, se realizó una categorización de la altura que alcanzaron los explantes, en la categoría uno: treinta cinco explantes, en la categoría dos: cuarenta y uno explantes, en la categoría tres: treinta ocho explantes, en la categoría cuatro: nueve explantes, en la categoría cinco: un explante; ver Tabla 3.3.3.



Figura 3.3.5 – Porcentaje de la longitud de los explantes, obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizó combinaciones de BAP vs. ANA.

Tabla 3.3.3- Categorización de datos para la longitud de los explantes obtenidos en el tratamiento de BAP vs. ANA en la etapa de multiplicación de Balsa (*Ochroma lagopus*).

CATEGORIA	DESDE (mm)	HASTA (mm)	EXPLANTES DENTRO DEL RANGO
1	0	13,752	35
2	13,752	27,504	41
3	27,504	41,256	38
4	41,256	55,008	9
5	55,008	68,76	1

La categoría en la que se colocaron mas explantes fue en la categoría dos, la categoría de clasificación que le sigue es la dos y seguida de esta la uno. La categorización se realizó en cada tratamiento; en el tratamiento uno los explantes se clasifican en la categoría dos con un 53,8%, el tratamiento dos los explantes se clasifican en la categoría uno con 57,1%, en el tratamiento tres los explantes se clasifican en la categoría uno con 46,2%, en el tratamiento cuatro los explantes se clasifican en la categoría dos y tres con 36,4% para las dos

categorías, en el tratamiento cinco los explantes se clasifican en la categoría dos y tres con 41,7% para las dos categorías, en el tratamiento seis los explantes se clasifican en la categoría dos con 36,4%, en el tratamiento siete los explantes se clasifican en la categoría tres con 61,5%, en el tratamiento ocho los explantes se clasifican en la categoría dos con 45,5%, en el tratamiento nueve los explantes se clasifican en la categoría dos y tres con 33,3% para las dos categorías, en el tratamiento diez los explantes se clasifican en las categorías uno y tres con 46,2% para las dos categorías; ver anexo 16.

Las longitudes promedio que se alcanzaron con las combinaciones de BAP vs. ANA se puede observar en la Figura 3.3.7, la concentración de 1 mg/L BAP con 0,2 mg/L ANA resultó en la mejor combinación para alcanzar una altura promedio de 31,30 mm., la combinación menos favorable para la elongación del brote fue la del tratamiento testigo.

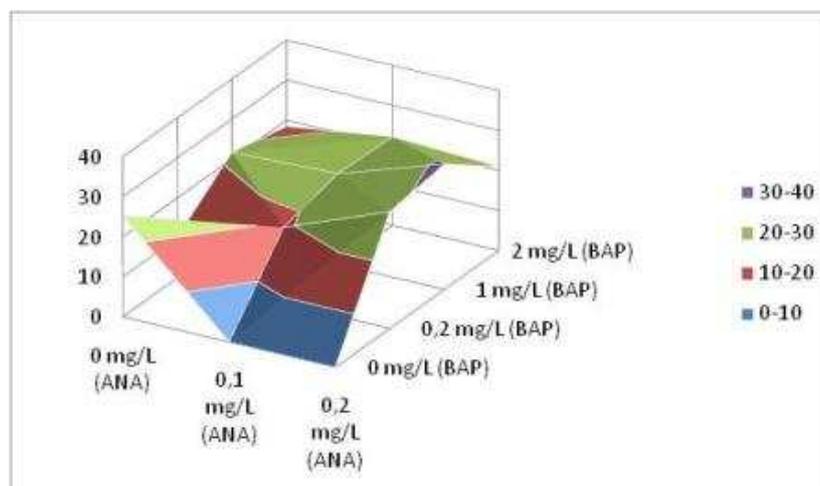


Figura 3.3.7 – Longitud promedio de los explantes, obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizó combinaciones de BAP vs. ANA.

Análisis inferencial de datos

Número de brotes

El número de brotes se presentan resumidos en la tabla de contingencia 3.3.4, ver anexo estadístico. En las columnas se ubican las concentraciones de (6 – Bencil aminopurina), (0,2 mg/L; 1mg/L; 2mg/L) y en las filas el número de brotes (0, 1, 2) con 23 brotes en total como resultado de las tres concentraciones de hormona usada, 10 brotes usando 0,2mg/L [BAP], 6 brotes usando 1 mg/L [BAP], 7 brotes usando 2mg/L [BAP]; el valor de p chi cuadrado de pearson que se obtuvo fue de 0,5276 que es mayor al 5%, por esto se puede decir que no existe dependencia entre las concentraciones utilizadas de BAP y el número de brotes obtenidos; ver Tabla 3.3.5.

El número de brotes que se presentan resumidos en tablas de contingencia; ver anexo estadístico; en las columnas: concentraciones de (ácido α -naftalenacético), (0,2 mg/L; 0,1mg/L), en las filas: el número de brotes que se clasificaron: 0, 1, 2 brotes, obteniéndose como resultado lo mostrado en la tabla 3.3.6 , con 23 brotes en total como resultado de las dos concentraciones de hormonas usadas, 10 brotes usando 0,1mg/L [ANA], 13 brotes usando 0,2 mg/L [BAP]; ver Tabla 3.3.6; el valor de p chi cuadrado de pearson que se obtuvo fue de 0,7012 que es mayor al 5%, por esto se puede decir que no existe dependencia entre las concentraciones utilizadas de ANA y el número de brotes obtenidos; ver Tabla 3.3.4.

Tabla 3.3.4- Tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2) usando las concentraciones de 6-bencilaminopurina 0,2 mg/L; 1mg/L;

Brotos	[BAP]			Total de Brotos
	0,2 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	
0	14	18	19	51
1	8	6	6	20
2	2	0	1	3
Total de Brotos	24	24	26	74

2mg/L.

Tabla 3.3.5- Valor de p chi cuadrado de pearson para la tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2) usando las concentraciones de 6-bencilaminopurina 0,2 mg/L; 1mg/L; 2mg/L.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	3,18	4	0,5276

Tabla 3.3.6- Tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2) usando las concentraciones de α -ácido naftalenacético 0,2 mg/L; 0,1mg/L.

Brotos	[ANA]		Total de brotes
	0,1 mg/L	0,2 mg/L	
0	27	24	51
1	9	11	20
2	1	2	3
Total de brotes	37	37	74

Tabla 3.3.7- Valor de p chi cuadrado de pearson para la tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2) usando las concentraciones de α -ácido naftalenacético 0,2 mg/L; 0,1mg/L.

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	0,71	2	0,7012

El análisis de varianza; ver anexo estadístico para el número de brotes obtenidos al utilizar los tratamientos de BAP vs. ANA mostró como resultado que no hay diferencia estadísticamente significativa, obteniendo valores de $p > 5\%$, para el modelo el valor de p fue de 0,3234, para las concentraciones de BAP utilizadas el valor de p fue de 0,2478, para las concentraciones de ANA utilizadas el valor de p fue de 0,3503, por esto podemos decir que todos los tratamientos usados pertenecen a un mismo grupo estadístico letra A y no existe diferencia entre ellos; ver Tabla 3.3.8.

La media más alta para la formación de brotes en los que se refiere al uso de (6 – bencil aminopurina) fue la de 0,51 al usar 0,2 mg/L BAP y la menor media obtenida de 0,24 resultó del uso de 1,0 mg/L BAP, la media más alta para la formación de brotes respecto al uso de (ácido α – naftalenacético) es la que nos da como resultado 0,41 al utilizar 0,2 mg/L de ANA y la media más baja de 0,29 obtenida al usar 0,1 mg/L de ANA; ver Tabla 3.3.8.

Tabla 3.3.8- Análisis de varianza para la formación de brotes usando BAP (6 - bencilaminopurina) vs. ANA (ácido α - naftalenacético)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NumBrotes	74	0,05	0,01	158,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,10	3	0,37	1,18	0,3234
BAP	0,89	2	0,44	1,42	0,2478
ANA	0,27	1	0,27	0,88	0,3503
Error	21,76	70	0,31		
Total	22,86	73			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,31678

Error: 0,3109 gl: 70

BAP Medias	n	E.E.
1,0	0,24	24 0,11 A
2,0	0,31	26 0,11 A
0,2	0,51	24 0,11 A

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,25855

Error: 0,3109 gl: 70

ANA Medias	n	E.E.
0,1	0,29	37 0,09 A
0,2	0,41	37 0,09 A

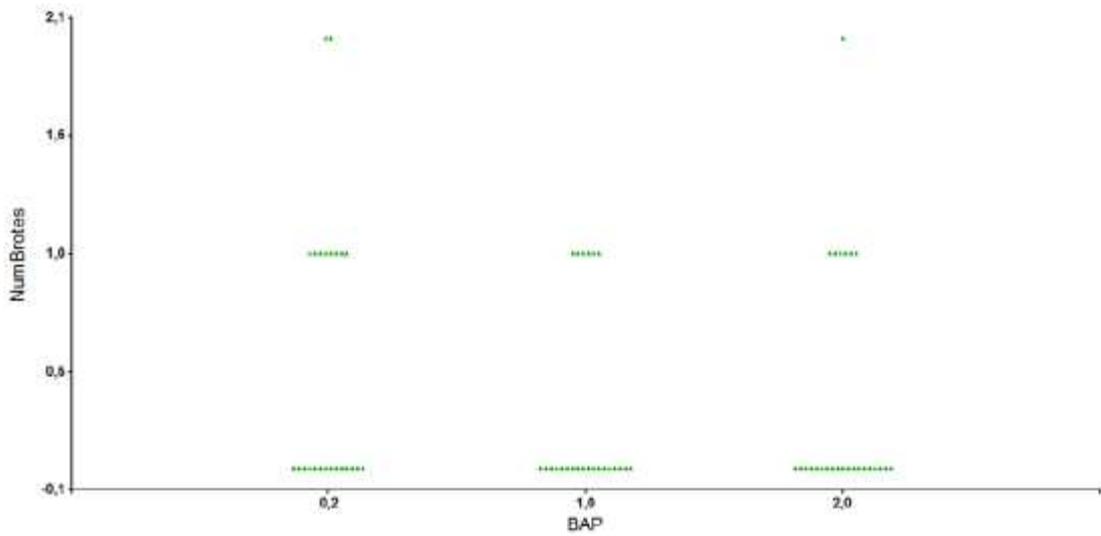


Figura 3.3.8 – Densidad de puntos para las concentraciones de BAP (1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la formación de brotes

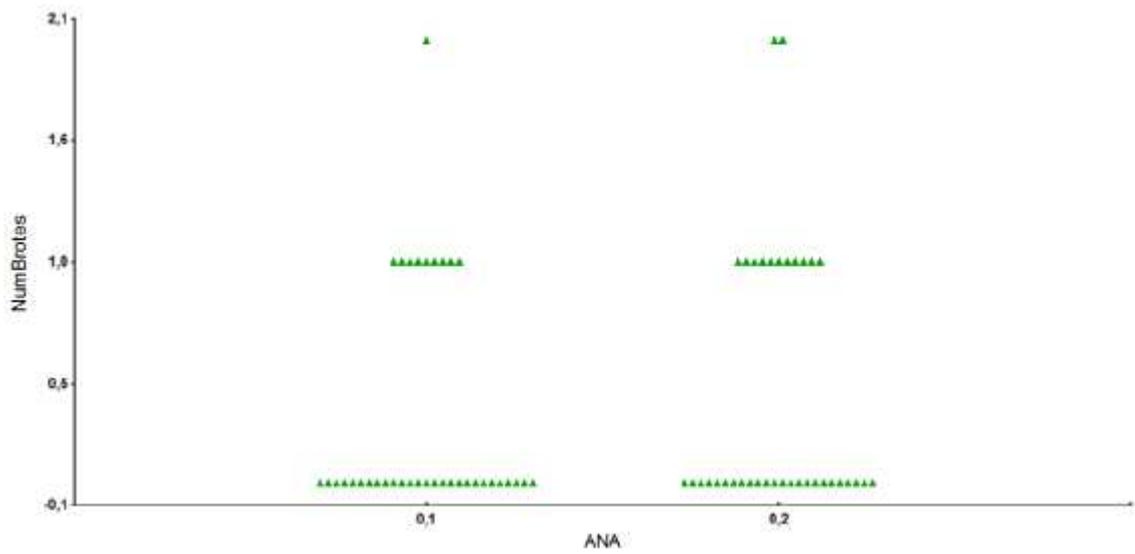


Figura 3.3.9 – Densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la formación de brotes

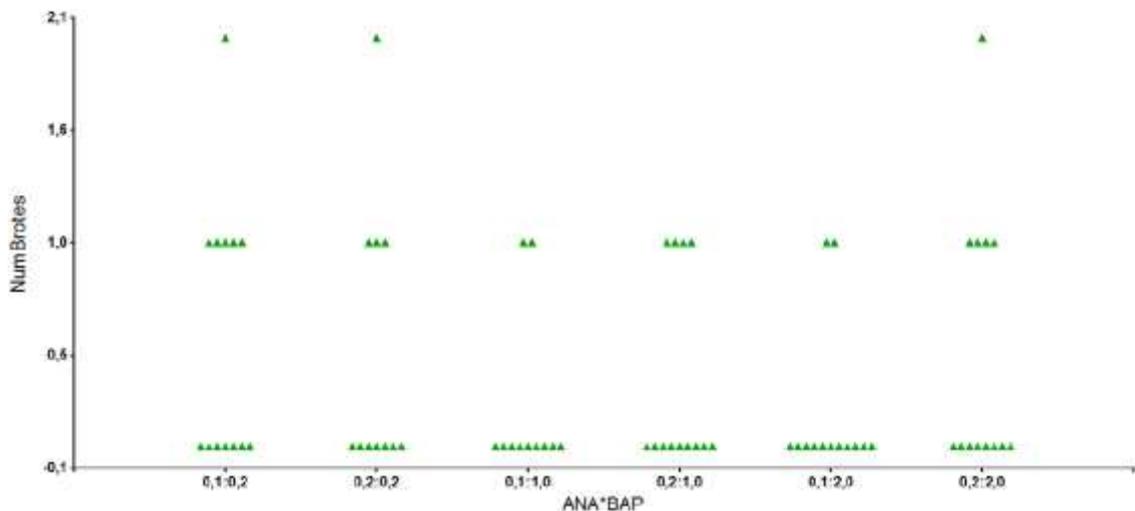


Figura 3.3.10 – Densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L) y las concentraciones de BAP (1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la formación de brotes

Las medias que se obtuvieron respecto a la formación de brotes en los tratamientos en los que se utilizó (6 - bencilaminopurina) y ANA (ácido α - naftalenacético), están descritos en los gráficos de densidad de puntos en la Figura 3.3.8; las concentraciones de BAP y en la Figura 3.3.9; concentraciones de ANA y en la Figura 3.3.10; la relación de estas dos fitohormonas, en donde existió mayor formación de brotes fue al usar 0,1 mg/L de ANA con 0,2 mg/L de BAP; al igual que en la combinación hormonal: 0,2 mg/L de ANA con 2,0 mg/L de BAP.

La combinación de las hormonas BAP vs. ANA y los efectos en cuanto a la formación de brotes, son las siguientes: en las columnas ANA vs. BAP, en las filas están el número de brotes: 0, 1, 2; entonces: 0,1 mg/L ANA combinado con 0,2 mg/L BAP; seis brotes; 0,1 mg/L ANA combinado con 1,0 mg/L BAP; dos brotes; 0,1 mg/L ANA combinado con 2,0 mg/L BAP; cero brotes; 0,2 mg/L ANA combinado con 0,2 mg/L BAP; cuatro brotes; 0,2 mg/L ANA combinado con 1,0 mg/L BAP; cuatro brotes; 0,2 mg/L ANA combinado con 2,0 mg/L BAP; cinco brotes, se obtuvo un valor de p de 0,8087 lo que quiere decir que no hay dependencia entre en número de brotes y la combinación utilizada de hormonas; ver Tabla 3.3.9.

Tabla 3.3.9 – Tabla de contingencia para la formación de brotes usando combinaciones de hormonas: BAP vs. ANA y valor de chi cuadrado de pearson.

Tablas de contingencia

Frecuencias absolutas

En columnas:ANA:BAP

NumBrotos	0,1:0,2	0,1:1,0	0,1:2,0	0,2:0,2	0,2:1,0	0,2:2,0	Total
0	7	9	11	7	9	8	51
1	5	2	2	3	4	4	20
2	1	0	0	1	0	1	3
Total	13	11	13	11	13	13	74

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	6,08	10	0,8087

Longitud de brotes

La longitud de los explantes se describe en la siguiente tabla de contingencia en las columnas las combinaciones de BAP vs. ANA: 0,2 mg/L BAP – 0,1 mg/L ANA; 0,2 mg/L BAP – 0,2 mg/L ANA; 1,0 mg/L BAP – 0,1 mg/L ANA; 1,0 mg/L BAP – 0,2 mg/L ANA; 2,0 mg/L BAP – 0,1 mg/L ANA; 2,0 mg/L BAP – 0,2 mg/L ANA, La longitud alcanzada de los explantes cultivados en la etapa de multiplicación utilizando la combinación de (6 – Bencil aminopurina) BAP con (ácido α – naftalenacético) ANA, se dio desde: 7,95 mm. hasta 68,76 mm; ver anexo 17.

Tabla 3.3.10 – Valor de chi cuadrado obtenido de la tabla de contingencia en donde se evalúa la longitud de los brotes usando combinaciones de hormonas: BAP vs. ANA.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	304,65	300	0,4145

El valor de p obtenido al realizar la tabla de contingencia para la longitud de brotes para la prueba de chi cuadrado fue de 0,4145, lo que quiere decir que no existe dependencia entre las combinaciones de hormonas utilizadas y la longitud de los explantes que se obtuvo como resultado en este experimento; ver Tabla 3.3.10.

Tabla 3.3.11 – Análisis de varianza para la longitud de los brotes usando combinaciones de hormonas: BAP vs. ANA.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LongExplante	74	0,06	0,01	66,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1031,81	3	343,94	1,36	0,2622
ANA	599,55	1	599,55	2,37	0,1281
BAP	392,30	2	196,15	0,78	0,4643
Error	17702,54	70	252,89		
Total	18734,35	73			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=7,37400

Error: 252,8935 gl: 70

ANA Medias n E.E.

0,1 21,30 37 2,62 A

0,2 27,01 37 2,62 A

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=9,03451

Error: 252,8935 gl: 70

BAP Medias n E.E.

2,0 21,49 26 3,12 A

0,2 23,88 24 3,25 A

1,0 27,09 24 3,25 A

En el análisis de varianza para la longitud de los explantes el valor de p obtenido para el modelo fue de 0,2622; los valores de p para las concentraciones de ANA el valor de p fue: 0,1281; para las concentraciones de BAP el valor de p fue de: 0,4643, por ello decimos que no existe diferencia estadísticamente significativa, ya que todos los tratamientos pertenecen a mismo grupo estadístico letra A, las medias que se obtuvieron respecto a la longitud de brotes, la más alta fue de 27,09 usando 1,0 mg/L BAP y 27,01 usando 0,2 mg/L ANA; ver Tabla 3.3.11.

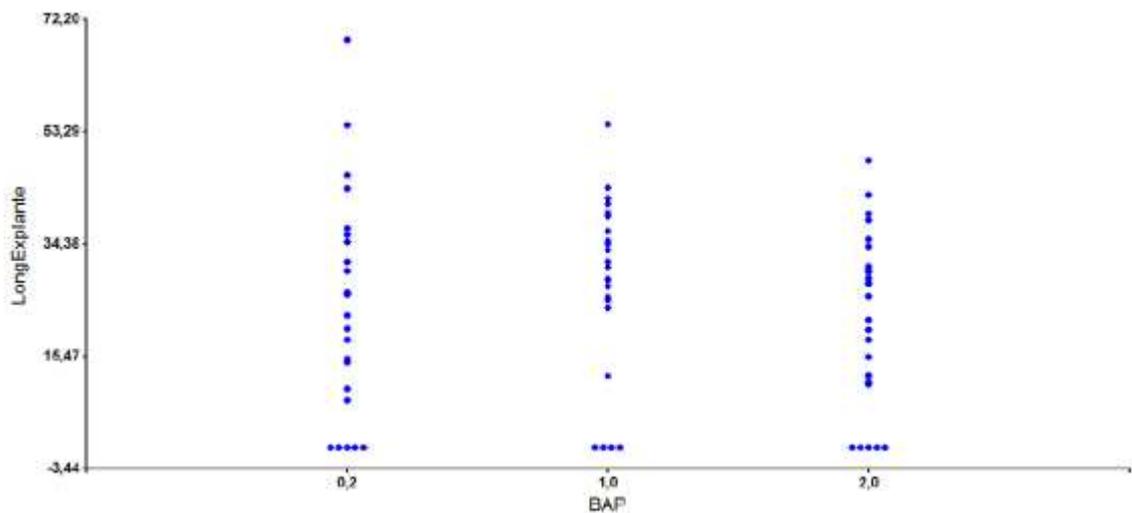


Figura 3.3.11 – Densidad de puntos para las concentraciones de BAP (2,0 mg/L, 1,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes

En la Figura 3.3.11 de gráfico de densidad de puntos se observó claramente que la concentración de BAP con la que se obtuvo mayor altura fue la de 0,2 mg/L, aunque la diferencia con el resto de concentraciones es ínfima, en la Figura 3.3.12 se observa apenas una diferencia mínima en las concentraciones de ANA que fueron usadas: 0,1 y 0,2 mg/L igualmente para la longitud. Al combinar las dos hormonas; la mejor combinación para una mejor longitud fue: 0,1mg/L de ANA con 0,2 mg/L de BAP; ver Figura 3.3.13.

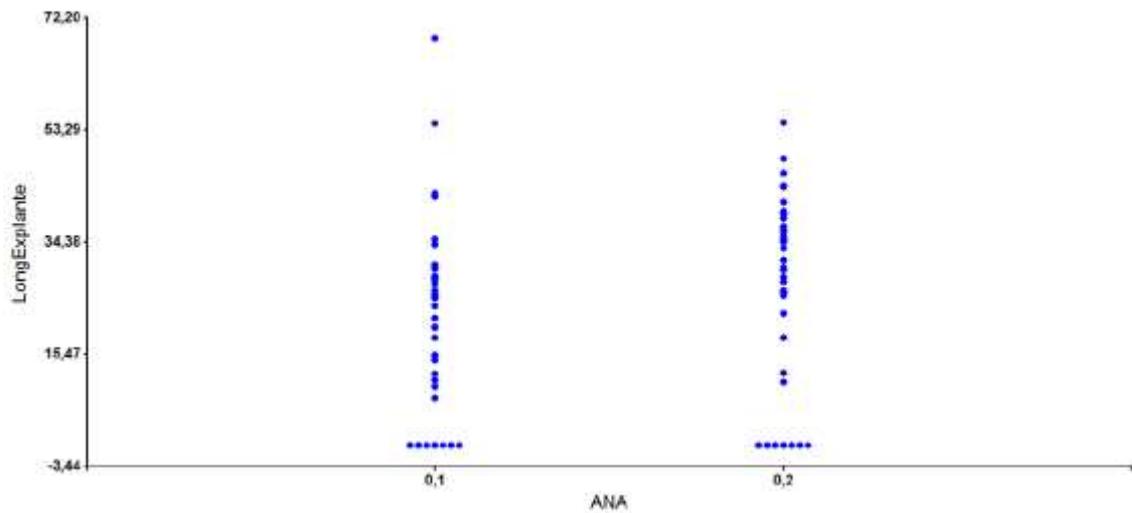


Figura 3.3.12 – Densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes.

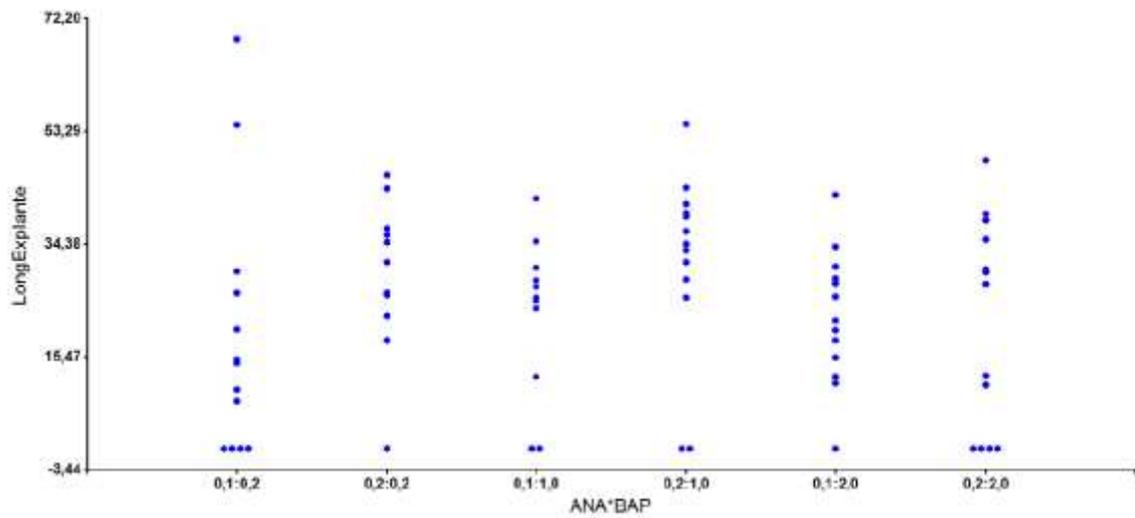


Figura 3.3.13 – Densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L) y las concentraciones de BAP (2,0 mg/L, 1,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes

3.3.2 Multiplicación tratamientos (TDZ - ANA)

Análisis exploratorio de datos

Número de brotes

En esta etapa de multiplicación se utilizaron diez tratamientos para evaluar la formación de brotes y la longitud del explante; para ello se utilizaron combinaciones de TDZ (Thidiazuron) con ANA (ácido α -naftalen acético), nueve tratamientos más un testigo: tratamiento testigo-tratamiento uno (TDZ 0 mg/L –ANA 0 mg/L), tratamiento dos (TDZ 0,2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento tres (TDZ 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento cuatro (TDZ 0,2 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento cinco (TDZ 1 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento seis (TDZ 1 mg/L- ANA 0,1 mg/L), tratamiento siete (TDZ 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento ocho (TDZ 2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento nueve (TDZ 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento diez (TDZ 2 mg/L – ANA 0,2 mg/L); ver Tabla 3.3.2.

Los resultados que se obtuvieron en cuanto a la formación de brotes, fueron: tratamiento cinco (TDZ 1mg/L – ANA 0 mg/L); presenta la más alta formación de brotes que fueron veinte y tres; los resultados que se obtuvieron en el resto de tratamientos señalados fueron comparados con el tratamiento que originó el mayor número de brotes; ver Figura 3.3.14.

Los tratamientos seis (TDZ 1 mg/L – ANA 0,1 mg/L), ocho (TDZ 2 mg/L – ANA 0 mg/L), tres (TDZ 0,2 mg/L – ANA 0,1mg/L) originaron una formación de brotes similar que fue de nueve brotes y siete brotes en el tratamiento tres; ver Figura 3.3.14.

Los tratamientos uno (Testigo) (TDZ 0 mg/L –ANA 0 mg/L), dos (TDZ 0,2 mg/L – ANA 0 mg/L), cuatro (TDZ 0,2 mg/L- ANA 0,2 mg/L), siete (TDZ 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L), nueve (TDZ 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L),diez (TDZ 0,2 mg/L –

ANA 0,2 mg/L) ocasionaron apenas 20 brotes entre todos los tratamientos mencionados; ver Figura 3.3.14.

El mayor porcentaje en cuanto a la formación de brotes que dio como resultado en la aplicación de estos tratamientos fue el tratamiento cinco (TDZ 1 mg/L – ANA 0 mg/L); con un porcentaje de 32,86 %, el porcentaje que le sigue es el que presenta el tratamiento seis (TDZ 1 mg/L – ANA 0,1 mg/L) y el tratamiento ocho (TDZ 2 mg/L – ANA 0 mg/L), con un valor similar de 12,86%; ver Figura 3.3.15.

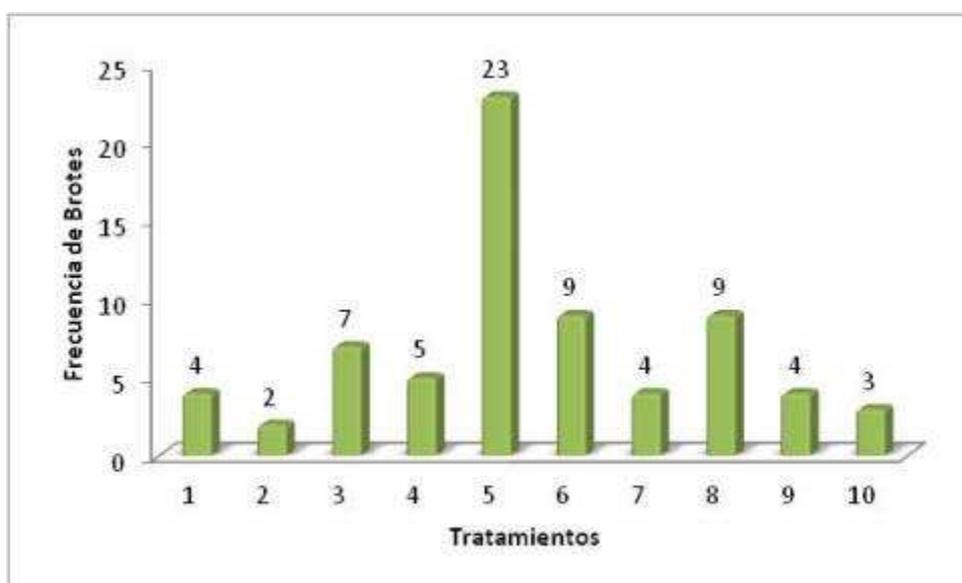


Figura 3.3.14 –Formación de brotes en los tratamientos de multiplicación para *Ochroma lagopus*, utilizando combinaciones de TDZ y ANA.

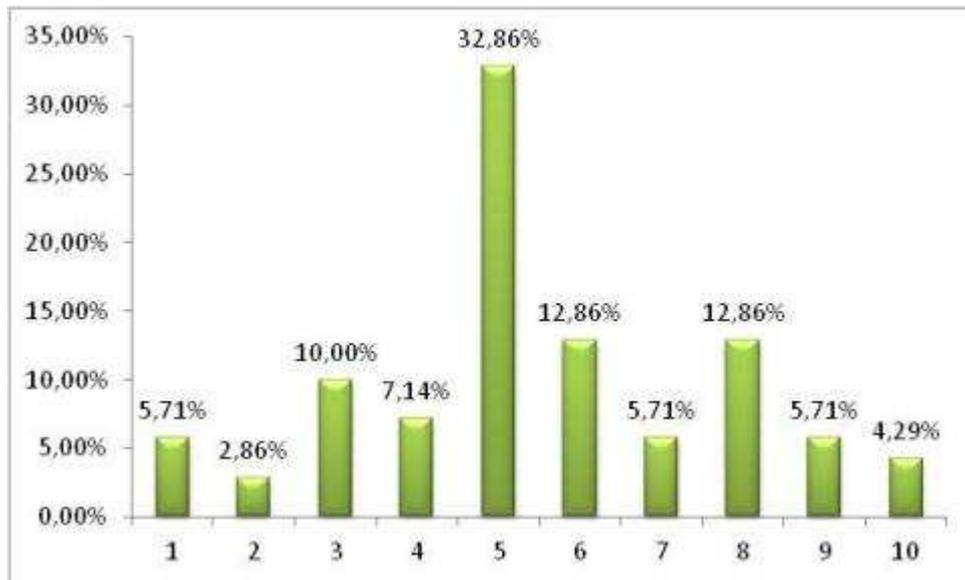


Figura 3.3.15– Porcentaje de formación de brotes en los tratamientos de multiplicación en los que se utilizó combinaciones de TDZ vs. ANA.

Longitud de brotes

En lo que se refiere a la longitud obtenida en la aplicación de estos tratamientos, se la evaluó en mm.; el tratamiento que produjo la mayor elongación de los explantes fue el tratamiento ocho (TDZ 2 mg/L – ANA 0 mg/L), con una altura promedio de 23,68 mm; seguido no por mucha diferencia por el tratamiento nueve (TDZ 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L), con una altura promedio de 23,39 mm; ver Figura 3.3.16.

Los tratamientos uno (testigo) (TDZ 0 mg/L – ANA 0 mg/L) con una altura promedio de 13,41 mm., dos (TDZ 0,2 mg/L – ANA 0 mg/L), con una altura promedio de 15,47 mm., tres (TDZ 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L), con una altura promedio de 15,86 mm., cuatro (TDZ 0,2 mg/L – ANA 0,2 mg/L), con una altura promedio de 16,72 mm; muestran una elongación del explante similar, los tratamientos cinco (TDZ 1 mg/L – ANA 0 mg/L), seis (TDZ 1 mg/L- ANA 0,1 mg/L) y diez (TDZ 0,2 mg/L – ANA 0,2 mg/L) incrementan la longitud alcanzada con respecto a los tratamientos anteriormente nombrados con una longitud

promedio de 21,73 mm., 20,19 mm. y 18.69 mm. respectivamente. El tratamiento que muestra la longitud promedio más bajo fue la del tratamiento siete (TDZ 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L) con apenas 11.09 (mm) de longitud del explante; ver Figura 3.3.16.

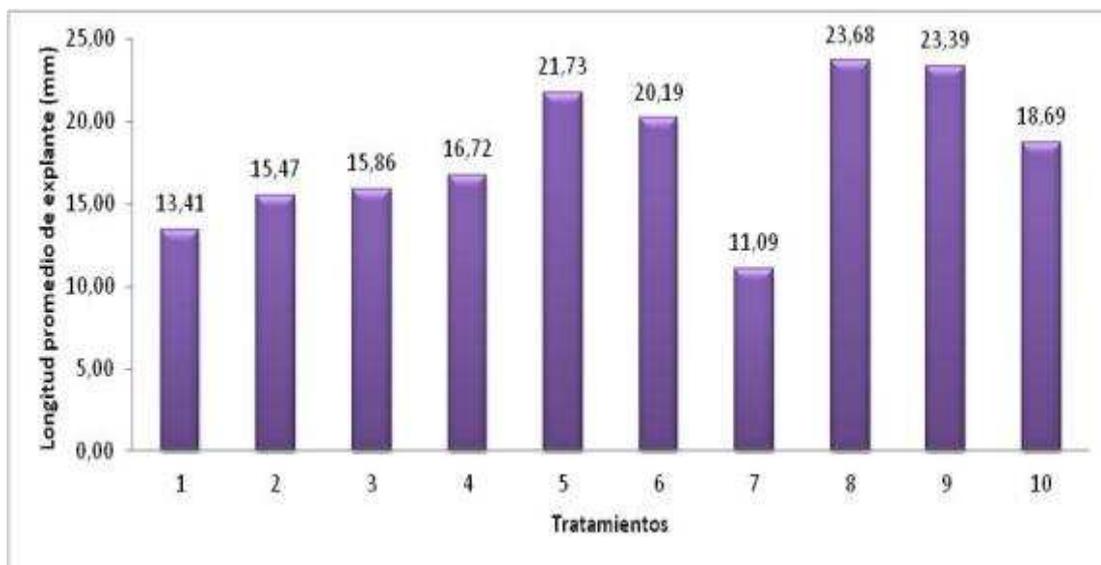


Figura 3.3.16 –Longitud promedio de los explantes medidas en (mm), obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizó combinaciones de TDZ vs. ANA.

Los valores de longitud alcanzados están representados en porcentaje en la Figura 3.3.17, y los porcentajes alcanzados más representativos son los de los tratamientos: ocho 13,1 %; nueve 13,0% y cinco 12,1 %.Y el porcentaje más bajo el del tratamiento siete con 6,2 %.

Para la variable; longitud del explante, se realizó una categorización de la altura que alcanzaron los explantes, en la categoría uno: treinta seis explantes, en la categoría dos: treinta y cinco, en la categoría tres: veinte y nueve explantes, en la categoría cuatro: veinte y cinco explantes, en la categoría cinco: nueve explantes; ver Tabla 3.3.12.

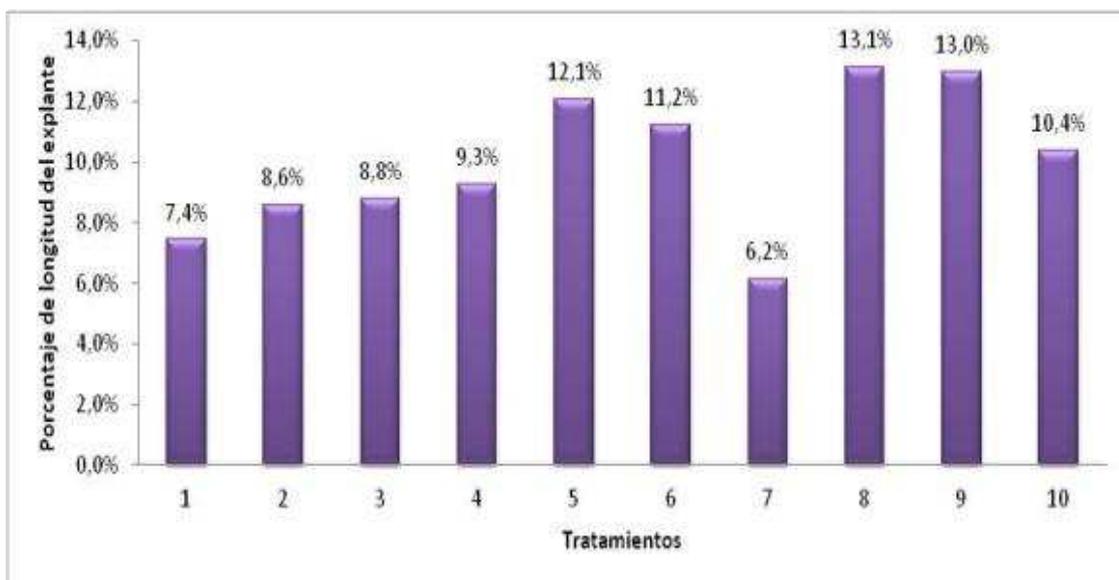


Figura 3.3.17 – Porcentaje de la longitud de los explantes, obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizó combinaciones de TDZ vs. ANA.

Tabla 3.3.12- Categorización de datos para la longitud de los explantes obtenidos en el tratamiento de TDZ vs. ANA en la etapa de multiplicación de Balsa (*Ochroma lagopus*)

CATEGORIAS	DESDE (mm)	HASTA (mm)	EXPLANTES DENTRO DEL RANGO
1	0	9,3	36
2	9,3	18,6	35
3	18,6	27,9	29
4	27,9	37,2	25
5	37,2	46,5	9

La categoría en la que se colocaron mas explantes fue en la categoría uno, la categoría de clasificación que le sigue es la dos y seguida de esta la tres.

La categorización se realizó en cada tratamiento; en el tratamiento uno los explantes se clasifican en la categoría uno con 42,9%, el tratamiento dos

los explantes se clasifican en la categoría uno con 42,9%, en el tratamiento tres los explantes se clasifican en la categoría uno con 33,3%, en el tratamiento cuatro los explantes se clasifican en la categoría uno y dos con 28,6 % para las dos categorías, en el tratamiento cinco los explantes se clasifican en la categoría dos con 42,9 %, en el tratamiento seis los explantes se clasifican en la categoría dos, tres y cuatro con 30,8 %, en el tratamiento siete los explantes se clasifican en la categoría uno con 50,0 %, en el tratamiento ocho los explantes se clasifican en la categoría tres y cuatro con 33,3%, en el tratamiento nueve los explantes se clasifican en la categoría dos con 40,0 %, en el tratamiento diez los explantes se clasifican en las categorías uno con 30,8 %; ver anexo 18.

Las longitudes promedio que se alcanzaron con las combinaciones de TDZ vs. ANA se puede observar en la Figura 3.3.18, la concentración de 2 mg/L TDZ con 0 mg/L ANA resultó en la mejor combinación para alcanzar una altura promedio de 23,68 mm., la combinación menos favorable para la elongación del brote fue la del tratamiento en el que se combinó 0 mg/L de TDZ con 0,1 mg/L y 0,2 mg/L de ANA.

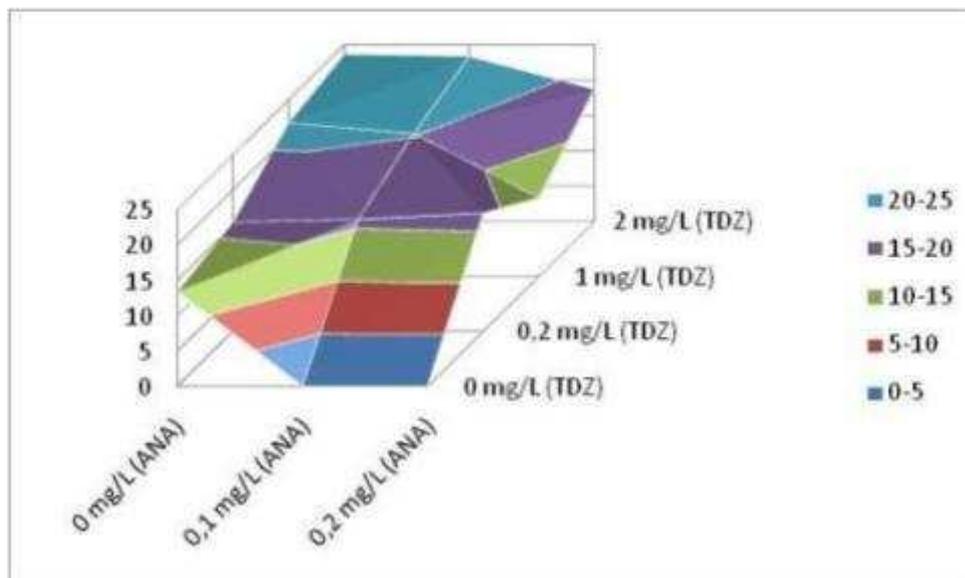


Figura 3.3.17 – Longitud promedio de los explantes, obtenidas de los tratamientos de multiplicación en los que se utilizó combinaciones de TDZ vs. ANA

Análisis inferencial de datos

Número de brotes

El número de brotes que se presentan usando tablas de contingencia; ver anexo estadístico; en las columnas: concentraciones de Thidiazuron, (0,2 mg/L; 1mg/L; 2mg/L), en las filas: el número de brotes que se clasificaron: 0, 1, 2, 3, 4 brotes, obteniéndose como resultado lo mostrado en la Tabla 3.3.13, con 32 brotes en total como resultado de las tres concentraciones de hormona usada, 8 brotes usando 0,2mg/L [TDZ], 14 brotes usando 1 mg/L [TDZ], 10 brotes usando 2mg/L [TDZ]; ver Tabla 3.3.13. El valor de p chi cuadrado de pearson que se obtuvo fue de 0,1062 que es mayor al 5%, por esto se puede decir que no existe dependencia entre las concentraciones utilizadas de TDZ y el número de brotes obtenidos; ver Tabla 3.3.14.

Tabla 3.3.13- Tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2, 3, 4) usando las concentraciones de Thidiazuron 0,2 mg/L; 1mg/L; 2mg/L.

Brotos	TDZ			Total de Brotos
	0,2 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	
0	18	27	29	74
1	4	3	7	14
2	4	3	1	8
3	0	5	1	6
4	0	3	1	4
Total de Brotos	26	41	39	106

Tabla 3.3.14- Valor de p chi cuadrado de pearson para la tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2, 3,4) usando las concentraciones de Thidiazuron 0,2 mg/L; 1mg/L; 2mg/L.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	13,17	8	0,1062

El número de brotes se presentaron usando tablas de contingencia; ver anexo estadístico. en las columnas: concentraciones de (ácido α -naftalenacético), (0,2 mg/L; 0,1mg/L), en las filas: el número de brotes que se clasificaron: 0, 1, 2, 3, 4 brotes, obteniéndose como resultado lo mostrado en la Tabla 3.3.15, con 32 brotes en total como resultado de las tres concentraciones de hormona usadas, 11 brotes usando 0 mg/L [ANA], 12 brotes usando 0,1 mg/L [ANA] , 9 brotes usando 0,2 mg/L [ANA]; ver Tabla 3.3.15; el valor de p chi cuadrado de pearson que se obtuvo fue de 0,0057 que es menor al 5%, por esto se puede decir que si existe dependencia entre las concentraciones utilizadas de ANA y el número de brotes obtenidos; ver Tabla 3.3.16.

Tabla 3.3.15- Tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2, 3, 4) usando las concentraciones de α -ácido naftalenacético 0,2 mg/L; 0,1mg/L, 0 mg/L.

Brotos	ANA			Total de Brotos
	0 mg/L	0,1 mg/L	0,2 mg/L	
0	15	27	32	74
1	2	6	6	14
2	1	4	3	8
3	4	2	0	6
4	4	0	0	4
Total de Brotos	26	39	41	106

Tabla 3.3.16- Valor de p chi cuadrado de pearson para la tabla de contingencia para la formación de brotes (0, 1, 2, 3,4) usando las concentraciones de ANA (α – ácido naftalenacético) 0,2 mg/L; 1mg/L; 2mg/L.

Estadístico	Valor gl	p
Chi Cuadrado Pearson	21,59	8 0,0057

El análisis de varianza; ver anexo estadístico; para el número de brotes obtenidos al utilizar los tratamientos de TDZ vs. ANA mostró como resultado que si hay diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, obteniendo valores de $p < 5\%$, para el modelo en el que se utilizó las concentraciones de TDZ el valor de p fue de 0,0017, para el modelo en el que se utilizó las concentraciones de ANA el valor de p fue de 0,0019; ver Tabla 3.3.17.

La media más alta para la formación de brotes en los que se refiere al uso de (Thidiazuron) fue la de 0,81 al usar 1,0 mg/L TDZ y la menor media obtenida de 0,36 resultó del uso de 2,0 mg/L TDZ, en las concentraciones de TDZ usadas no existe grupos estadísticos diferentes, todos los tratamientos pertenecen al grupo letra A, la media más alta para la formación de brotes

respecto al uso de ANA (ácido α – naftalenacético) es la que nos da como resultado 1,30 al utilizar 0 mg/L de ANA y la media más baja de 0,26 obtenida al usar 0,2 mg/L de ANA, en las concentraciones de ANA usadas si existe grupos estadísticos diferentes, dos de los tratamientos pertenecen al grupo estadístico letra A y el tratamiento en el que no se usa la hormona vegetal pertenece al grupo estadístico letra B; ver Tabla 3.3.17.

Las medias que se obtuvieron en los tratamientos en los que se utilizó (Thidiazuron) y ANA (ácido α – naftalenacético), están descritas en los gráficos de densidad de puntos, en la Figura 3.3.18 se observa que la concentración de 0 mg/L de ANA es la mejor respecto a la formación de brotes y en la Figura 3.3.19 la concentración de 1 mg/L de TDZ demostró ser la mejor para la formación de brotes, y en la Figura 3.3.20 la mejor combinación hormonal para la obtención de brotes fue: 0 mg/L de ANA con 0,1 mg/L de TDZ; que fue la que mejor formación de brotes que presentó y 0 mg/L de ANA con 2 mg/L de TDZ.

Tabla 3.3.17- Análisis de varianza y medias para la formación de brotes usando TDZ (Thidiazuron) vs. ANA (ácido α – naftalenacético)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NúmBrotos	106	0,14	0,11	170,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	17,02	3	5,67	5,34	0,0019	
[ANA]	16,62	2	8,31	7,83	0,0007	
[TDZ]	2,51	1	2,51	2,36	0,1272	-0,23
Error	108,34	102	1,06			
Total	125,36	105				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,49117

Error: 1,0621 gl: 102

[ANA]	Medias	n	E.E.	
0,2	0,26	41	0,16	A
0,1	0,50	39	0,17	A
0,0	1,30	26	0,21	B

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NúmBrotos	106	0,14	0,11	170,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	17,22	3	5,74	5,41	0,0017	
[TDZ]	4,21	2	2,10	1,98	0,1428	
[ANA]	12,15	1	12,15	11,46	0,0010	-4,52
Error	108,14	102	1,06			
Total	125,36	105				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,49072

Error: 1,0602 gl: 102

[TDZ]	Medias	n	E.E.	
2,0	0,36	39	0,17	A
0,2	0,64	26	0,21	A
1,0	0,81	41	0,16	A

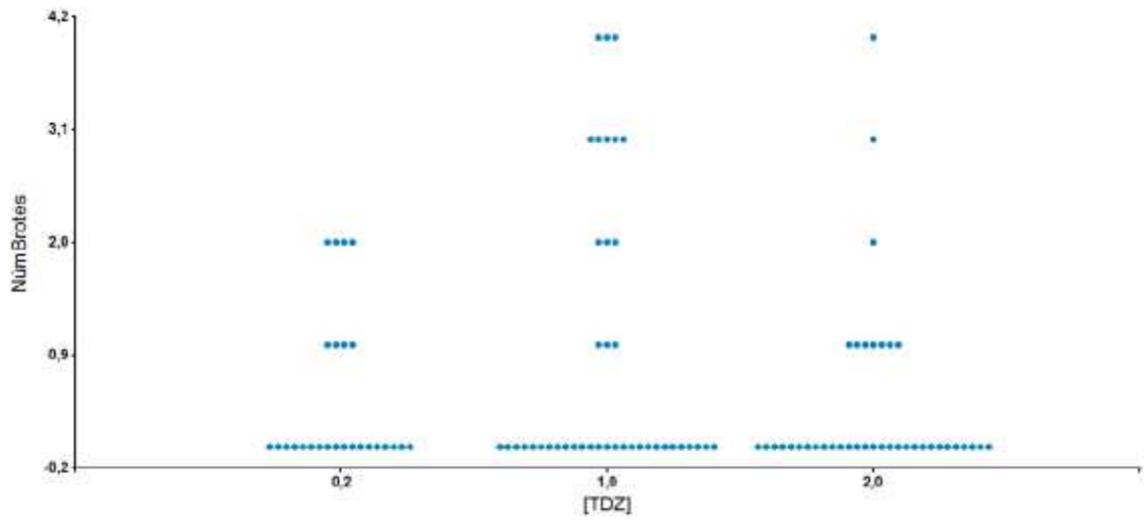


Figura 3.3.19 – Densidad de puntos para las concentraciones de TDZ (2 mg/L, 1 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la formación de brotes

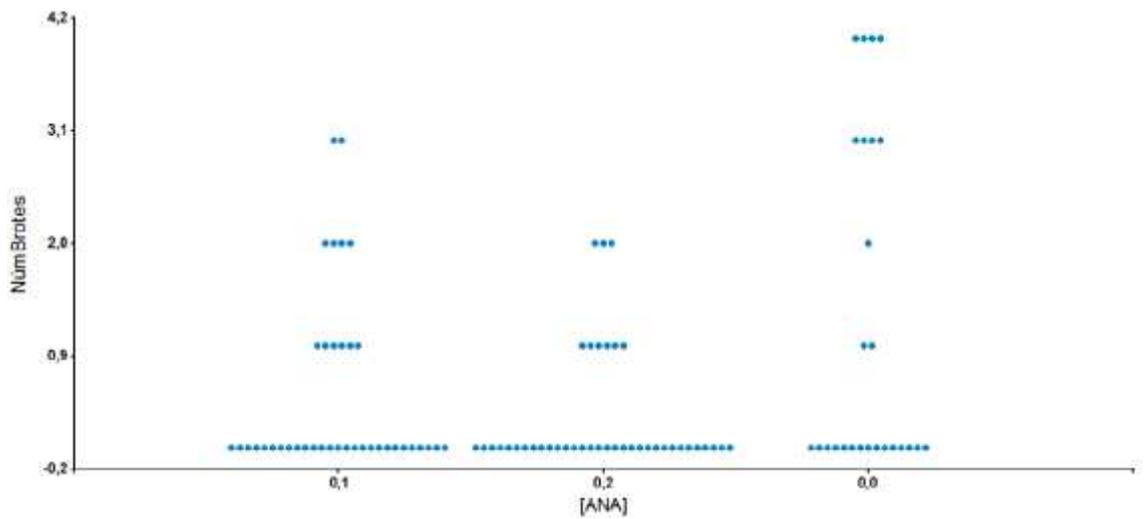


Figura 3.3.18 – Densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0 mg/L) usadas para la formación de brotes

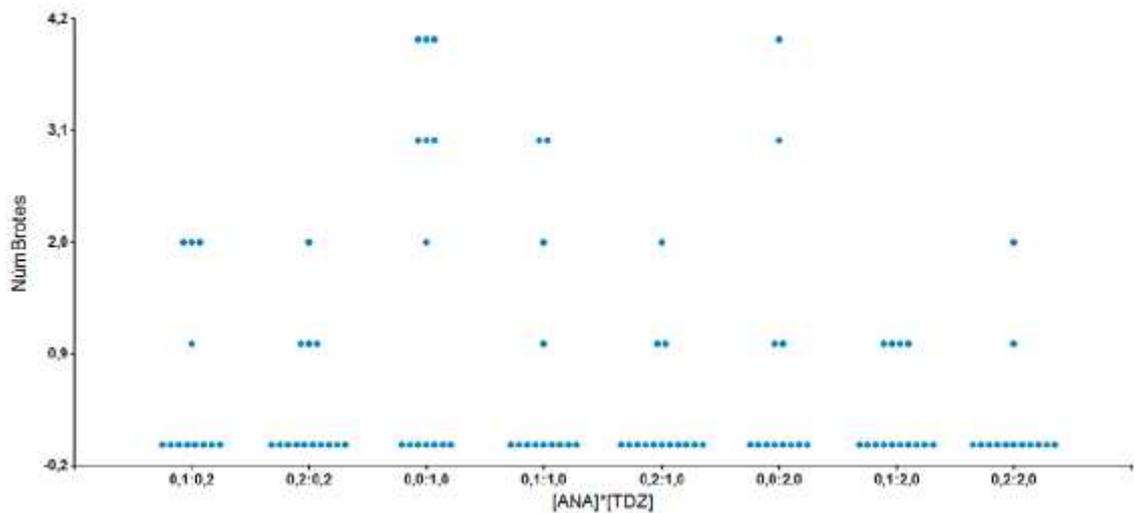


Figura 3.3.20 – Densidad de puntos para las concentraciones de TDZ (2 mg/L, 1 mg/L, 0,2 mg/L) y las concentraciones de ANA (0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0 mg/L) usadas para la formación de brotes

La combinación de las hormonas TDZ vs. ANA y los efectos en cuanto a la formación de brotes, son las siguientes: en las columnas TDZ vs. ANA, en las filas están el número de brotes: 0, 1, 2, 3, 4 ; entonces: 0,2 mg/L TDZ combinado con 0,1 mg/L ANA ; cuatro brotes; 0,2 mg/L TDZ combinado con 0,2 mg/L ANA; cuatro brotes; 1 mg/L TDZ combinado con 0 mg/L ANA; siete brotes; 1 mg/L TDZ combinado con 0,1 mg/L ANA; cuatro brotes; 1 mg/L TDZ combinado con 0,2 mg/L ANA; tres brotes; 2 mg/L TDZ combinado con 0 mg/L ANA; cuatro brotes, 2 mg/L de TDZ combinado con 0,1 mg/L ANA; cuatro brotes, 2mg/L de TDZ combinado con 0,2 mg/L de ANA; dos brotes.

La formación de los brotes en los explantes se describe en la siguiente tabla de contingencia en las columnas las combinaciones de TDZ vs. ANA: 0,2 mg/ L TDZ - 0,1 mg/L ANA, 0,2 mg/L TDZ - 0,2 mg/L ANA, 1 mg/L TDZ - 0 mg/L ANA, 1 mg/L TDZ - 0,1mg/l ANA, 1 mg/L TDZ - 0,2 mg/L ANA, 2 mg/L TDZ - ANA 0 mg/L, 2 mg/L TDZ - 0,1 mg/L ANA, 2 mg/L TDZ - 0,2 mg/L ANA; ver Tabla 3.3.18.

Tabla 3.3.18 – Tabla de contingencia para la formación de brotes usando combinaciones de hormonas: TDZ vs. ANA, valor chi cuadro de pearson para la formación de brotes.

Frecuencias absolutas
En columnas:[TDZ]:[ANA]

NúmBrotos	0,2:0,1	0,2:0,2	1,0:0,0	1,0:0,1	1,0:0,2	2,0:0,0	2,0:0,1	2,0:0,2	Total
0	8	10	7	9	11	8	10	11	74
1	1	3	0	1	2	2	4	1	14
2	3	1	1	1	1	0	0	1	8
3	0	0	3	2	0	1	0	0	6
4	0	0	3	0	0	1	0	0	4
Total	12	14	14	13	14	12	14	13	106

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	41,72	28	0,0460

Longitud de brotes

La longitud alcanzada de los explantes cultivados en la etapa de multiplicación utilizando la combinación de (Thidiazuron) con (ácido α – naftalenacético), se dio desde: 5,89 mm. hasta 46,5 mm.; ver anexo 19, se obtuvo un valor de p de 0,4264 lo que quiere decir que no hay dependencia entre la longitud de brotes y la combinación utilizada de hormonas; ver Tabla 3.3.19.

Tabla 3.3.19 – Valor de chi cuadrado obtenido de la tabla de contingencia en donde se evaluó la longitud de los brotes usando combinaciones de hormonas: TDZ vs. ANA

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	642,98	637	0,4264

Tabla 3.3.20 – Análisis de varianza para la longitud de los brotes usando combinaciones de hormonas: TDZ vs. ANA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LongExplante	106	0,09	0,06	61,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	1312,10	3	437,37	3,20	0,0264	
[TDZ]	430,00	2	215,00	1,57	0,2120	
[ANA]	717,83	1	717,83	5,26	0,0239	-34,75
Error	13925,40	102	136,52			
Total	15237,49	105				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=5,56860

Error: 136,5235 gl: 102

[TDZ]	Medias	n	E.E.	
1,0	17,12	41	1,84	A
0,2	17,71	26	2,37	A
2,0	21,51	39	1,88	A

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LongExplante	106	0,08	0,05	62,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	1234,14	3	411,38	3,00	0,0342	
[ANA]	674,78	2	337,39	2,46	0,0907	
[TDZ]	328,77	1	328,77	2,39	0,1248	2,58
Error	14003,36	102	137,29			
Total	15237,49	105				

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=5,58417

Error: 137,2878 gl: 102

[ANA]	Medias	n	E.E.	
0,2	15,75	41	1,84	A
0,1	20,16	39	1,88	A B
0,0	21,88	26	2,35	B

En el análisis de varianza para la longitud de los explantes el valor de p obtenido para el modelo de ANA fue de 0,0342 y para el modelo de TDZ fue de 0,0264; los valores de para las concentraciones de ANA el valor de p fue:

0,0907; para las concentraciones de TDZ el valor de p fue de: 0,2120, por ello decimos que si existe diferencia estadísticamente significativa, y que las concentraciones de ANA tienen que ver con la longitud alcanzada por los explantes, por ello los tratamientos pertenecen a diferentes grupos estadísticos letra A y letra B, caso contrario como resultó con las concentraciones de TDZ usadas, ya que todos los tratamientos pertenecen a mismo grupo estadístico letra A, las medias que se obtuvieron respecto a la longitud de brotes, la más alta fue de 21,51 usando 2,0 mg/L TDZ y 21,88 usando 0 mg/L ANA; ver Tabla 3.3.20, en la Figura 3.3.21 se observa que la mejor longitud del explante fue al usar 2 mg/l de TDZ; pero no es gráficamente diferente al compararlo con el resto de concentraciones usadas, en la Figura 3.3.22 las concentraciones de ANA que favorecen a la longitud de los explantes fueron la de 0,1 y 0 mg/L, en la Figura 3.3.23 se muestra la mejor combinación hormonal respecto a la longitud alcanzada; no existe diferencia gráficamente destacable.

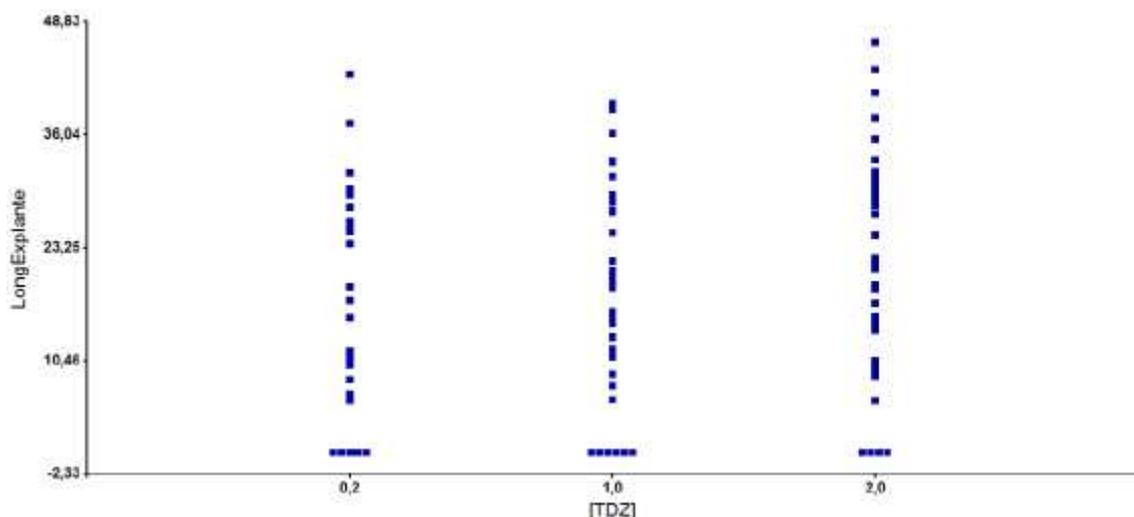


Figura 3.3.21 – Gráfico de densidad de puntos para las concentraciones de TDZ (2,0 mg/L, 1,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes.

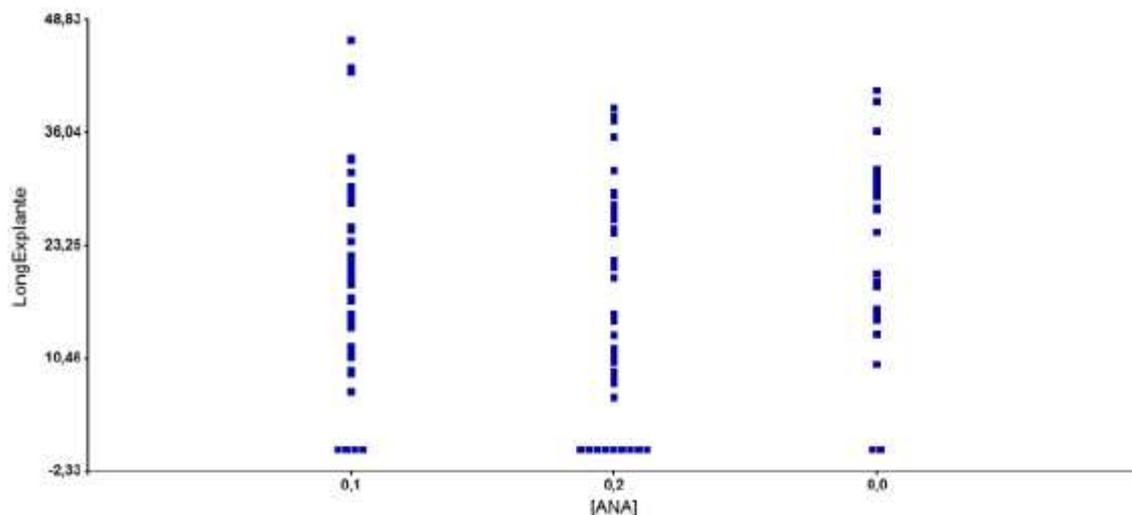


Figura 3.3.22 – Gráfico de densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0 mg/L, 0,1 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes

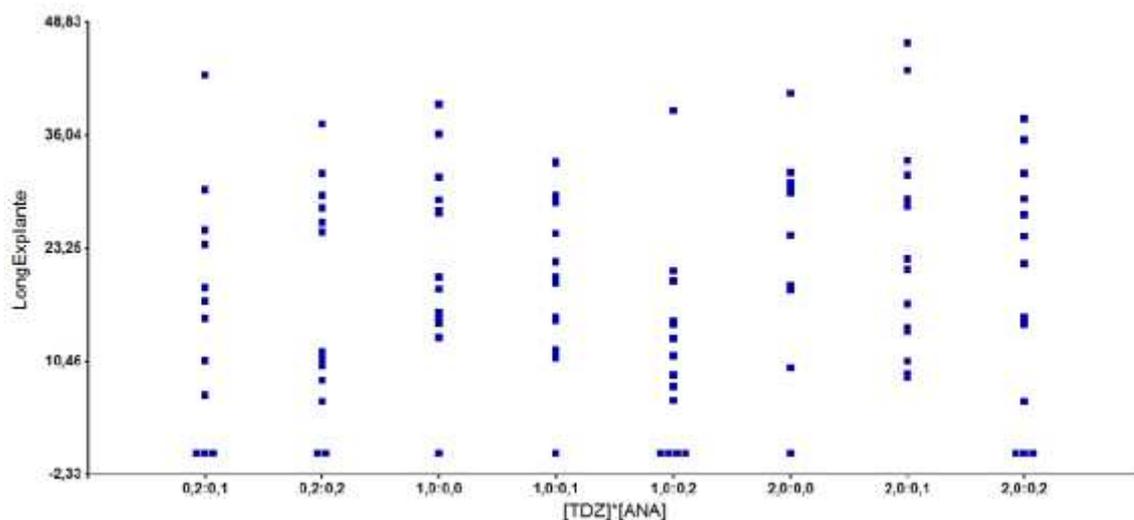


Figura 3.3.23 – Gráfico de densidad de puntos para las concentraciones de ANA (0 mg/L, 0,1 mg/L, 0,2 mg/L) vs. concentraciones de TDZ (2,0 mg/L, 1,0 mg/L, 0,2 mg/L) usadas para la longitud de brotes.

En el anexo 20 se observa el porcentaje de formación de brotes utilizando BAP vs. ANA de 18,42% comparado con TDZ vs. ANA 32,86%;

además el anexo 21; muestra el porcentaje de longitud alcanzada utilizando BAP vs. ANA que fue de: 32,86% comparado con TDZ vs. ANA que fue de: 13.1%.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Etapa I: Establecimiento *in vitro*.

La limpieza de las yemas apicales de Balsa (*Ochroma lagopus*) para retirar hongos y bacterias, se la realizó utilizando un protocolo de desinfección obtenido de experimentos previos realizados en esta investigación.

4.1.1 Etapa de desinfección.

La desinfección en condiciones *in vitro* de las yemas de Balsa-*Ochroma lagopus* se realizó con yemas que se obtuvieron de campo; sometidas y no sometidas a un tratamiento fitosanitario previo; al no ser sometidas al procedimiento fitosanitario se obtuvo resultados de contaminación de 70% a 90%, por lo que se descartó realizar el procedimiento de desinfección *in vitro* sin haber aplicado el tratamiento previo. Según (Abdelnour Ana, Jean Escalant, 1994), materiales vegetales que crecen en el invernadero son más limpios que los que se mantienen en el campo, las yemas de Balsa que se utilizaron como material para la introducción *in vitro* se obtuvieron de plantas que se desarrollaron y controlaron en invernadero, sometidas a un tratamiento fitosanitario con la aplicación de un fungicida de contacto; a una concentración de 0,1% de su principio activo (óxido cuproso) con aplicaciones mensuales cada tres días, según (Castellanos L., 2011) el óxido cuproso manifiesta niveles de inhibición del crecimiento micelial.

Otro factor que influyó en la introducción es el tamaño del explante; según (Abdelnour Ana, Jean Escalant, 1994) entre más pequeño sea el explante a introducir a cultivo *in vitro* menor será la contaminación a eliminar; el tamaño promedio de los explantes obtenidos de las yemas apicales de Balsa

fueron de 3 a 4 cm; este tamaño fue el más adecuado y permitió el establecimiento del tejido y del cultivo.

La primera etapa de desinfección de las yemas apicales de Balsa consistió en probar soluciones de hipoclorito de sodio variando concentraciones y tiempos de inmersión, las concentraciones y los tiempos de inmersión fueron de: 0,5% - 40 min, 1,0% - 30 min, 1,5% - 20 min y 2,5% - 10 min, luego de esta aplicación, se observó en primer lugar que las concentraciones altas de hipoclorito de sodio que fueron usadas son muy drásticas para la mayoría de los explantes ocasionando el necrosamiento del tejido, (Sánchez M., 2004) este efecto puede darse por la característica de potente oxidante que posee, pero en cambio fue muy efectivo en cuanto a desinfección, ya que a estas concentraciones no se presentó contaminación, entonces la relación de la concentración de hipoclorito de sodio con el tiempo de inmersión; resultó en: concentraciones altas con bajos tiempos de inmersión evitan eficazmente la contaminación; pero tienen altos niveles de oxidación y recae en el necrosamiento del explante, ahora; concentraciones bajas de hipoclorito de sodio con tiempos de inmersión elevados evitan la contaminación, la oxidación y el necrosamiento de los explantes; además favoreció la viabilidad, la concentración de 0,5% de concentración de NaClO con un tiempo de inmersión de 40 min obtuvo la media más alta y representativa en cuanto a las variables descritas.

La desinfección fue óptima en cuanto a eliminar infecciones bacterianas que se presentaron en la etapa de introducción en condiciones *in vitro*, pero la contaminación fúngica que presentaron las yemas de Balsa fue difícil de mitigar. Realizada la primera etapa de la desinfección aplicando los tratamientos de desinfección con las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y sus respectivos tiempos de inmersión se obtuvo como al mejor tratamiento al número uno (0.5% NaClO - 40 min).

La desinfección se complementó con el uso de fungicidas, por tener contaminación fúngica persistente, en los explantes que se introdujeron se presentó contaminación fúngica luego de haber incubado los explantes en un

período de alrededor de 15 a 20 días, tiempo en el cual el proceso de desinfección ya es considerado como viable y adecuado para el explante que se está tratando, pero en este caso en este período de tiempo apenas comenzaba a darse muestras de este tipo de contaminación.

Por ello se añadió al hipoclorito de sodio al 0,5% y 40 min. de inmersión, fungicidas capaces de mitigar este tipo de contaminación (fúngica) que se presentó en la Balsa (*Ochroma lagopus*), los fungicidas usados fueron: Captan 0,1%, Óxido cuproso 0,1%, Azoxystrobin; Difenoconazol 0,1% y 0,3%, y con sus respectivas combinaciones; se realizó la aplicación de los fungicidas descritos ya que según (Castellanos L., 2011) y (Malagañón J., 2005); estas concentraciones de Captan, Óxido cuproso, Azoxystrobin y Difenoconazol impide esporulación fúngica y disminuye la producción de conidios¹ notablemente; favoreciendo su erradicación, la composición que mejor resultó obtuvo fue: Captan 0,1% -Óxido cuproso 0,1%- Azoxystrobin; Difenoconazol 0,3%, más la solución de hipoclorito de sodio que funcionó en la etapa de desinfección previa es decir: 0,5% de concentración y 40 minutos de inmersión. los niveles de supervivencia mejoraron y de contaminación disminuyeron.

La viabilidad fue complementada con un proceso mecánico (Figura 2,3), el cual consistió en eliminar los tricomas que recubren en tejido de la Balsa y retirar la mayor cantidad posible de primordios foliares que recubren el tejido meristemático, responsable de la división celular y por ende del desarrollo del explante que es introdujo.

¹Esporas de origen asexual, no flageladas formadas en el ápice o lados de una célula esporógena.

(Beihefte, 1990) Señala: que las yemas de Balsa exhiben en su naturaleza fisiológica un recubrimiento de abundante vello sedoso color verde amarillento denominados tricomas, estos tricomas estaban presentes alrededor de todo los explantes que se utilizaron y fue un limitante para la etapa de desinfección y poder lograr su establecimiento *in vitro*, además el tejido meristemático de la yema apical se encuentra recubierto por primordios foliares que también impiden que el proceso de desinfección sea efectivo; por lo que consideró a continuación la eliminación mecánica de los mismos; es decir, de los tricomas que rodean el tejido y de los primordios foliares.

La eliminación se la realizó en la cámara de flujo laminar posterior al proceso de desinfección, se utilizó un estereomicroscopio para realizar los cortes a los explantes con el propósito de reducir posibles daños que se pueden realizar al material, los cortes fueron longitudinales cuando se trataba de eliminar los tricomas que recubrían el tejido vegetal, la eliminación de los primordios foliares fue meticulosa con el propósito de no maltratar el tejido meristemático y no afectar el proceso de crecimiento y desarrollo del mismo, los cortes realizados a los explantes se los efectuó con material quirúrgico nuevo pues al parecer según (Kyte.L, Kleyn.J, 2003) puede ser unas de las causas de la oxidación de los explantes introducidos, pues el óxido de las hojas de bisturí al parecer contribuyen con este estado; realizar demasiados cortes al material también promueve a que el explante excrete fenoles que al final contribuyen con el proceso de oxidación y como consecuencia no sea viable en la etapa de incubación.

Luego de la aplicación de la mejor combinación de hipoclorito de sodio junto con la mejor combinación de fungicidas se escogió como al mejor tratamiento 14 para el proceso de desinfección de Balsa, obteniendo la media más baja 28,12 (Tabla 3.1.6) en cuanto a contaminación se refiere; entre las medias más bajas 14,88 (Tabla 3.1.7) en cuanto a necrosis y la media más alta 57,00 (Tabla 3.1.8) en cuanto a supervivencia.

El medio de cultivo que se utilizó para el proceso de desinfección fue MS más agar 6,5 g/L; 25 g/L de azúcar, Sulfato de adenina 0,5 mg/L; L – Cisteína

30 mg/L; ácido ascórbico 30 mg/L; Carbón activado 200 mg/L; Inositol 100 mg/L; 50 ul/L de Amistar TOP (Azoxystrobin, Difenconazol); pH 5,7.

El uso de este medio de cultivo suplementado con estos antioxidantes y agentes que contribuyen a disminuir la oxidación que presentó el cultivo de las yemas apicales de Balsa, funcionó para mitigar el consecuente necrosamiento de los explantes introducidos; según (Hernández A., 2001). la oxidación es producto de compuestos fenólicos que normalmente son almacenados en vacuolas, peroxisomas y vesículas que son secretados como un mecanismo de defensa al haber ruptura de las células; estos compuestos se disuelven y causan la inactivación de las enzimas y por eso ocasionan necrosamiento y además en este caso compuestos oxidantes como el hipoclorito de sodio pudieron aumentar este proceso de muerte celular, por ello se justificó la aplicación de los mencionados agentes suplementados en el medio de cultivo.

El uso de carbón activado (Levitus G., 2008) contribuye a la disminución del proceso de oxidación; los gránulos de carbón activado tienen una gran porosidad y por ende capacidad adsorbente para retener fenoles, metabolitos tóxicos de la micro atmósfera y el exceso de reguladores de crecimiento presentes en los medios de cultivo (Sánchez M., 2004) dice que es indispensable para la supervivencia de los meristemos.

Se uso de 25g/L de azúcar (fuente de carbono) con el propósito de disminuir los niveles de oxidación y por ende de necrosamiento; (Cárdenas M., 2002) indica que la sacarosa (azúcar) se convierte por hidrólisis durante la esterilización en dos monosacáridos: glucosa y fructosa; lo que causa cambios en el potencial osmótico del medio de cultivo haciéndolo más negativo, puede darse que al existir mucha concentración de sacarosa puede existir pérdida de presión por mucha concentración de soluto y la célula puede morir, contribuyendo a la necrosis del material vegetal, por eso se justifica en este caso la reducción de la concentración de azúcar. De igual manera ocurre con el Inositol nada mas que este es un azúcar alcohol.

Según (Sánchez M., 2004) la L - cisteína no previene la oxidación, sino que actúa en la rápida remoción de cualquier quinona que se forma; como es un aminoácido puede inducir en el desarrollo de los explantes al ofrecer nitrógeno orgánico, la L-cisteína redujo la oxidación fenólica de los tejidos de Balsa y favoreció a la reducción de la oxidación y por ende al necrosamiento de los explantes introducidos.

El sulfato de adenina (SA) según (Blanco M., 2004) puede inducir a la formación de brotes; tiene actividad parecida a la de una citoquinina, responsable además del crecimiento del explante y es comunmente utilizado en plantas tropicales, como se la empleó en la introducción *in vitro* de Balsa, en donde se obtuvo buenos resultados en cuanto a la respuesta del cultivo.

(Padilla B., 2001) indica que el ácido ascórbico agregado al medio de cultivo no tiene un buen desempeño en el control de la oxidación y puede deberse a que el ácido ascórbico es termolábil, ya que este fue agregado al medio de cultivo y luego fue autoclavado; pudo verse afectado y haber perdido su capacidad antioxidante, se recomienda esterilizarlo por filtración.

4.1.2 Etapa de Inducción

En esta etapa el propósito fue inducir la formación de brotes a partir de las yemas apicales de Balsa *Ochroma lagopus* utilizando concentraciones de la citoquinina 6 bencil amino purina BAP: 0,1 mg/L; 0,2 mg/L; 0,3 mg/L; 0,4 mg/L; 0,5 mg/L, lo que se obtuvo es que la concentración de 0,5 mg/L de BAP, esta fue la concentración más adecuada para el propósito de establecer el cultivo *in vitro* de Balsa y por supuesto obtener brotes; obteniendo una media de 88,57 que es la más alta en lo que se refiere a formación de brote (Tabla 3.2.3).

La concentración de 0,1 mg/L de BAP resultó en la idónea para el apareamiento de callo en esta especie; obteniendo una media de 87,78 (Tabla 3.2.2) la mejor comparada con el resto de concentraciones.

Las concentraciones de BAP: 0,3 mg/L; 0,4 mg/L en lo que se refiere a la obtención de brotes no presentaron ninguna relevancia, en contraste con la concentración de BAP de 0,2 mg/L (Tratamiento 2) que al parecer induce a la formación de brotes de forma eficiente al igual que la concentración de 0,5 mg/L de BAP(Tratamiento 5) (Figura 3.2.3), tal vez pueda deberse a una compensación hormonal ocasionada por la hormona provista en el medio de cultivo en condiciones *in vitro* y la carga de hormona interna que posee la especie; en este caso citoquinina, (Jordan M., 2006) dice que las citoquininas endógenas pueden inducir y fijar un tipo de expresión morfogénica de acuerdo a los niveles en que se encuentre en sus tejidos; sin embargo especialmente bajo condiciones *in vitro* las células vegetales inician procesos de diferenciación bajo estas combinaciones hormonales, esto puede justificar el tipo de respuesta obtenido en esta investigación; siguiendo esta idea, además en la etapa de multiplicación curiosamente se obtuvo la misma respuesta con esta concentración específica de citoquinina (BAP) suministrada al medio de cultivo, tratamiento tres (BAP 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L), esta respuesta obtenida con estas concentraciones de BAP de 0,2mg/L y 0,5mg/L en esta especie, sugiere que son las adecuadas para acrecentar la formación de brotes en la fase de multiplicación.

Esta etapa fue evaluada con el propósito de establecer el cultivo de las yemas apicales de Balsa en condiciones *in vitro*, mas en la siguiente etapa las concentraciones usadas de citoquinina difieren, para tener un rango más amplio de hormona aplicado en el experimento y poder evaluar la formación de brotes; con el objetivo de mejorar la capacidad de multiplicación de la especie en estas condiciones.

4.1.3 Etapa de multiplicación.

4.1.3.1 BAP vs. ANA

Número de brotes

En esta etapa se planteó diez tratamientos: tratamiento testigo-tratamiento uno (BAP 0 mg/L –ANA 0 mg/L), tratamiento dos (BAP 0,2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento tres (BAP 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento cuatro (BAP 0,2 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento cinco (BAP 1 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento seis (BAP 1 mg/L- ANA 0,1 mg/L), tratamiento siete (BAP 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento ocho (BAP 2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento nueve (BAP 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento diez (BAP 2 mg/L – ANA 0,2 mg/L) (Tabla 3.3.1)

Los resultados obtenidos fueron: tratamiento tres (BAP 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L); presentó la más alta formación de brotes con un porcentaje de 18,42% seguido del tratamiento diez que fue del 15,79%, a pesar de que estadísticamente las concentraciones de BAP y ANA usadas para este experimento no son diferentes, (Tabla 3.3.5) y (Tabla 3.3.7) las concentraciones de BAP: 0,2 mg/L y 2 mg/L favorecen a la formación de brotes; según (Barna.K, 2000) la inducción de brotes en rosáceas como la manzana; usando TDZ en rango de 5uM – 10uM es superior en cuanto a la inducción de brotes generada por BAP en el mismo rango de 5uM – 10 uM, en nuestro caso 0,2 mg/L BAP equivale a 0,9uM y 2mg/L BAP equivale a 9uM; que se encuentran dentro del rango descrito por (Barna.K, 2000) las concentraciones usadas de BAP en este experimento comparadas con las de TDZ, fueron poco eficientes en cuanto a la inducción de brotes generada por TDZ.

La concentración de citoquinina (BAP) en relación de auxina (ANA) usada en esta investigación fue de 8 a 1, (Schmülling T., 2004) señala que la cantidad de citoquinina en relación de auxina determina la diferenciación celular del tejido en formación de brotes o raíces; por esto dice además que mayor concentración de citoquinina con respecto a auxina promueve la formación de brotes.

Las plantas superiores al poseer una mejor carga hormonal endógena comparada con plantas herbáceas, según (Schmülling T., 2004) no requieren que se les suministre una elevada carga hormonal para establecerlas y lograr su multiplicación en condiciones *in vitro*, por ello el resultado obtenido es favorable para la micropropagación *in vitro* de Balsa, es decir el tratamiento dos es el más adecuado para la etapa de multiplicación al usar BAP vs. ANA en cuanto a inducción de brotes se refiere.

Longitud de los explantes

Para esta variable se analizó los tratamientos: tratamiento testigo-tratamiento uno (BAP 0 mg/L –ANA 0 mg/L), tratamiento dos (BAP 0,2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento tres (BAP 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento cuatro (BAP 0,2 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento cinco (BAP 1 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento seis (BAP 1 mg/L- ANA 0,1 mg/L), tratamiento siete (BAP 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento ocho (BAP 2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento nueve (BAP 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento diez (BAP 2 mg/L – ANA 0,2 mg/L) (Tabla 3.3.1)

La mejor longitud de los explantes, se obtuvo al usar el tratamiento siete (BAP 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L) con una altura promedio de 31,32 mm. y porcentaje de 14,20% que es el más alto en comparación con el resto de tratamientos aplicados; se logró un valor de chi cuadrado de pearson de 0,4145 para esta variable; es decir los tratamientos aplicados son diferentes al usar combinaciones específicas de BAP vs. ANA para elongación de brotes, (Barna.K, 2000) explica que los brotes inducidos en manzana por TDZ poseen longitud en promedio menor de 5 a 8 mm. que los brotes inducidos por BAP con longitud promedio de 11 mm; al igual que esta investigación en donde se presentó la misma relación, mayor elongación al usar BAP que al usar TDZ.

Según (Saucedo S., 2008) una pequeña cantidad de citoquinina puede ser sintetizada por los brotes en crecimiento y además se sabe que es insuficiente para inducir el crecimiento y la elongación *in vitro* de yemas y

brotos, por esta razón los medios de cultivo utilizados en micropropagación de *Ochroma lagopus* contienen un suplemento de citoquinina que favorece al crecimiento de los explantes; por ello al utilizar una concentración intermedia de BAP 1mg/L y una concentración baja de BAP 0,2 mg/L y ambas concentraciones combinadas con auxina ANA 0,2mg/L en nuestro caso favoreció a la elongación de los brotes, esta interacción entre citoquinina y auxina es la más adecuada para la elongación de los brotes en *Ochroma lagopus*, en condiciones *in vitro*.

4.1.3.2 TDZ vs. ANA

Número de brotes

Se utilizaron los siguientes tratamientos: tratamiento testigo-tratamiento uno (TDZ 0 mg/L –ANA 0 mg/L), tratamiento dos (TDZ 0,2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento tres (TDZ 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento cuatro (TDZ 0,2 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento cinco (TDZ 1 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento seis (TDZ 1 mg/L- ANA 0,1 mg/L), tratamiento siete (TDZ 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento ocho (TDZ 2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento nueve (TDZ 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento diez (TDZ 2 mg/L – ANA 0,2 mg/L)(Tabla 3.3.2)

El tratamiento utilizado con el que se obtuvo la mejor formación de brotes fue el tratamiento cinco: (TDZ 1 mg/L – ANA 0 mg/L); con un promedio de 23 brotes en cada repetición y con un porcentaje de 32,86% respecto al resto de tratamientos usados, esto de acuerdo con (Huetteman.C, Preece.J, 1993) que indica que altas tasas de formación de brotes se puede lograr en varias especies maderables al usar concentraciones de TDZ en un rango de 0,1nM-10uM, que en nuestro caso fue de:1mg/L equivalente a 4,5uM; concentración que se encuentra dentro del rango según lo descrito por (Huetteman.C, Preece.J, 1993) y que en esta investigación resultó eficiente para *Ochroma lagopus*, comparada con la efectividad de otra citoquinina (BAP).

En la aplicación de los tratamientos usando la combinación de TDZ vs. ANA; no existe diferencia estadísticamente significativa en cuanto se refiere a las concentraciones de TDZ usadas por que se obtuvo un valor de p de chi cuadro de pearson de: 0,10 (Tabla 3.3.14), es decir los tratamientos son iguales, por el contrario si existe diferencia estadísticamente significativa en el uso de las concentraciones de ANA; el valor de p de chi cuadro de pearson fue: 0,0057 (Tabla 3.3.16). origina mayor eficacia en cuanto al desempeño de TDZ en la fase de formación de brotes en la multiplicación, esto se puede ratificar con un incremento en la síntesis de citoquininas endógenas de los explantes de Balsa para estimular la formación de brotes; según (Soza J., 2008) el TDZ es un regulador de crecimiento con actividad citoquinética, estimula la conversión de nucleótidos de citoquininas a nucleósidos favoreciendo un desajuste de la normal inhibición de la biosíntesis de citoquininas, favoreciendo a una sobre expresión de las fitohormonas endógenas logrando la estimulación de la proliferación de brotes.

En esta investigación la concentración de TDZ que favoreció a la formación de brote fue la de 1 mg/L, según (Huetttman.C, Preece.J, 1993) la dosis de thidiazuron es crítica para originar respuesta, bajas concentraciones pueden originar sólo la proliferación de brotes axilares; altas concentraciones puede originar brotes adventicios y brotes axilares, además de ser el más usado en regeneración de especies leñosas, por ello la concentración de TDZ descrita es la adecuada en este experimento para la cumplir el propósito.

Longitud de los explantes

Se usaron los tratamientos: tratamiento testigo-tratamiento uno (TDZ 0 mg/L –ANA 0 mg/L), tratamiento dos (TDZ 0,2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento tres (TDZ 0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento cuatro (TDZ 0,2 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento cinco (TDZ 1 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento seis (TDZ 1 mg/L- ANA 0,1 mg/L), tratamiento siete (TDZ 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L), tratamiento ocho (TDZ 2 mg/L – ANA 0 mg/L), tratamiento nueve (TDZ 2 mg/L – ANA 0,1 mg/L), tratamiento diez (TDZ 2 mg/L – ANA 0,2 mg/L)(Tabla 3.3.2).

Las longitudes que se alcanzaron fueron: 23,68 mm. con el tratamiento ocho TDZ 2 mg/L – ANA 0 mg/L, que es la más alta alcanzada al usar TDZ, comparada con la altura alcanzada con el tratamiento siete BAP 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L que fue de 31,32 mm. al usar BAP, según (Ledbetter.D, 2004) el TDZ en altas concentraciones promueve la formación de brotes pero inhibe y retarda su elongación, por esto se justifica los resultados obtenidos al evaluar esta variable usando TDZ en la etapa de multiplicación de *Ochroma lagopus*.

Al realizar el análisis de varianza existe diferencia estadísticamente significativa para las concentraciones de ANA para esta variable; se obtuvo un valor de p de 0,03, es decir que hay diferencia entre los tratamientos , este nos indica que al no usar o reducir la concentración de esta auxina en el medio de cultivo promueve a la elongación del explante formado, lo que sugiere que no cumple ninguna interacción con el TDZ para la elongación de los explantes en este experimento, al contrario la elongación de estos se vió afectada por las concentraciones de thidiazuron usadas en el ensayo, en esto coincide (Huetteman.C, Preece.J, 1993) diciendo que la inhibición de la elongación de los brotes puede deberse a las concentraciones altas de thidiazuron; concentraciones elevadas de TDZ favorecen a la formación de callo.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. El tratamiento fitosanitario aplicado a las plántulas de Balsa previa su introducción es determinante para reducir la contaminación en condiciones *in vitro*; la aplicación de 0,1% de óxido cuproso con aplicaciones mensuales cada tres días.
2. El mejor tratamiento de desinfección para las yemas apicales de Balsa (*Ochroma lagopus*) fue el tratamiento 14: Captan 0,1% -Oxido cuproso 0,1%- Azoxystrobin; Difenconazol 0,3%, (15 min) más la solución de hipoclorito de sodio: 0,5% de concentración y 40 minutos de inmersión, obteniendo la media más baja en cuanto a contaminación (28,12), entre las bajas en cuanto a necrosis (14,88) y la mejor media en cuanto a supervivencia (57,00).
3. La adición de Sulfato de Adenina 0,5 mg/L; L – Cisteína 30 mg/L; Ácido ascórbico 30 mg/L; Carbon activado 200 mg/L al medio de cultivo contribuyó a la reducción del proceso de oxidación de los explantes de Balsa en la etapa de desinfección.
4. La desinfección mecánica que consistió en retirar los primordios foliares del tejido meristemático de la zona apical y la remoción de los tricomas que recubrían el material a introducir contribuyo a mejorar la desinfección.
5. La mejor dosis de 6 – bencil amino purina (BAP) utilizada en la etapa de inducción fue la de 0,2 mg/L que fue la adecuada para regenerar brotes en los explantes de Balsa.
6. La mejor combinación de citoquinina vs. auxina para la obtención de brotes fue: TDZ vs. ANA (TDZ 1 mg/L – ANA 0 mg/L); con 23 brotes en promedio por cada repetición comparada con BAP vs. ANA (BAP

0,2mg/L – ANA 0,1 mg/L) en donde se obtuvo 7 brotes en promedio por cada repetición.

7. La mejor combinación de citoquinina vs. auxina para la elongación de brotes fue: BAP vs. ANA (BAP 1 mg/L – ANA 0,2 mg/L) con una altura promedio de 31, 32 mm por cada repetición comparada con TDZ vs. ANA (TDZ 2 mg/L – ANA 0 mg/L) en donde se obtuvo una altura promedio de 23,68 mm en promedio por cada repetición.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda prolongar el tratamiento fitosanitario previo a la introducción *in vitro* de las yemas apicales de Balsa, usando concentraciones bajas de fungicida y además el uso de un fungicida sistémico.
2. Aplicar un rango más amplio al evaluar citoquinina vs. auxina en la etapa de multiplicación de yemas apicales de Balsa, para poder determinar de mejor forma la concentración adecuada para la etapa de multiplicación en la especie.
3. Retirar los explantes del medio de cultivo que contiene TDZ en un período máximo de 30 días para evitar enanismo irreversible de los explantes que están siendo multiplicados.
4. Utilizar la información generada en esta investigación para la introducción *in vitro* de especies leñosas y de esta forma contribuir en la reducción de la contaminación y la necrosis y por su puesto poder preservar especies de importancia comercial así como las que se encuentren en peligro de extinción.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Abdelnour Ana, Jean Escalant. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de Tejidos Vegetales*.
- 2 Abdelnour.A, E. (1994). Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. En E. Abdelnour.A, *Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales* (págs. 1-15). Orton IICA/CATIE.
- 3 Azcón.J, Talón. M. (2000). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. (E. U. Barcelona, Ed.) Barcelona: McGraw-Hill.
- 4 Beihefle. (1990). Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis.
- 5 Beihefte. (1990). Ochorma pyramidale. *Reportorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* , 3.
- 6 Blanco M., V. R. (2004). Micropropagación de Philodendron sp.(posiblemente P. corcovadense). *Agronomía costarricense* , 28 (001), 39 - 46.
- 7 Blilou.I, X. W. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* , 39 - 44.
- 8 Cárdenas M., V. A. (2002). Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación in vitro. *Fitotécnica mexicana* , 25 (002), 213 - 217.
- 9 Castellanos L., M. B. (2011). Efecto *in vitro* de siete fungicidas químicos sobre Beauveria bassiana (BALS.) VUIL. *Fitosanidad* , 15 (1), 38.
- 10 Castillo A. (2004). Propagación de las plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología INIA*. Las brujas.
- 11 Cevallos G, Vítores Pérez M. (2009). PROYECTO DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE Ochroma pyramidale (cav. ex lamb.)

Urban, Cordia alliodora (ruiz & pav.) oken PARA EL FOMENTO DE PLANTACIONES EN LA ZONA SUR DE MANABÍ - ECUADOR. VI *Simposio Internacional Sobre Manejo Sostenible de Recursos Forestales*, (pág. 6). Manabí.

- 12 Cubero.J. (2003). *Introducción a la mejora genética vegetal* (Segunda ed.). España: Mundi Libros.
- 13 Doorn. V, S. (1997). Abscission of flowers and floral parts. *Journal of Experimental Botany* , 821 - 837.
- 14 Esmon.C, U. (2005). Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism. *Planta,Int.J.Dev.Biol* , 665 - 674.
- 15 FAO. (2002). Especies seleccionadas para la forestación, eucalipto tropical, teca, melina, pino, caribe, guayacan, laurel,balsa,eucalipto globulos. (O. r. Pacífico, Ed.)
- 16 Hernández A., G. A. (2001). Establecimiento *in vitro* de Bambusa vulgaris (Bambú amarillo). *Instituto Tecnológico de Costa Rica* , 24.
- 17 http://omv_fcien_edu.uy, d. (2002). Hormonas vegetales: reguladores del crecimiento y desarrollo., (pág. 58). Montevideo.
- 18 Huettman.C, Preece.J. (1993). Thidiazuron:a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* , 105 - 119.
- 19 Jordan M., C. J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En C. J. Jordan M., *Fisiología vegetal* (págs. 1 - 28). La Serena, Chile: F.A.squeo & L.Cardemil.
- 20 Jordán. M, C. J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocinas. En C. Saqueo. F.A., *Fisología Vegetal* (pág. 28). La Serena: Ediciones universidad de la Serena.
- 21 K. Francis, John. (2002). Ochroma Pyramidale, Balsa.
- 22 Kakimoto.T. (2003). Biosynthesis of cytokinins. *J Plant Research* , 233-239.

- 23** Khawar.K, S. U. (2004). Effect of Thidiazuron on Shoot Regeneration from different explants of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) via Organogenesis. (F. o. Department of field crops, Ed.) *Tubitak* , 28, 421 - 426.
- 24** Kurina, disponible:bd.unsl.edu.ar. (2009). *Crecimiento y cultivo Vegetal*.
- 25** Kyte.L, Kleyn.J. (2003). *Plants from test tubes* (Third ed.). Oregon,Portland: Timber press.
- 26** Landa A , Mendizábal J,Márquez J. (2008). EL MEJORAMIENTO GENÉTICO FORESTAL Y LAS PRUEBAS ESTABLECIDAS EN VERACRUZ. (F. Veracruzana, Ed.) *Redalyc, Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal* , 10 (1), 4.
- 27** Levitus G., E. V. (2008). *Bioteología y mejoramiento vegetal II*. Buenos aires: INTA.
- 28** Ljung.K, Aik.H, Kowalczyk.M. (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolims and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* , 309 - 332.
- 29** Madepron, P. a. (2011). *Balsa*. Guayaquil: Madepron.
- 30** MAGAP, M. d. (2000). *Informe técnico, Censo Agropecuario*. Ecuador.
- 31** Malagañon J., C. E. (2005). Materias activas y preparados. En C. E. Malagañon J., *Productos fitosanitarios* (pág. 14). Ocapa.
- 32** Maxwell.P, J. C. (2007). The mode of action of thidiazuron:auxins,indoleamines,and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. *Plant Cell* , 1481 - 1490.
- 33** Mejia. R. (1987). *Cultivo in vitrode plantas de papa*. Lima: La molina.
- 34** Mok.M.C, M. A. (1987). Cytokinin activity of N-Phenyl-N'-1,2,3-Thidiazol-5-Ylurea (Thidiazuron). (P. Press, Ed.) *Phytochemistry* , 21 (7), 1509 - 1511.

- 35** Nieto V, Rodriguez J. (2003). Bombacaceae (KAPOK-TREE FAMILY). *Corporacion Nacional de Investigacion of Forestal* , 2, 585.
- 36** Normanly.J. (1997). Auxin metabolism. En *Physiologia Plantarum* (págs. 431 - 442).
- 37** Obregon. C. (2005). La Balsa una especie con madera. *Revista el mueble y la madera* , 20-22.
- 38** Padilla B. (2001). *Uso de la L cisteína y ácido ascórbico para reducir la oxidación durante el establecimiento y la multiplicación in vitro de ápices meristemáticos de tres cultivares de plátano(Musa ssp.)incubados bajo luz y oscuridad.* Honduras: Zamorano.
- 39** Pérez.J, Rodríguez.L et al. (2004). Formación de callos en *Phaseolus vulgaris* L cv.Turrialba-4 con Thidiazuron y ácido 2,4-diclorofenoxiacético. (I. d. Villas, Ed.) *Biotecnología Vegetal* , 4, 233 - 236.
- 40** Pfluger.J, Zambryski.P. (2004). The role of SEUSS in auxin response and floral organ patterning. *Development* , 4697 - 4707.
- 41** Pierik. R.L.M. (1997). *In vitro culture of Higher plants.* Springer.
- 42** Pierik.R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores.* (T. L.M.S. Ayerbe, Ed.) Mundi-Prensa.
- 43** Pollman. et al. (2003). *Molecular cloning and characterization of an amidase from Arabidopsis thaliana capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid.*
- 44** Rashotte.A, Poupart.J. (2003). Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in Arabidopsis. *Plant Physiology* , 502 - 531.
- 45** Roca W, Mroginski L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones.* (CIAT, Ed.) Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

- 46** Rojas Salvador, G. J. (2008). *Propagación asexual de plantas, conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas*. (Pronatta, Ed.)
- 47** Sánchez M., S. J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *UDO Agrícola* , 21-26.
- 48** Sathyanarayana. B, V. D. (2007). *Plant tissue culture*. India: I.K.International.
- 49** Saucedo S., R. L. (2008). Efecto de los reguladores de crecimiento para la propagación *in vitro* de la Malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). *Ciencia y tecnología* (1), 17 - 21.
- 50** Schmülling T. (2004). Cytokinin. En Schmülling T., *In Encyclopedia of Biological Chemistry* (pág. 7). Berlin: Eds. Lennarz, W., Lane, M.D.
- 51** Shan.X, Li.D, Qu.R. (2000). Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley. (S. & Department of Plant, Ed.) *In vitro cell* , 1 - 4.
- 52** Soza J., D. S. (2008). Efecto del CPPU(N-(2-cloro-4-piridil)-N-Phenylurea) y Thidiazuron((N'-phenyl-N'-(1,2,3-Thidiazol-5-yl)-urea), Drop) sobre la calidad y condición en cosecha postcosecha en cvs.thompson seedless y red globe. 13.
- 53** Visser.C, Javed.A, Gill R. (1992). Morphoregulatory Role of Thidiazuron. (U. o. Department of Horticultural Science, Ed.) *Plant Physiol* , 1704 - 1707.
- 54** Whitmore.T, Wooh-Khoon.G. (1993). Growth Analysis of the seedlings of Balsa, *Ochroma lagopus*. *New Phytol* , 95, 305 - 311.
- 55** Zahoor.A, Faheem.A. (2009). Effect of thidiazuron (TDZ) on *in vitro* micropropagation of *Solanum tuberosum* L. cvs. desiree and cardinal. (U. o. Lahore, Ed.) *Department of Botany* , 1 - 5.

56 Zhao. *et al.* (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3, *Genes and Development* 16. 3100 - 3112.

