

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ESTRATEGIA DE PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Aechmea fasciata* PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS COMPLETAS.

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

RUTH VALERIA VALLEJO TIPANTA

SANGOLQUÍ, JULIO DE 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Ruth Valeria Vallejo Tipanta

COORDINADOR DE CARRERA

Ing. Tatiana Páez

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Carlos Orozco Bravo

Sangolquí, 17 de julio del 2012

CERTIFICACIÓN

M. Sc. Mónica Jadán

Ing. Pedro Romero

Certifican:

Que el trabajo titulado: Estrategia de propagación *In vitro* de *Aechmea fasciata* para la regeneración de plantas completas, elaborado por la señorita RUTH VALERIA VALLEJO TIPANTA como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera 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 tiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Ruth Valeria Vallejo Tipanta que lo entregue a la Ing. Tatiana Páez, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 17 de julio del 2012.

M. Sc. Mónica Jadán
DIRECTOR

Ing. Pedro Romero
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Ruth Valeria Vallejo Tipanta

Declaro que:

El proyecto de grado denominado: “Estrategia de propagación *In vitro* de *Aechmea fasciata* para la regeneración de plantas completas”, 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, 17 de julio del 2012.

Ruth Valeria Vallejo Tipanta

AUTORIZACIÓN

Yo, Ruth Valeria Vallejo Tipanta

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército, la publicación, en la biblioteca virtual de la institución del trabajo “Estrategia de propagación *In vitro* de *Aechmea fasciata* para la regeneración de plantas completas”, cuyo contenido y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 17 de julio del 2012

Ruth Valeria Vallejo Tipanta

DEDICATORIAS

A Dios por ser mi Creador.

A mis padres Gonzalo y Cristina, porque comparten conmigo esta satisfacción.

A mis hermanos que son un ejemplo en mi vida.

A mis pequeñas sobrinas Darlita y Gabrielita por llenarme de momentos inolvidables.

R. Valeria Vallejo T.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la vida y la oportunidad de ser cada día mejor a través de mis estudios.

A mis padres por darme su apoyo incondicional a través de su esfuerzo diario.

A mis hermanos Ma. Isabel y Gabriel que son las personas más importantes en mi vida, gracias por ser mis segundos padres.

A mi Directora M. Sc. Mónica Jadán y mi Codirector Ing. Pedro Romero por facilitar parte de su conocimiento y tiempo para ayudarme en el progreso de mi tesis.

A la empresa AGROBIOTECH, por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto para terminar mi carrera profesional.

A la Ing. Ivonne Vaca por haberme prestado su tiempo y además brindarme su amistad para poder realizar mi trabajo.

A mis amigas y hermanas: Hipa, Andre Merino, Cris Acuña, Andre Manzano y Cris Albán por compartir conmigo momentos inolvidables durante la carrera universitaria y formar parte de mi vida.

A todos mis primos, primas, tíos y tías; que con una palabra de aliento hicieron que continúe con mi trabajo.

R. Valeria Vallejo T.

CONTENIDO

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iv
AUTORIZACIÓN.....	v
DEDICATORIAS	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
LISTADO DE TABLAS	xv
LISTADO DE FIGURAS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxii
RESUMEN	xxiii
ABSTRACT	xxiv
1. Formulación del problema.....	2
1.1. Justificación	3
1.2. Objetivos de la investigación.....	4
1.2.1. Objetivo general.....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	4
1.3. Marco teórico	5
1.3.1. Generalidades	5
1.3.2. <i>Aechmea fasciata</i>	5
1.3.3. Descripción botánica	6
1.3.4. Distribución geográfica	6
1.3.5. Ciclo de vida	7
1.3.6. Usos	8
1.3.7. Componentes químicos	9
1.3.8. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	10
1.4.8.1. Medio de cultivo.....	12
1.4.8.2. Reguladores de crecimiento	12
1.4.8.2.1. Auxinas	13
1.4.8.2.2. Citoquinas.....	13

1.4.8.3.	Agentes gelatinizadores.....	14
1.4.8.4.	Factores físicos.....	14
1.3.9.	Etapas de la micropropagación	15
1.4.9.1.	Etapa 0: Selección de la planta donadora	15
1.4.9.2.	Etapa 1: Establecimiento del medio de cultivo <i>in vitro</i>	16
1.4.9.3.	Etapa 2: Multiplicación.....	16
1.4.9.4.	Etapa 3: Enraizamiento	17
1.4.9.5.	Etapa 4: Aclimatación de las plántulas	17
1.4.10	Micropropagación de especies ornamentales.....	18
1.4.	Sistema de hipótesis.....	18
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS		19
2.1.	Participantes	19
2.2.	Zona de estudio	19
2.3.	Período de investigación.....	19
2.4.	Diseño experimental	19
2.4.1.	Fase de desinfección	19
2.4.2.	Fase de establecimiento <i>in vitro</i>	21
2.4.3.	Fase de multiplicación.....	22
2.4.4.	Fase de enraizamiento.....	23
2.5.	Desarrollo del experimento	24
2.5.1.	Fase de preparación	24
2.5.1.1.	Selección del material vegetativo	24
2.5.2.	Fase de desinfección	25
2.5.2.1.	Métodos de desinfección	26
2.5.2.2	Medio de cultivo	27
2.5.2.3	Condiciones de cultivo	27
2.5.3.	Fase de introducción.....	27
2.5.3.1.	Medio de cultivo.....	28
2.5.3.2.	Condiciones de cultivo.....	28

2.5.4.	Fase de multiplicación.....	29
2.5.4.1.	Medio de cultivo.....	29
2.5.4.2.	Condiciones de cultivo.....	30
2.5.5.	Fase de enraizamiento.....	30
2.5.5.1.	Medio de cultivo.....	31
2.5.5.2.	Condiciones de cultivo.....	32
2.6.	Análisis económico para la regeneración de plantas de <i>Aechmea fasciata</i>	32
2.7.	Equipos y materiales.....	32
2.7.1	Material vegetal.....	32
2.7.2	Materiales de laboratorio.....	32
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....		34
3.1.	Etapa de desinfección.....	34
3.1.1.	Contaminación.....	34
3.1.2.	Fenolización.....	38
3.1.3.	Mortalidad.....	42
3.2.	Fase de establecimiento.....	43
3.2.1.	Adaptabilidad.....	43
3.2.2.	Contaminación.....	45
3.2.3.	Longitud del explante.....	46
3.3.	Fase de multiplicación.....	48
3.3.1.	Número de brotes.....	49
3.3.2.	Longitud de brotes.....	52
3.3.3.	Contaminación y mortalidad de explantes.....	55
3.4.	Enraizamiento.....	55
3.4.1.	Longitud de la raíz.....	56
3.4.2.	Longitud del explante.....	58
3.4.3.	Color del explante.....	59

3.5. Determinación de la estrategia más económica para la regeneración de plantas de <i>Aechmea fasciata</i>	61
3.5.1 Fase de desinfección	62
3.5.1.1 Costo por tratamiento.....	63
3.5.1.2 Costos por fase.....	64
3.5.2 Fase de introducción.....	64
3.5.2.1. Costos por tratamiento	65
3.5.2.2. Costos por fase.....	65
3.5.3 Fase de multiplicación.....	66
3.5.3.1. Costo por tratamiento	67
3.5.3.2. Costo por fase	67
3.5.4 Fase de enraizamiento.....	67
3.5.4.1 Costo por tratamiento.....	68
3.5.4.2. Costo por fase	69
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	70
4.1. Etapa I: Desinfección	70
4.1.1. Explantes contaminados	70
4.2.1. Fenolización y mortalidad	71
4.2. Etapa II: Introducción	72
4.2.1. Adaptabilidad	72
4.2.2. Longitud del explante	73
4.3. Etapa III: Multiplicación	73
4.3.1. Número de brotes	73
4.3.2. Longitud del explante.....	74
4.3.3. Contaminación y mortalidad.....	74
4.4. Etapa IV: Enraizamiento.....	75
4.4.1. Longitud de la raíz	75

4.4.2. Longitud del explante	75
4.4.3. Color del explante	75
4.5. Análisis económico.....	76
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	76
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	77
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA.....	78
ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 1. Composición del medio nutritivo MS (Murashige y Skoog 1962)	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 2. Fotografías de los antibiogramas realizados para la fase de desinfección.....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 3. Fotografía de la prueba KOH para la fase de desinfección.	¡Error! Marcador no de
ANEXO 4. Fotografías de explantes contaminados en los ensayos previos.	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 5. Tabla de porcentaje de explantes adaptados, no fenolizados y vivos en la fase de Introducción.	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 6. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable contaminación a los siete días de la fase de desinfección.	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 7. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable contaminación a los catorce días de la fase de desinfección.	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 8. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable contaminación a los veinte y un días de la fase de desinfección de la fase de desinfección.	¡Error! Marcador no d
ANEXO 9. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable fenolización a los siete días de la fase de desinfección.	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 10. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable fenolización a los catorce días de la fase de desinfección.	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 11. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable fenolización a los veinte y un días de la fase de desinfección.....	¡Error! Marcador no definido.

Anexo 12. ADEVA para la longitud (cm) promedio de los explantes de *Aechmea fasciata* utilizando las interacciones de auxinas en la fase de introducción..... **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 13. Tabla de número de brotes, longitud, porcentaje de contaminación y porcentaje de mortalidad en la fase de multiplicación **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 14. Gráfica de cajas (Box Plot) utilizando los datos de la fase de multiplicación para evaluar el número de brotes con puntos discordantes a la media del número de brotes..... **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 15. ADEVA para la variable número de brotes de la fase de multiplicación..... **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 16. Prueba LSD de Fisher para el análisis de la concentración de BAP y el tipo de corte en la fase de multiplicación para evaluar la variable número de brotes. **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 17. Prueba LSD de Fisher para el análisis de la concentración de BAP y el tipo de corte en la fase de multiplicación para evaluar la variable número de brote **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 19. Prueba LSD de Fisher para el análisis de la concentración de BAP y el tipo de corte en la fase de multiplicación para evaluar la variable longitud de brote..... **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 20. ADEVA en la variable longitud de explantes de la fase de multiplicación, analizando BAP y tipo de corte.... **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 22. ADEVA en la variable longitud de brotes en la fase de multiplicación, analizando BAP, tipo de corte y consistencia del medio. **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 23. Tabla de variación de longitud de la raíz y variación de la longitud de los explantes en la fase de enraizamiento. **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 24. Gráfico de cajas con puntos discordantes a la media de la variación de la longitud de la raíz en la fase de enraizamiento **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 25. ADEVA para la longitud promedio de raíces en la fase de enraizamiento..... **¡Error! Marcador no definido.**

ANEXO 26. ADEVA para la longitud (cm) promedio de los explantes de <i>Aechmea fasciata</i> utilizando interacciones de auxinas en la fase de enraizamiento.....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 27. Prueba LSD de Fisher analizando por separado las auxinas utilizadas en la variable longitud de explantes en la fase de enraizamiento.....	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO 28. Escala colorimétrica establecida en por Lindsey y Brown 200z6.	¡Error! Marcador no definido.
ANEXO ESTADÍSTICO TEÓRICO	¡Error! Marcador no definido.
Parte 1. Pruebas no paramétricas.....	¡Error! Marcador no definido.
Parte 2. Comparación de tres o más poblaciones: Diseño totalmente aleatorizado.....	¡Error! Marcador no definido.
Parte 3. Comparación de tres o más poblaciones: Diseño de bloques aleatorizados.....	¡Error! Marcador no definido.
Parte 4. Análisis de varianza, ANOVA	¡Error! Marcador no definido.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1	Porcentaje de elementos que presentan las tres clases de morfologías de bromelias.....	10
Tabla 2.1	Protocolo de desinfección de <i>A. fasciata</i> en cámara de flujo	20
Tabla 2.2	Dosis de citoquinas y auxinas en el medio de introducción en la fase de establecimiento de ápices	21
Tabla 2.3	Dosis de BAP, tipos de corte del explante y consistencia del medio en la fase de multiplicación.....	22
Tabla 2.4	Dosis de AIB y dosis de AIA para la fase de enraizamiento	23
Tabla 2.5	Tratamientos utilizados en la fase de introducción	28
Tabla 2.6	Tratamientos utilizados en la fase de multiplicación	30
Tabla 2.7	Tratamientos utilizados en la fase de enraizamiento	31
Tabla 3.1	Porcentajes de contaminación durante el período de evaluación	35
Tabla 3.2	Prueba de Friedman para la variable contaminación.....	59
Tabla 3.3	Prueba de Kruskal-Wallis para la variable contaminación (28 días)	38
Tabla 3.4	Porcentajes de contaminación durante el período de evaluación	39
Tabla 3.5	Prueba de Friedman para la variable fenolización	42
Tabla 3.6	Prueba de Kruskal-Wallis para la variable fenolización.....	43
Tabla 3.7	Prueba de Kruskal-Wallis para la variable fenolización.....	43

Tabla 3.8	Tratamientos para la fase de establecimiento utilizando tres tipos de auxinas	45
Tabla 3.9	Prueba de Friedman para la variable adaptabilidad.....	46
Tabla 3.10	Prueba de Kruskal-Wallis para la variable adaptabilidad	46
Tabla 3.11	Promedio de longitudes de los explantes a partir de los tratamientos utilizados	47
Tabla 3.12	ADEVA para la longitud (cm) promedio de los explantes de <i>Aechmea fasciata</i> utilizando las interacciones de auxinas.....	49
Tabla 3.13	Promedio de longitudes de los explantes a partir de los tratamientos utilizados	49
Tabla 3.14	Prueba LSD de Fisher para la interacción de BAP, tipo de corte y consistencia del medio	53
Tabla 3.15	Prueba LSD de Fisher para la interacción de BAP, tipo de corte y consistencia del medio, respecto a la longitud del explante	56
Tabla 3.16	Tratamientos utilizados en la fase de enraizamiento	57
Tabla 3.17	Prueba LSD de Fisher para el análisis de la interacción entre las hormonas AIA y AIB para la longitud de la raíz.....	59
Tabla 3.18	Prueba LSD de Fisher para el análisis de la interacción entre AIA y AIB para la longitud del explante.....	61
Tabla 3.19	Determinación del costo para los materiales de laboratorio para <i>Aechmea fasciata</i>	63
Tabla 3.20	Determinación del costo de suministros de producción de <i>Aechmea fasciata</i>	64
Tabla 3.21	Determinación de los costos fijos del proyecto	64

Tabla 3.22	Determinación del costo de insumos directos utilizados en la fase de desinfección.....	65
Tabla 3.23	Determinación del costo de maquinarias y equipos para <i>Aechmea fasciata</i> utilizados en la fase de desinfección	65
Tabla 3.24	Determinación del costo de elaboración en la fase de desinfección <i>Aechmea fasciata</i>	66
Tabla 3.25	Determinación del costo de insumos directos utilizados en la fase de introducción	66
Tabla 3.26	Determinación del costo de maquinarias y equipos para <i>Aechmea fasciata</i> para la fase de introducción.....	67
Tabla 3.27	Determinación de insumos directos utilizados en cada tratamiento de la fase de introducción	67
Tabla 3.28	Determinación del costo de insumos directos utilizados en la fase de multiplicación	68
Tabla 3.29	Determinación del costo de maquinarias y equipos para <i>Aechmea fasciata</i> para la fase de multiplicación	68
Tabla 3.30	Determinación del costo de insumos para los 12 tratamientos utilizados en la fase de multiplicación	69
Tabla 3.31	Determinación del costo de elaboración en la fase de multiplicación <i>Aechmea fasciata</i>	70
Tabla 3.32	Determinación del costo de insumos directos utilizados en la fase de enraizamiento	70
Tabla 3.33	Determinación del costo de maquinarias y equipos para <i>Aechmea fasciata</i> para la fase de enraizamiento	70
Tabla 3.34	Determinación del costo de los 9 tratamientos utilizados en la fase de enraizamiento	71

Tabla 3.35	Determinación del costo de elaboración en la fase de enraizamiento <i>Aechmea fasciata</i>	71
Tabla 3.36	Determinación de los costos variables del proyecto	72
Tabla 3.37	Costo total de la producción de <i>Aechmea fasciata in vitro</i>	72

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1	Plantas con hijuelos de <i>Aechmea fasciata</i>	25
Figura 2.2	A) Hijuelo de <i>A. fasciata</i> con hojas. B) Hijuelo de <i>A. fasciata</i> sin hojas.....	25
Figura 2.3	A) Explantes sumergidos en ácido cítrico hasta su siembra. B) Explantes listos para la desinfección en cámara. C) Explantes que serán introducidos en el medio de cultivo. D) Explantes sembrados.....	27
Figura 2.4	A) Brote de <i>A. fasciata</i> el día de la siembra. B) Brote de <i>A. fasciata</i> a los 7 días de siembra. C) Brote de <i>A. fasciata</i> a los 14 días. D) Brote de <i>A. fasciata</i> lista para la siguiente fase	28
Figura 2.5	A) Explante listo para ser cortado. B) Explantes con corte longitudinal. C) Explante sembrado en medio semisólido. D) Explantes sembrados en medio líquido. E) Explantes multiplicados	30
Figura 2.6	A) Explante con nuevos brotes. B) Brotes separados del explante principal. C) Explantes sembrados en el medio de enraizamiento. D) Explantes sembrados en los 9 tratamientos. E) Explantes con raíces.....	31
Figura 3.1	Gráfico del porcentaje de contaminación después de la aplicación de los tratamientos de NaClO	35
Figura 3.2	Gráfica de frecuencias de explantes no contaminados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio	35
Figura 3.3	Gráfica de frecuencias de explantes no contaminados respecto al tiempo de inmersión	36

Figura 3.4	Gráfica de frecuencias de explantes no contaminados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión	36
Figura 3.5	Gráfico de porcentaje de fenolización después de la aplicación de los tratamientos de NaClO	39
Figura 3.6	Gráfica de frecuencias de explantes no fenolizados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio	39
Figura 3.7	Gráfica de frecuencias de explantes no fenolizados respecto al tiempo de inmersión	40
Figura 3.8	Gráfica de frecuencias de explantes no fenolizados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión	41
Figura 3.9	Gráfica de frecuencias de explantes vivos respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión	43
Figura 3.10	Gráfica de frecuencias de explantes adaptados según los tratamientos utilizados	44
Figura 3.11	Gráfica de frecuencias de explantes no contaminados según los tratamientos utilizados	46
Figura 3.12	Gráfica de frecuencias del promedio de longitudes de los explantes de <i>Aechmea fasciata</i>	47
Figura 3.13	Gráfico de frecuencias del porcentaje de brotes en los 12 tratamientos	49
Figura 3.14	Gráfico de cajas mostrando las medias del número de brotes respecto a los 12 tratamientos	50
Figura 3.15	Gráfico de frecuencias respecto al número de brotes en los 12 tratamientos	51

Figura 3.16	Gráfico de cajas mostrando las medias de la longitud de explantes respecto a los 12 tratamientos.....	53
Figura 3.17	Gráfico de frecuencias de variación de longitud respecto a los tratamientos utilizados.....	53
Figura 3.18	Gráfico de cajas indicando la variación de longitud de las raíces respecto a los tratamientos utilizados	57
Figura 3.19	Gráfico de cajas mostrando la longitud del explante respecto a los 9 tratamientos utilizados	58
Figura 3.20	Escala colorimétrica para evaluar los cambios de color de los explantes.....	60
Figura 3.21	Gráfica de frecuencias del porcentaje de explantes al cambiar su color dentro del rango del color verde	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ADEVA	Análisis de varianza
AIA	Ácido indol acético
AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido Naftalenacético
BAP	6 bencilaminopurina
DCA	Diseño completamente al azar
L	litro
M&S	Murashige y Skoog
mg	miligramos
pH	potencial hidrógeno
ppm	partes por millón

RESUMEN

Aechmea fasciata es una planta perteneciente a la familia de las bromelias, conocida en el Ecuador como huaicundos; se caracteriza por sus hojas en forma de roseta y por no poseer tallo. Las bromelias son utilizadas de diversas maneras como: comestibles, forrajeras y proveedoras de fibra. La principal característica es la de facilitar un sitio para vivir a pequeños animales. Las variedades de bromelias en un bosque guardan relación con el estado de la arboleda. La tala indiscriminada de árboles ha minimizado la presencia de esta especie en el país; es por ello que se plantea el cultivo *in vitro* como un medio de conservación. Se desarrolló un protocolo para la micropropagación de bromelias a partir de brotes laterales y apicales, resultado de la evaluación de varios tratamientos en las etapas de desinfección, introducción, multiplicación y enraizamiento. La primera etapa, desinfección, se realizó utilizando tres concentraciones de hipoclorito de sodio y dos tiempos de inmersión, donde se obtuvo un porcentaje de descontaminación de hasta el 100%; el medio de cultivo suplementado con $0,1\text{mgL}^{-1}$ de ANA permitió observar la mejor respuesta en la longitud del explante durante la fase de introducción. El mayor número de brotes y su longitud fue obtenido en el medio de cultivo líquido sin hormona de crecimiento. El enraizamiento de los brotes *in vitro* se alcanzó en un medio de cultivo suplementado con $0,5\text{mgL}^{-1}$ y 1mgL^{-1} de AIA y AIB respectivamente y la adición de carbón activado.

ABSTRACT

Aechmea fasciata is a plant pertaining to the family of bromelias, well-known in Ecuador like huaicundos, it is characterized by its leaves in the form of rosette and not to own stem. Bromelias is used of diverse ways: foods, fodder and fiber suppliers. The main characteristic is to facilitate of a site to live to small animal. The variety of bromelias in a forest bears relation to the state from the woods. The indiscriminate cutting of trees has diminished the presence of this species in the country, is for that reason that considers the test-tube culture like conservation means. Development a protocol for the micropropagation of bromelias from lateral and apical buds, result of the evaluation of several treatments in the disinfection stages, introduction, multiplication and rooting. In the first stage, disinfection, was realized using 3 concentrations sodium hipocloride and 2 times of immersion, where a percentage of decontamination of until the 100% was obtained, the means of culture supplemented with 0,1mgL⁻¹ of ANA allowed to observe the best answer in the length of the explant during the phase of introduction. The greater number of buds and its length were obtained in means of liquid culture without growth hormone. The rooting of buds *in vitro* was reached respectively in means of culture supplemented with 0.5 and 1mg/L⁻¹ of IAA and IBA, and the activated charcoal addition.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Las bromelias son una familia de plantas monocotiledóneas originarias del continente americano, habitan en las zonas subtropicales donde alcanzan su mayor diversidad; existe tan solo una especie reportada de la familia *Pitcairnia feliciana*, que habita África Occidental (Manzanares, 2002). Incluye 56 géneros, 3.143 especies y subespecies, más de la mitad son epífitas, es decir sus raíces pueden estar unidas a troncos de árboles, rocas u otros sustratos, se distinguen por carecer de tallo, presentar raíces cortas, hojas ordenadas en roseta y el conjunto de flores dispuestas a manera de vistosas espigas, aunque existen con tallo y con flores solitarias. Además de producir su alimento a partir de luz solar y aire, muchas bromelias aprovechan la materia orgánica y el agua que sus hojas captan durante la lluvia o absorben del ambiente, otras se benefician de los desechos orgánicos acumulados en las grietas de las rocas o en el suelo, y algunas forman pseudobulbos, es decir cámaras formadas por la parte basal de las hojas en donde suelen habitar hormigas (Miranda *et al.* 2007).

El padre Charles Plumier durante una expedición en las Antillas encontró un grupo de plantas nombradas por los nativos como “Karatas”, a su regreso a Europa decidió llamar a estas plantas como bromelias en honor a su amigo el botánico suizo Olaus Bromelius. (Manzanares, 2002).

En Ecuador, las bromelias a pesar de crecer en todo el territorio nacional, son poco conocidas. Entre las más cultivadas está la piña, con aproximadamente 600 ha. Otra especie de bromelias, como *Tillandsia dyeriana*, es una de las más apreciadas en el ámbito internacional, endémica de los manglares nacionales, desde Guayaquil hasta Esmeraldas, muy comunes hasta hace poco tiempo; en la actualidad se encuentran en jardines botánicos y colecciones privadas de Europa, ya que la colectividad ecuatoriana ha permitido la desaparición dentro del territorio nacional debido a la tala indiscriminada de bosques. Los únicos cultivos de bromelias en el país se limitan a los de piña; con 60000 plantas por hectárea. En el orquidario del Jardín Botánico de Quito también se pueden apreciar algunas bromelias, pero la mayoría han sido donadas desde California (Manzanares, 2002).

El género *Aechmea* tiene más de 140 especies distribuidas desde México hacia Sudamérica. En el Ecuador son conocidas como huaicundos (nombre quichua para las bromelias), estas han establecido innumerables relaciones con flora y fauna, lo que conlleva a conocer cuál es la verdadera importancia ecológica que tienen estas plantas, y es una muestra más de cómo funcionan las relaciones entre diferentes organismos (Manzanares, 2002).

Las epífitas pueden llegar a representar más de un tercio de las especies vegetales de un área forestal, por lo que elevan considerablemente la riqueza de los bosques y las selvas. Ocupan un lugar muy importante en el ciclo de nutrientes y ejercen fuerte influencia sobre una porción de la fauna, ya que algunas de estas plantas, sobre todo las bromelias, proveen de un sitio para vivir a insectos, ácaros, crustáceos, moluscos e incluso pequeños anfibios (Mondragón, 2002); por lo tanto, su presencia contribuye a que los animales mayores frecuenten la arboleda, sobre todo aves y reptiles que encuentran agua y alimento en sus hojas. La existencia de bromelias en un bosque indica que diversos seres vivos encuentran allí condiciones ambientales adecuadas.

Uno de los motivos que ha dificultado la multiplicación de bromelias es su producción por medio de semilla, ya que es muy limitada, por lo que su principal sistema de propagación es asexual. Estas plantas producen varios tipos de hijuelos, que son las formas por las que se propagan. El avance tecnológico alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Actualmente existen estudios previos en bromelias a través del cultivo de tejidos *in vitro*, donde recomiendan el uso de las sales de MS (Murashige y Skoog, 1962), y sus respectivas modificaciones en el uso de los reguladores de crecimiento para cada una de las fases de crecimiento.

1. Formulación del problema

Las bromelias son plantas exóticas muy atractivas, en mercados internacionales, por su resistencia, no requieren muchos cuidados y dan un

toque original a los parques y jardines. A nivel mundial, en EEUU y Europa se cultivan anualmente tres millones de plantas de una especie de bromelias endémica del Ecuador, que ha desaparecido dentro del territorio nacional debido a la tala indiscriminada de bosques. Actualmente el Ecuador tiene zonas específicas para el cultivo de bromelias, en las cuales se puede realizar plantaciones comerciales de *Aechmea fasciata*. Las bromelias pueden llegar a constituir una fuente de ingreso para la economía del país si se enfocan recursos para el desarrollo de nuevas tecnologías para este tipo de plantas ornamentales.

Existe un amplio mercado en el mundo para estas plantas, su precio en el mercado argentino varía desde los 45 USD para exportación. Los principales países importadores de bromelias son Tailandia y Estados Unidos (Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la calidad del Agro, 2010).

Tras florecer, las hojas de bromelias se secan, las plantas mueren, pero pueden multiplicarse extrayendo con raíces los hijuelos que salen de la base. El problema que presenta es que los hijuelos de *Aechmea fasciata* tardan varios años en florecer, si se multiplican por semillas, se deberá esperar unos 4 años para obtener las nuevas plantas. Cuando las plantas son expuestas al sol pueden quemarse las hojas, apareciendo manchas marrones, demasiada humedad en invierno puede provocar la pudrición la roseta se marchita, son sensibles a los ataques de cochinilla y cochinilla algodonosa (Morales, 2002).

Por medio de esta investigación se desarrollara un protocolo para la producción de plantas in vitro de bromelias, basado en la “Estrategia de propagación *in vitro* de *Aechmea fasciata* para la regeneración de plantas completas.”

1.1. Justificación

Una de las principales alternativas para la producción masiva de plantas con un menor riesgo de enfermedades en un corto lapso de tiempo y evitando la variabilidad genética es la micropropagación. En el caso de bromelias esta técnica se ha realizado específicamente para propagar *Ananas comosus*, un tipo de bromelia utilizada en la alimentación. Los horticulturistas aprecian estas

plantas por los colores llamativos que presentan las rosetas y flores (naranja, blanca, amarillo, azul y en tonos café) cultivadas mediante el uso de técnicas de propagación, manteniendo así las mejores características fenotípicas de la planta. (Guerra y Vesco, 2009)

La importancia de este proyecto radica en la existencia de empresas ecuatorianas, ampliamente interesadas en la producción extensiva de esta planta por medio de la micropropagación clonal, ya que se asegura una planta libre de enfermedades en corto tiempo, manteniendo las características fenotípicas de interés comercial.

1.2. Objetivos de la investigación

1.2.1. Objetivo general

Establecer una estrategia de propagación *in vitro* de *Aechmea fasciata* para la regeneración de plantas completas.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar el protocolo de desinfección más adecuado para la introducción de explantes de *Aechmea fasciata*.
- Establecer la dosis óptima de reguladores de crecimiento en la fase de introducción que permita la adaptación de los explantes.
- Determinar la dosis óptima de BAP, corte del explante y consistencia del medio en la fase de multiplicación que permitan obtener el mayor número de brotes.
- Estudiar el efecto de dos auxinas en la fase de enraizamiento, que permitan la obtención del mayor número de plantas enraizadas.
- Determinar la estrategia más económica para la regeneración de *Aechmea fasciata in vitro*.

1.3. Marco teórico

1.3.1. Generalidades

Esta familia de plantas es especialmente interesante porque evidencia como la evolución ha permitido a estas plantas separarse del suelo y colonizar espacios aéreos. Desde las antiguas *Pitcairnioideae* que son únicamente terrestres; pasando por las *Bromelioidae* donde encontramos terrestres con tanque o sin él, y epifitas con tanque; hasta llegar a las *Tillandsioideae* únicamente epifitas que pueden poseer o no el tanque almacenador de agua; de esta manera, las bromelias han ido modificando su fisiología, morfología, fenología, ecología, etc.

1.3.2. *Aechmea fasciata*

Aechmea fasciata es una de las familias de las *Bromeliaceae*, específicamente pertenece al género *Aechmea*, el mismo que presenta más de 140 especies distribuidas desde México hacia Sudamérica, son las más populares dentro de la familia de las bromelias y su nombre se deriva del griego punta de lanza, en el Ecuador y otros países también se la conoce como huacundo, aguarongo, achupalla, musgo gris y barba de viejo (Manzanares, 2002).



1.3.3. Descripción botánica

Es una planta que se presenta como roseta de largas hojas coriáceas, rectilíneas, a menudo recurvadas, rígidas y en algunos casos con los márgenes aserrados, presenta además inflorescencia en espiga, con brácteas coloreadas imbricadas y flores de distinto color, de pequeño tamaño es muy usada como planta ornamental (Carrillo, 2000).

Las hojas están cubiertas de pequeñísimos pelos llamados tricomas peltados, visibles mediante una lupa. Los tricomas tienen la forma de una es sombrilla y comúnmente dan un aspecto blanquecino a las plantas. Su cantidad y localización es distinta en cada especie, muchas de las que toleran los ambientes secos, como es el caso de *Tillandsia usneoides* L., conocida como heno, presenta numerosos tricomas que disminuyen la incidencia de los rayos solares en las superficies de las hojas y aumenta la capacidad de absorber agua del ambiente contrarrestando así los efectos de las sequías. (Miranda *et al.* 2007)

1.3.4. Distribución geográfica

En Ecuador, 447 especies han sido identificadas, incluyendo 152 especies endémicas, agrupadas en 13 géneros (Manzanares 2000, Valencia & León-Yáñez 2002).

Muchas de las bromelias están concentradas en la cordillera de los Andes, donde los niveles de endemismo y diversidad son grandes, (Cerón, 2003). Desafortunadamente esta zona ha sufrido una intensa explotación humana que afecta severamente a las plantas, según Valencia *et al.* (1999) las laderas ecuatorianas andinas están entre las áreas con grandes rangos de deforestación en el país y la más importante para la conservación de las bromelias y otras especies en peligro de extinción.

Debido a que como grupo muestran gran adaptabilidad y resistencia a condiciones ambientales extremas, las bromelias se hallan en la mayoría de los tipos de vegetación: pinares, encinares, bosques húmedos, matorrales, selva, etc. Se las encuentra tanto en zonas cálidas y lluviosas como zonas secas y

frías. Las bromelias de hojas verdes crecen en particular en lugares húmedos, mientras que las de hojas grises son propias de sitios más secos, pero el desarrollo de todas es favorecido por una buena ventilación. (Miranda *et al.* 2007)

La variedad de bromelias en un bosque guarda relación con el estado de la arboleda. En bosques maduros y poco alterados hay muchas especies y pocos individuos de cada una, mientras que en aquellos con disturbio y en regeneración suele hallarse un menor número de especies y mayores cantidades de plántulas y juveniles.

También existen correspondencia entre la cantidad, la diversidad y la madurez de los árboles y la presencia de bromelias epífitas, éstas prosperan por ejemplo, en bosques maduros de abundantes encinos pues la corteza rugosa de esos árboles mantiene una humedad apropiada que constituye una buena fuente de materia orgánica.

1.3.5. Ciclo de vida

El ciclo de vida completo de las bromelia abarca de 2 a 30 años según su especie; dicho ciclo comienza con la fecundación de los óvulos por el polen y la consiguiente formación de semillas en los frutos carnosos llamados cápsulas o bayas. Las semillas son dispersadas por el viento (en las bromelias epífitas) o por animales (algunas terrestres) y germinan en los árboles, las rocas o el suelo que reúnen las condiciones adecuadas de humedad, luz y temperatura. Un porcentaje muy pequeño del total de semillas liberadas germina y da origen a plántulas. Después de varios años de desarrollo las bromelias florecen, fructifican y mueren, con lo que se cierra el ciclo de vida. (Miranda *et al.* 2007).

Las bromelias más abundantes de México, agrupadas en el género *Tillandsia* (L.) L., florecen en general solo una vez, en la fase de su desarrollo, al cabo de 3 a 5 años y entre los meses de diciembre y abril. Algunas bromelias despliegan sus flores en varias ocasiones, como *Tillandsia multicaules Steud.*, cuyas inflorescencias brotan a los lados de su eje.

Las bromelias presentan tres morfologías y hábitos principales de desarrollo:

- Plantas terrestres (*Ananas*, *Pitcairnia*), son plantas con sistema radicular que absorbe nutrientes y agua del suelo, el fósforo es obtenido fácilmente del suelo, las hojas generalmente alargadas y con espinas en el borde, además de establecer relaciones con organismos del suelo que ayudan en la obtención de nutrientes.
- Plantas epifitas con reserva de agua (*Neoregelia*, *Aechmea*), son organismos con raíces especializadas para la adhesión a los troncos y menos funcionales en la absorción de agua y nutrientes, las hojas tienen bases anchas unidas a un tallo corto en disposición de roseta permitiendo la formación de un tanque que acumula agua y nutrientes.
- Plantas epifitas sin tanque (*Tillandsia recurvata*, *T. circinata*) estas últimas poseen pequeñas raíces solo útiles para fijarse a las ramas, absorben agua y nutrientes gracias a tricomas especializados que se hallan en las superficies de las hojas. (Carrillo, 2000).

1.3.6. Usos

Las bromelias son utilizadas de diversas maneras; las hay comestibles, como la piña (*Ananas comusus* (L.) Merr.); forrajeras, (*Tillandsia prodigiosa* (Lem.) Baker), y proveedoras de fibra de alta calidad, como la pita (*Aechmea magdalenae* (André) André ex Baker). Muchas son empleadas en la medicina tradicional para tratar enfermedades respiratorias y digestivas. Otras están destinadas a rituales religiosos y fiestas tradicionales. Sin embargo, la mayoría de las especies se usan con fines ornamentales en hoteles, jardines, plazas, así como en arreglos florales dada la belleza de sus inflorescencias y, en algunos casos, de sus frutos y su follaje (Miranda *et al.* 2007).

Las bromelias tienen vínculos interesantes con algunos animales, principalmente con los insectos, las ranas y los reptiles que viven en sus hojas y cuyos desechos también son fuente de nutriente para ellas. En el caso particular de *Tillandsia butzii* Mez. toma lugar una relación de provecho mutuo con las hormigas que habitan en las cámaras internas del pseudobulbo, un engrosamiento de la base de esta bromelia: la planta recibe protección y los insectos obtienen alimento y abrigo. (Miranda *et al.* 2007)

La reducción de las poblaciones de bromelias afecta a una serie de organismos asociados, un ejemplo; a nivel de la planta, la morfología que presentan las hojas de algunas bromelias sirve de reservorio de agua, el cual es considerado como un microhabitat para pequeños anfibios y algunos insectos (Judd *et al.* 1999).

Frank *et al.* (2004) y Kitching (2000) han reportado la presencia de un gran número de invertebrados terrestres en cuatro especies de bromelias, algunas de las cuales no están identificados todavía.

Por otra, parte debido a la diversidad de las formas y los colores de sus flores, es probable que la disminución de bromelias pueda haber tenido un impacto negativo en las poblaciones de varias especies de polinizadores y dispersores de semillas, como aves, murciélagos e insectos (Judd, *et. al* 1999).

1.3.7. Componentes químicos

El fósforo es un macronutriente muy importante en los seres vivos, aunque la proporción de fósforo en la materia viva es relativamente pequeña, cumple funciones vitales en las células. La mayoría de la bromelias que crecen en suelo cuentan con el fósforo necesario gracias a su presencia en estado disponible y la acción que tiene con la microbiota y las posibles asociaciones con estos organismos.

La filotaxia o disposición de las hojas en el tallo es lo que determina la forma de una bromelia, junto a esto encontramos un ensanchamiento de la base de la hoja que abraza el tallo y forma un depósito en el cual se acumula agua y materia orgánica; esta materia orgánica es descompuesta allí por microorganismos dejando el fósforo disponible a la planta. Consecuente, los tricomas de las hojas modificados especialmente para la adsorción y absorción de agua y nutrientes, los mismos que los encontramos en dos morfologías principales: en forma de jeringuilla en las plantas con depósitos de agua, así toman y liberan líquidos del pequeño cuerpo de agua; la otra forma son las escamas en forma de disco comunes en las epifitas con o sin tanques aunque en estas últimas mucho más especializadas: los discos multicelulares

(tricomos) grandes, superpuestos y distribuidos en toda la epidermis; permiten una alta superficie de contacto y de condensación de agua, así pueden tomar agua de la atmosfera.

El material orgánico particulado se acumula gracias a la humedad de la superficie de la planta y aporta los nutrientes necesarios, además de hojarasca que queda atrapada en la planta y los desechos de los animales que habitan o transitan sobre la bromelia. Por último las raíces abandonan gradualmente la función de captación de nutrientes y agua, para convertirse en fuertes lazos que abrazan a los troncos para mantener firme a la planta.

Los diferentes tipos de bromelias divididas en terrestres enraizadas, epifitas con tanque y epifitas atmosféricas difieren en muchos aspectos: su estrategia nutricional, sus fisiologías, fisionomías, estrategias reproductivas, morfologías, nichos ecológicos, etc. así como su obtención del fosforo. En la tabla 1 se puede observar la cantidad de fósforo que presentan los tres tipos de bromelias.

Tabla 1.1. Porcentaje de elementos que presentan las tres clases de morfologías de bromelias.

ELEMENTAL COMPOSITION OF LEAF BLADE TISSUES (% OF DRY WEIGHT) FIELD-COLLECTED FROM SPECIES REPRESENTING ALL THREE NUTRITIONAL STRATEGIES IN BROMELIACEAE

Ecological strategy and species	Subfamily	Collection locality	Ca	K	Mg	N	Na	P
Rooted terrestrials:								
<i>Bromelia karatas</i>	Bromelioideae	Jamaica	1.19	2.48	0.14	0.67	0.064	0.068
<i>Pitcairnia bromeliifolia</i>	Pitcairnioideae	Jamaica	1.06	1.02	0.14	1.37	0.036	0.084
<i>Pitcairnia</i> sp.....	Pitcairnioideae	Dominica	0.26	1.70	0.18	0.81	0.044	0.095
Tank epiphytes:								
<i>Aechmea nudicaulis</i>	Bromelioideae	Trinidad	0.38	1.94	0.20	0.57	0.18	0.057
<i>A. paniculigera</i>	Bromelioideae	Jamaica	0.51	1.05	0.15	0.54	0.81	0.042
<i>Calopsis heteromiana</i>	Tillandsioideae	Jamaica	0.40	0.72	0.12	1.14	0.55	0.085
<i>C. floribunda</i>	Tillandsioideae	Florida	1.15	1.59	0.18	1.36	0.32	0.091
<i>Guzmania lingulata</i>	Tillandsioideae	Trinidad	0.44	1.59	0.25	0.88	0.19	0.063
<i>G. monostachia</i>	Tillandsioideae	Florida	0.34	1.94	0.14	0.60	0.10	0.075
<i>Tillandsia anceps</i>	Tillandsioideae	Trinidad	0.39	1.06	0.14	0.85	0.26	0.044
<i>Vræsea splendens</i>	Tillandsioideae	Trinidad	0.36	1.43	0.20	0.89	0.48	0.058
Atmospheric epiphytes:								
<i>T. balbisiana</i>	Tillandsioideae	Florida	0.83	0.34	0.14	0.36	0.41	0.035
<i>T. strictata</i>	Tillandsioideae	Florida	0.73	0.32	0.14	0.34	0.65	0.029
<i>T. prismosa</i>	Tillandsioideae	Florida	0.70	0.48	0.24	0.73	0.38	0.060
<i>T. usneoides</i>	Tillandsioideae	Florida	0.67	0.50	0.29	0.82	0.55	0.012

Tomada de D. H. Benzing and A. Renfrow

1.3.8. Cultivo de tejidos *in vitro*

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc), y el

control de los factores que afectan el crecimiento. Según Sandoval 2001, el empleo de la técnica de micropropagación, evitaría la diseminación de plagas y enfermedades, reducción del volumen del traslado de semilla, se reduce la aplicación de fitosanitarios, se obtiene un material sano y uniforme, no se producen afectaciones en la salud de las personas que manipulan el material vegetativo, se conserva la identidad genética del cultivar, material genético altamente productivo, propagación más rápida y en mayores volúmenes.

El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas. Haberlandt, un científico alemán, postuló a principios del siglo pasado que las plantas eran capaces de reproducir su crecimiento a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular en plantas. Sin embargo, este investigador no pudo demostrar en forma práctica su hipótesis, debido a que la mayoría de los componentes complejos que integran los medios de cultivo actuales todavía no habían sido descubiertos. Sería en la década del 50 cuando se determina la importancia del balance hormonal en las plantas, con el descubrimiento de las hormonas vegetales más usadas en la actualidad (Morales, 2002).

De esta manera, las células vegetales desarrolladas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse originando dos tipos de respuesta:

- Una desinfección celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos.
- Una respuesta morfogénica por la cual se forman directamente órganos o embriones.

Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido no solo a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, sino a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. Es importante mencionar los siguientes usos de las técnicas de cultivo in vitro: mejoramiento genético, obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, conservación de germoplasma y micropropagación. (Roca y Mroginski, 1991).

1.4.8.1. Medio de cultivo

El principal objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrientes minerales en concentraciones adecuadas. Se deben incluir los macroelementos (C, H, P, K, S, Ca, Mg) y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl), además de reguladores de crecimiento, vitaminas, fuente de carbono, agentes gelatinizadores y agua.

El medio de cultivo a utilizar debe ser de acuerdo a la especie de la planta que va a ser propagada, ya que el medio de crecimiento influye en el crecimiento y morfogénesis del explante. (Roca y Mroginski, 1991).

1.4.8.2. Reguladores de crecimiento

Se definen como estructuras moleculares que modifican cualitativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas. Su efecto está mediado por su presencia o ausencia, sin embargo la concentración de éstos es importante para un crecimiento vegetativo (Castillo & Davies, 1999).

Los reguladores de crecimiento intervienen en la comunicación intercelular de las plantas, las células utilizan sus receptores y envían la información necesaria para cada proceso de diferenciación. Una vez que el receptor capta la señal se desencadenan microambientes distintos para células genéticamente iguales, a través de cambios en la actividad del citoesqueleto, cambios osmóticos y metabólicos (Vidal, 2008).

1.4.8.2.1. Auxinas

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular, formación de raíces laterales y adventicias, retardo en la abscisión de hojas y frutos, entre otros efectos. Se sintetizan en las regiones meristemáticas del ápice de los tallos y se desplazan desde allí hacia otras zonas de la planta, principalmente hacia la base. Este movimiento se realiza a través del parénquima que rodea a los haces vasculares (García, 2006).

Existen algunas auxinas que están en el tejido vegetal, siendo el ácido indolacético (AIA) la más relevante en cuanto a cantidad y actividad. Éste es considerado el precursor de la forma activa de las auxinas. Otros como el ácido indolacetonitrilo, o la indolacetamida están presentes en menor cantidad y tienen poca actividad en relación al AIA.

El ácido indolacético, se suele formar cerca de los brotes nuevos, en la parte superior de la planta, y fluye hacia abajo para estimular el alargamiento de las hojas recién formadas (Lucas, 2002)

1.4.8.2.2. Citoquininas

Son un grupo de fitorreguladores que gobiernan el proceso de división celular, la diferenciación en tejidos vegetales, la modificación de la dominancia apical y diferenciación de tallos. Se encuentran en el xilema, floema y hojas, transportándose por vía acrópeta, desde el ápice de la raíz hasta las hojas, moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema. La naturaleza química de las citoquininas proviene de los derivados de la adenina. La biosíntesis de este regulador está asociada a regiones de la planta con actividad meristemática (meristemas apicales y cámbium), especialmente en tejidos en crecimiento. (García, 2006).

Además de su papel como reguladores de la formación de nuevos órganos, éstos intervienen en la apertura de estomas e inhibición de la senescencia de las hojas. Estos compuestos son utilizados para la proliferación de tallos axilares. (Vidal, 2008)

En procesos *in vitro* se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos.

En su estructura química puede distinguirse un grupo hidrofílico específico (adenina), cuyas alteraciones reducen o alteran la actividad de la citoquinina y un grupo lipofílico de poca o nula actividad, correspondiente a la cadena lateral que puede sustituirse dando compuestos con menor o mayor actividad (Devlin, 1976).

En la actualidad se han aislado citoquininas de distintas especies de plantas, encontrándose fundamentalmente en órganos cuyos tejidos se están dividiendo de forma activa, es decir, semillas, frutos y raíces.

1.4.8.3. Agentes gelatinizadores

El éxito de cultivo de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos como: nutrimentos, azúcar y hormonas, así como del agente gelatinizador (Roca y Mroginsky, 1991). Este agente permite al explante estar en contacto con el medio semisólido, ya sea en la superficie o insertado, generalmente se ha utilizado agar en un rango de concentración de 0,5% a 1 % (w/v). La concentración a utilizarse puede ser crítica para la respuesta del cultivo, ya que un medio lo suficientemente blando puede producir hiperhidricidad mientras que un medio demasiado sólido puede causar reducción del crecimiento.

El agar es un polisacárido, que consiste de agarosa y agarpectina, las cuales forman geles que contienen altas cantidades de agua (hasta 99,5%); entre otros beneficios, el agar no reacciona con ningún otro componente del medio y no es digerido por las enzimas de los tejidos vegetales. (Trigiano y Gray, 2005).

1.4.8.4. Factores físicos

Los factores físicos juegan un papel importante dentro del proceso de micropropagación vegetal; temperatura, luz y pH han sido los factores físicos

más estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 – 28 °C. Se han variado los regímenes de temperatura en el día y en la noche y sólo pocas especies presentan variaciones ventajosas (Roca y Mroginsky, 1993).

La luz es un factor fundamental en el proceso de morfogénesis. El papel de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como la intensidad, el fotoperíodo y la calidad. El espectro útil para las especies vegetales varía de 400 – 700 nanómetros, razón por la cual se recomienda mantener un espectro de luz adecuado (Esquivel y Escalant, 1994).

En el caso del pH, el grado de acidez o alcalinidad, es importante y específico para cada tipo de especie vegetal. Al igual que ocurre en el suelo, el pH debe mantenerse en un rango de 5,6 – 5,8 con el fin de mantener un desarrollo vegetativo óptimo (Roca y Mroginsky, 1993).

1.3.9. Etapas de la micropropagación

- Etapa 0: Selección de la planta donadora y preparación
- Etapa 1: Establecimiento del medio de cultivo *in vitro*.
- Etapa 2: Multiplicación
- Etapa 3: Enraizamiento
- Etapa 4: Aclimatación de las plántulas

1.4.9.1. Etapa 0: Selección de la planta donadora

Pérez 1998, sostiene que en la discriminación del material de partida se asegura una correcta selección individual. Los problemas relacionados con la contaminación de los explantes primarios, su calidad y respuesta *in vitro* está directamente relacionado con las condiciones fisiológicas como fitosanitarias de la planta donadora, es por eso que es recomendable tratar químicamente las plantas madre, es decir, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas, controlando la nutrición y

riego para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Henderson *et al.*, 2001).

1.4.9.2. Etapa 1: Establecimiento del medio de cultivo *in vitro*

Una vez elegida la planta madre, se extraen los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. *Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven en una alta proporción a la descomposición causada por la desinfección y que luego responden eficientemente a las condiciones in vitro* (Roca y Mroginski, 1991).

Antes de extraer los explantes se debe realizar una desinfección de los fragmentos de la planta madre para eliminar los contaminantes externos más comunes como hongos y bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Entre los compuestos más utilizados para la desinfección de explantes se encuentra: hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, antibióticos, además de fungicidas, bactericidas, etc.

Luego de la desinfección superficial, el material seleccionado se debe sembrar en un medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo, 2004).

1.4.9.3. Etapa 2: Multiplicación

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron en las fases anteriores produzcan brotes (axilares o adventicios). Periódicamente estos nuevos brotes se pueden subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras. 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 (Devlin, 1976).

El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal, además la proliferación de brotes se puede alcanzar con el uso de sustancias de crecimiento como componentes de un medio de cultivo previamente establecido (Pérez, 1998).

El crecimiento de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas, las cuales inhiben la dominancia del meristemo apical estimulando la formación de brotes axilares. El tipo y concentración de citoquinina debe ser en base de la tasa de multiplicación, la longitud de los brotes y la frecuencia de la variación genética que se quiera alcanzar, ya que altas concentraciones de citoquininas mejoran la proliferación de brotes, a pesar de que los brotes producidos son usualmente más pequeños pueden presentar hiperhidricidad (Trigiano y Gray, 2005).

1.4.9.4. Etapa 3: Enraizamiento

En la etapa de enraizamiento las plántulas deben desarrollar un pseudotallo o tallo con las primeras hojas y formar raíces, ya que constituye una etapa de preparación y endurecimiento de los brotes para ser transferidos exitosamente al suelo e incrementar la sobrevivencia (Trigiano y Gray, 2005).

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, 2004).

En esta etapa se debe manejar factores como medios de cultivo simples; comúnmente en plantas herbáceas el enraizamiento puede ser obtenido en ausencia de reguladores de crecimiento, sin embargo en algunas especies leñosas la adición de una auxina es requerido en el medio para aumentar la eficiencia (Trigiano y Gray, 2005).

1.4.9.5. Etapa 4: Aclimatación de las plántulas

Los explantes recién enraizados son sensibles a cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso del proceso dependen de la aclimatación. En

esta etapa las plantas sufren cambios que permiten la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales (Castillo, 2004).

En el momento en que se extraen los explantes enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que éstos han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada, generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante (Olmos y Luciani, 2005).

1.4.10 Micropropagación de especies ornamentales

Los programas de manejo y conservación de las poblaciones de la familia de las bromelias se hacen cada vez más urgentes conociendo que gran número de especies requieren una cobertura boscosa para su establecimiento y desarrollo, muchas son dependientes de los hospederos y por lo tanto son muy vulnerables a cualquier cambio en las condiciones de humedad y radiación solar. Aunque la reproducción puede ser asexual o sexual, la propagación por semillas en algunas especies requiere condiciones especiales ya sea de humedad, temperatura o largo tiempo de germinación, como en el caso de las especies del género *Vriesea*, que producen semillas con baja capacidad de germinación, o algunas especies del género *Puya*, en las que la germinación y la viabilidad de las semillas depende de la temperatura (Calderón, *et.al*, 2011).

1.4. Sistema de hipótesis

La estrategia de propagación *in vitro* desde la fase de desinfección hasta la fase de enraizamiento, tendrá como resultado plantas completas de *Aechmea fasciata*.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

La investigación se desarrollo bajo la dirección de los Ingenieros Ivonne Vaca y Pablo Landázuri propietarios de los Laboratorios de Servicios Agrobiotecnológicos “AGROBIOTECH”, así como también con la colaboración de la Sra. M. Sc. Mónica Jadán como directora y el Sr. Ing. Mat. Pedro Romero como codirector.

2.2. Zona de estudio

Los Laboratorios de Servicios Agrobiotecnológicos “AGROBIOTECH”, se ubica en la Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia Sangolquí, sector Selva Alegre, a 78°25'58,73'' (O) y 0°20'35,85'' (S), a una altitud de 2547m; bajo condiciones controladas dentro del laboratorio, en un cuarto de crecimiento con una temperatura promedio de 21° C y humedad relativa de 45%.

2.3. Período de investigación

El proyecto de investigación tuvo un período de duración de 12 meses.

2.4. Diseño experimental

La investigación está comprendida en cuatro fases: fase de desinfección, fase de establecimiento *in vitro*, fase de multiplicación, fase de enraizamiento.

2.4.1. Fase de desinfección

Los laboratorios Agrobiotech cuentan con hijuelos de *A. fasciata* los cuales servirán como fuente de material vegetativo para las pruebas de desinfección. A partir de estas plantas se obtendrán los explantes necesarios para evaluar el protocolo de desinfección adecuado para obtener material limpio con el que se realizarán las posteriores evaluaciones del proyecto.

La unidad experimental estuvo conformada de un frasco de vidrio de 3cm de diámetro y 6cm de alto, donde se introdujo el explante de *Aechmea fasciata* en 2ml de medio Murashige y Skoog 1962 (Anexo 1) sin hormonas de crecimiento, para esta primera fase. Se realizó 10 repeticiones por tratamiento de desinfección. Los tratamientos utilizados se describen a continuación.

En la cámara de flujo se realizaron los tratamientos detallados en el Tabla 2 cada tratamiento se lo realizó en frascos de vidrio estériles.

Tabla 2.1. Protocolo de desinfección de *A. fasciata* en cámara de flujo.

Tratamiento	Porcentaje de cloro (%)	Tiempo de exposición (minutos)	Referencias bibliográficas
T1	0,5	3	Zamora y Juárez, 2008. Garita y Gómez, 2000
T2	0,5	5	
T3	0,75	3	
T4	0,75	5	
T5	1	3	
T6	1	5	

En esta etapa los explantes fueron sembrados en medio de cultivo MS con una dosis de antioxidantes y dosis de antibióticos para eliminar la oxidación y el crecimiento de microorganismos, el antibiótico seleccionado fue a partir de antibiogramas realizados para determinar el tipo de bacteria que se desarrollaba junto con el explante.

Las variables que fueron evaluadas durante esta fase fueron: porcentaje de contaminación fúngica, porcentaje de contaminación bacteriana, fenolización y porcentaje de mortalidad.

Porcentaje de contaminación (fúngica y bacteriana): Se evaluó 4 veces durante 28 días, en donde presencia fue 1 y ausencia 0.

Fenolización: Se evaluará cuatro veces cada 28 días de la introducción al medio de cultivo. En donde presencia se evalúa con 1 y ausencia con 0.

Porcentaje de mortalidad: Se contaron como explantes muertos aquellos que presentaron necrosis total del tejido, una sola vez, al final de la fase establecimiento, para obtener su porcentaje.

Las variables analizadas fueron consideradas como variables dicotómicas, su análisis se realizó a través de tablas de frecuencias, tablas estadísticas y gráficos demostrativos.

2.4.2. Fase de establecimiento *in vitro*

Para esta fase se tomaron como explantes de *Aechmea fasciata* los resultados positivos obtenidos de la fase de desinfección. Posteriormente fueron introducidas en un vaso de vidrio de 3cm de diámetro y 6cm de alto, con el medio MS suplementado con 1ppm de BAP, en estado semisólido, en esta fase se evaluó la interacción entre tres dosis de auxinas (AIA, ANA y AIB), durante un periodo 28 días. Se realizó 8 repeticiones por tratamiento.

Tabla 2.2 Dosis de citoquinas y auxinas en el medio de introducción en la fase de establecimiento de ápices.

Tratamiento	Auxina ANA (ppm)	Auxina AIA (ppm)	Auxina AIB (ppm)	Referencias bibliográficas
T1	0	0	0,0	Zamora y Juárez, 2008.
T2	0	0	0,1	
T3	0	0,1	0,0	
T4	0	0,1	0,1	
T5	0,1	0,0	0,0	Rocha y Treminio, 2008
T6	0,1	0,0	0,1	
T7	0,1	0,1	0,0	
T8	0,1	0,1	0,1	

Las variables que fueron evaluadas durante esta fase se detallan a continuación:

Adaptación del explante: se evaluó mediante la observación del cambio de pigmentación de las hojas de color blanco a verde, asignando 1 al explante adaptado y 0 al que no se adaptó al medio. Esta variable se evaluó dos veces.

Contaminación: Se evaluó dos veces a los 7 y 28 días de la introducción al medio, donde presencia se evaluó con 1 y ausencia con 0.

Longitud del explante: Se midió con papel milimetrado estéril la longitud en centímetros (cm) del explante, dos veces, antes de introducir al medio y a la salida de la fase de introducción.

El análisis estadístico para los tratamientos de la fase de establecimiento *in vitro* residió en un análisis de varianza, tablas estadísticas y gráficas de frecuencias.

2.4.3. Fase de multiplicación

Los explantes pasaron de la fase de establecimiento a la fase de multiplicación en el medio MS suplementado con tres dosis de 6 Benzilaminopurina (BAP), dos tipos de corte del explante y consistencia del medio mediante dos dosis de agar líquido y semisólido, (Tabla 2.3) los explantes fueron introducidos en contenedores plásticos.

Para esta fase se realizó un ANOVA, tablas estadísticas y gráficas de frecuencias, el número de observaciones para cada uno de los tratamientos fueron de 8.

Tabla 2.3 Dosis de BAP, tipos de corte del explante y consistencia del medio en la fase de multiplicación.

Tratamiento	Dosis de BAP (ppm)	Tipo de corte del explante	Consistencia del medio	Referencias bibliográficas
T0	0,0	Longitudinal	Líquido	Zamora y Juárez, 2008.
T1	1,0	Longitudinal	Líquido	
T2	2,0	Longitudinal	Líquido	
T3	0,0	Longitudinal	Semisólido	
T4	1,0	Longitudinal	Semisólido	
T5	2,0	Longitudinal	Semisólido	
T6	0,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Líquido	
T7	1,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Líquido	
T8	2,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Líquido	
T9	0,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Semisólido	Rocha y

Tratamiento	Dosis de BAP (ppm)	Tipo de corte del explante	Consistencia del medio	Referencias bibliográficas
T10	1,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Semisólido	Treminio, 2008.
T11	2,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Semisólido	

Las variables evaluadas durante esta fase fueron las siguientes:

Presencia y número de brotes: El número de brotes fue contabilizado antes de ser sembrados y después de las seis semanas que estuvieron durante esta fase.

Longitud del explante: Se midió con papel milimetrado estéril la longitud en centímetros (cm) del explante, dos veces, antes de introducir al medio y a la salida de la fase de multiplicación.

Porcentaje de mortalidad: Se contaron los explantes muertos al final de la fase de multiplicación, para obtener su porcentaje.

2.4.4. Fase de enraizamiento

Después de la fase de multiplicación, los explantes pasaron a la fase de enraizamiento en medio semisólido, con el propósito de evaluar el efecto de dos auxinas, Acido indol butírico (AIB) y Acido indol acético, para la formación de raíces. Para esta fase se utilizó el medio de cultivo MS suplementado con tres dosis de cada auxina como se indica en el siguiente cuadro:

Tabla 2.4 Dosis de AIB y dosis de AIA para la fase de enraizamiento.

Tratamiento	Dosis de AIB (ppm)	Dosis de AIA (ppm)	Referencias bibliográficas
T1	0,0	0,0	Zamora y Juárez, 2008.
T2	0,5	0,0	
T3	1,0	0,0	
T4	0,0	0,5	
T5	0,5	0,5	
T6	1,0	0,5	
T7	0,0	1,0	González <i>et. al.</i>
T8	0,5	1,0	

Tratamiento	Dosis de AIB (ppm)	Dosis de AIA (ppm)	Referencias bibliográficas
T9	1,0	1,0	

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza, gráficos estadísticos y tablas de frecuencia. Se realizó 8 repeticiones por cada tratamiento, durante 5 semanas

Los explantes fueron sembrados en contenedores plásticos de 250ml, se introdujeron tres explantes por contenedor.

Las variables que se evaluaron durante esta fase fueron las siguientes:

Longitud de la raíz: se midió en centímetros (cm), con papel milimetrado estéril la longitud máxima de la raíz, una sola vez, a la salida de la fase de enraizamiento.

Altura del explante: Se midió con papel milimetrado estéril la longitud en centímetros (cm) de la planta, dos veces, antes de la introducción y a la salida de la fase de enraizamiento.

Color del explante: se evaluó el color mediante la escala colorimétrica establecida por Lindsey y Brown 2006, para determinar si existe variación del color antes y después del enraizamiento del explante.

2.5. Desarrollo del experimento

2.5.1. Fase de preparación

2.5.1.1. Selección del material vegetativo

Las plantas se obtuvieron de los laboratorios "AGROBIOTECH", analizando su estado, es decir observando que los hijuelos se encuentren en buen estado para que sirva de base para las etapas que se desarrollaron.

Daquinta 2010, recomienda que antes de usar estas plantas es necesario eliminar toda el agua que se encuentre entre las hojas para disminuir la contaminación, es recomendable dejarlas secar durante 15 días, y poner agua solo para que se absorbida por las raíces.



Figura 2.1 Plantas con hijuelos de *Aechmea fasciata*.

2.5.2. Fase de desinfección

Debido a la forma que presentan estas plantas, fue necesario utilizar un cuchillo o bisturí para eliminar las hojas sin lastimar los brotes laterales que fueron utilizados, se eliminó hoja por hoja hasta llegar al tallo donde se encontraban los brotes laterales y principalmente el apical. Con mucho cuidado se lavaron los explantes con jabón líquido y abundante agua corriente.



Figura 2.2 A) Hijuelo de *A. fasciata* con hojas. B) Hijuelo de *A. fasciata* sin hojas.

El material vegetativo presentó elevados índices de contaminación, por lo que fue necesario realizar algunos tratamientos de desinfección previos basados en estudios relacionados anteriores.

2.5.2.1. Métodos de desinfección

El procedimiento desarrollado fue el siguiente: se retiró cuidadosamente con ayuda de un bisturí las hojas del hijuelo de *A. fasciata*, se limpió el material vegetativo con jabón líquido, se enjuagó con abundante agua, y se repitió tres veces el mismo procedimiento.

Después del lavado de los explantes, fueron sumergidos en ácido acético al 80% durante 20 minutos, y luego colocados en peróxido de hidrógeno al 50% durante 10 minutos. En cámara se procedió a seguir los tratamientos a evaluarse recomendados por Zamora *et. al* (2008) y Garita *et. al* (2000):

1. En un frasco aséptico se colocó los explantes junto con el cloro al 1% y se agitó durante 5 minutos, luego se enjuagó con agua estéril tres veces.
2. En un frasco aséptico se colocó los explantes junto con el cloro al 1% y se agitó durante 10 minutos, luego se enjuagó con agua estéril tres veces.
3. En un frasco aséptico se colocó los explantes junto con el cloro al 2% y se agitó durante 5 minutos, luego se enjuagó con agua estéril tres veces.
4. En un frasco aséptico se colocó los explantes junto con el cloro al 2% y se agitó durante 10 minutos, luego se enjuagó con agua estéril tres veces.

Posteriormente, los explantes posiblemente desinfectados por los tratamientos aplicados fueron cortados dentro de la cámara de flujo, eliminando algunas hojas que fueron lastimadas por los agentes desinfectantes, hasta obtener un explante útil para su adaptación. Los explantes fueron sembrados en frascos de vidrio, un explante por frasco.



Figura 2.3. A) Explantes sumergidos en ácido cítrico hasta su siembra. B) Explantes listos para la desinfección en cámara. C) Explantes que serán introducidos en el medio de cultivo. D) Explantes sembrados.

2.5.2.2 Medio de cultivo

Los explantes fueron sembrados en un medio basal modificado con sales de M&S enriquecido con 15 g/L de azúcar y 5 g/L de agar. El pH del medio se ajustó a $5,7 \pm 0,1$ y posteriormente fue esterilizado en el autoclave a $121,5^{\circ}\text{C}$ y 15 lb de presión durante 20 minutos. (Roca y Mroginski, 1991).

2.5.2.3 Condiciones de cultivo

Los explantes introducidos in vitro permanecieron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas y 8 horas de oscuridad. Los explantes permanecieron durante 28 días.

2.5.3. Fase de introducción

En la fase de multiplicación se probaron ocho tratamientos, es decir ocho medios de cultivo con la finalidad de evaluar la adaptación al medio.

2.5.3.1. Medio de cultivo

Los explantes fueron cultivados en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de ácido nicotínico, $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de tiamina, $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de mio-inositol y $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de glicina, enriquecido con 15 mgL^{-1} de azúcar y 5 mgL^{-1} de agar, suplementado con 1 mgL^{-1} de Bencil amino purina, $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de Ácido indol acético, $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ Ácido indol butírico, $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ Acido Naftalenacético. El pH del medio se ajustó a $5,7 \pm 1$ y posteriormente se esterilizó en la autoclave a $121,5^\circ \text{C}$ y 15 lb de presión durante 20 minutos. A continuación se detallan los tratamientos que se siguieron en esta fase:

Tabla 2.5 Tratamientos utilizados en la fase de introducción.

Tratamiento	Medio MS + [] Auxinas
1	ANA [0ppm] + AIA [0ppm] + AIB [0ppm]
2	ANA [0ppm] + AIA [0ppm] + AIB [0,1ppm]
3	ANA [0ppm] + AIA [0,1ppm] + AIB [0ppm]
4	ANA [0ppm] + AIA [0,1ppm] + AIB [0,1ppm]
5	ANA [0,1ppm] + AIA [0ppm] + AIB [0ppm]
6	ANA [0,1ppm] + AIA [0ppm] + AIB [0,1ppm]
7	ANA [0,1ppm] + AIA [0,1ppm] + AIB [0ppm]
8	ANA [0,1 ppm] + AIA [0,1ppm] + AIB [0,1ppm]

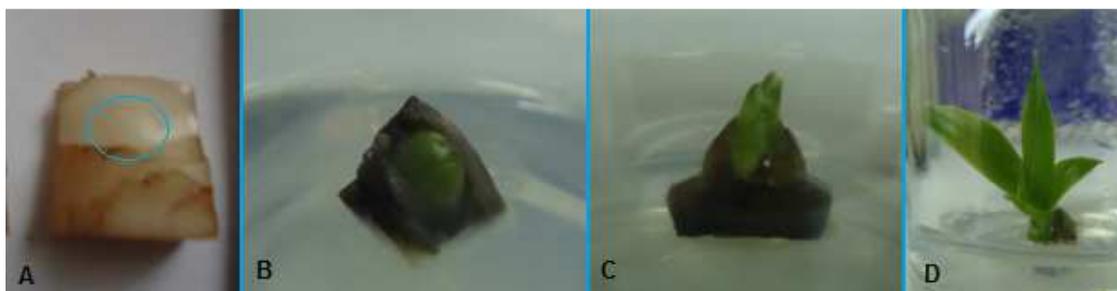


Figura 2.4 A) Brote de *A. fasciata* a desarrollarse B) Brote de *A. fasciata* a los 20 días de siembra. C) Brote de *A. fasciata* a los 30 días. D) Brote de *A. fasciata* lista para la siguiente fase.

2.5.3.2. Condiciones de cultivo

Los explantes introducidos *in vitro* permanecieron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de $18 \pm 2^\circ \text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas y 8 horas de oscuridad. Los explantes permanecieron durante 35 días.

2.5.4. Fase de multiplicación

En la cámara de flujo laminar los explantes que sobrevivieron en la fase de introducción son los que sirvieron en la fase de multiplicación, se eliminaron las hojas necrosadas del explante, se realizaron los cortes longitudinal y ruptura de la dominancia apical, según correspondía el tratamiento que se deseó evaluar, obteniendo 2 explantes nuevos.

Los nuevos explantes fueron colocados en los 12 tratamientos para la proliferación de brotes (tabla 2.5) El procedimiento fue realizado bajo condiciones de flujo laminar con la ayuda de un bisturí (mango N°7) y pinzas estériles.

2.5.4.1. Medio de cultivo

Los nuevos explantes fueron introducidos en los doce medios de multiplicación para la formación de brotes, donde interactuaron 3 dosis (0,1, 2 ppm) de citoquinina (BAP), consistencia del medio semisólido y líquido, y 2 cortes del explante (cortes longitudinal y ruptura de la dominancia apical) recomendado por Zamora *et. al* (2008) y Garita *et. al* (2000). El pH del medio se ajustó a $5,7 \pm 1$ y posteriormente se esterilizó en la autoclave a $121,5^{\circ}\text{C}$ y 15 lb de presión durante 20 minutos (Roca y Mroginski, 1991).

Tabla 2.6 Tratamientos utilizados en la fase de multiplicación.

Tratamiento	Consistencia del medio + Tipo de corte del explante + [] BAP
0	Líquido + Longitudinal + [0ppm]
1	Líquido + Longitudinal + [1ppm]
2	Líquido + Longitudinal + [2ppm]
3	Semisólido + Longitudinal + [0ppm]
4	Semisólido + Longitudinal + [1ppm]
5	Semisólido + Longitudinal + [2ppm]
6	Líquido + Longitudinal y dominancia apical + [0ppm]
7	Líquido + Longitudinal y dominancia apical + [1ppm]
8	Líquido + Longitudinal y dominancia apical + [2ppm]

Tratamiento	Consistencia del medio + Tipo de corte del explante + [] BAP
9	Semisólido + Longitudinal y dominancia apical + [0ppm]
10	Semisólido + Longitudinal y dominancia apical + [1ppm]
11	Semisólido + Longitudinal y dominancia apical + [2ppm]

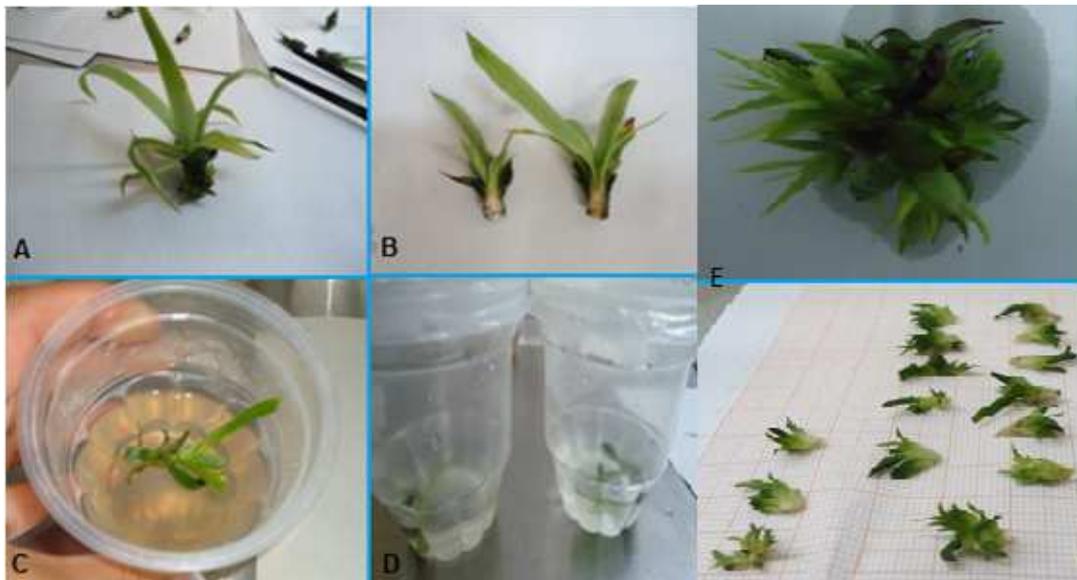


Figura 2. 5 A) Explante listo para ser cortado. B) Explantes con corte longitudinal. C) Explante sembrado en medio semisólido. D) Explantes sembrados en medio líquido. E) Explantes multiplicados.

2.5.4.2. Condiciones de cultivo

Los explantes introducidos in vitro permanecieron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas y 8 horas de oscuridad. Los explantes permanecieron durante 42 días.

2.5.5. Fase de enraizamiento

Los explantes pasaron de la fase de multiplicación a la fase de enraizamiento, se eliminaron las hojas necrosadas del explante y se midió su longitud.

Los explantes fueron introducidos en los 9 tratamientos (Tabla 2.6) de enraizamiento para el crecimiento de raíces. El procedimiento fue realizado bajo condiciones de flujo laminar con la ayuda de un bisturí (mango N° 7) y pinzas estériles.

2.5.5.1. Medio de cultivo

Se utilizaron 9 tratamientos de cultivo, los medios de enraizamiento estuvieron elaborados por 3 interacciones de auxinas, AIA (0, 0,5 y 1 ppm) y AIB (0, 05,5 y 1ppm) recomendados por Zamora *et. al* (2008) y González *et. al* 1999. El pH del medio se ajustó a $5,7 \pm 1$ y posteriormente se esterilizó en la autoclave a $121,5^{\circ}\text{C}$ y 15lb de presión durante 20 minutos.

Tabla 2.7 Tratamientos utilizados en la fase de enraizamiento.

Tratamiento	Medio MS + [] Auxinas
1	AIB [0ppm] + AIA [0ppm]
2	AIB [0,5ppm] + AIA [0ppm]
3	AIB [1ppm] + AIA [0ppm]
4	AIB [0ppm] + AIA [0,5ppm]
5	AIB [0,5ppm] + AIA [0,5ppm]
6	AIB [1ppm] + AIA [0,5ppm]
7	AIB [0ppm] + AIA [1ppm]
8	AIB [0,5ppm] + AIA [1ppm]
9	AIB [1ppm] + AIA [1ppm]

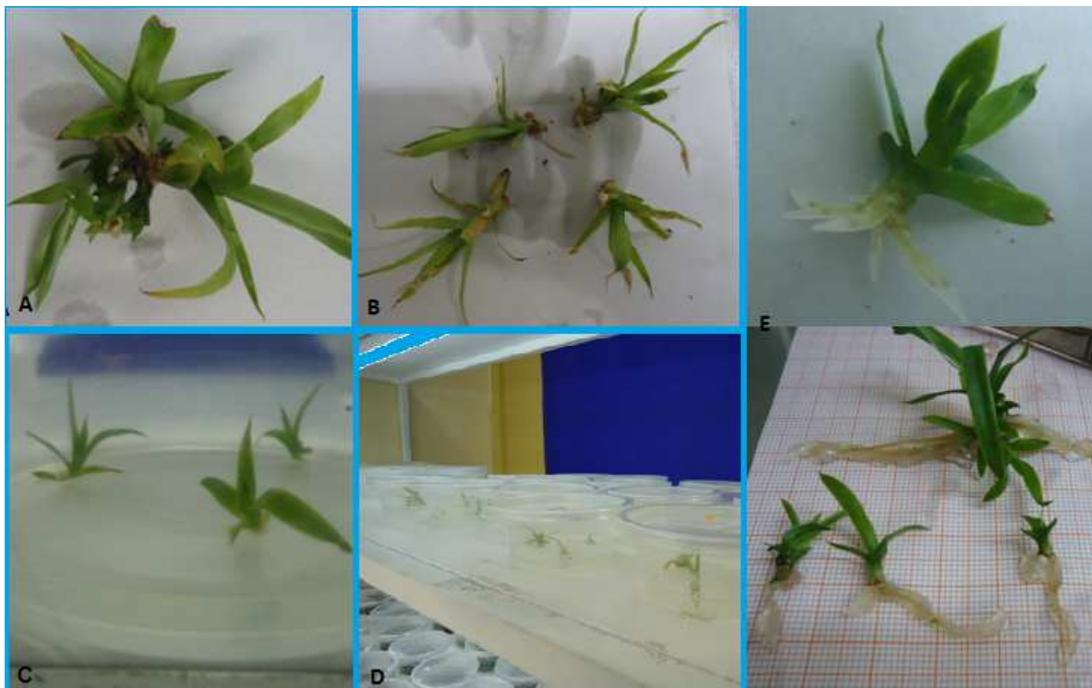


Figura 2.6 A) Explante con nuevos brotes. B) Brotes separados del explante principal. C) Explantes sembrados en el medio de enraizamiento. D) Explantes sembrados en los 9 tratamientos. E) Explantes con raíces.

2.5.5.2. Condiciones de cultivo

Los explantes introducidos *in vitro* permanecieron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas y 8 horas de oscuridad. Los explantes permanecieron durante 28 días.

2.6. Análisis económico para la regeneración de plantas de *Aechmea fasciata*.

Se aplicó la metodología para producción de plantas *in vitro* de *A. fasciata* utilizando los tratamientos más eficientes en las etapas de desinfección, introducción, multiplicación y enraizamiento. Para el análisis económico se tomó en cuenta los costos de los materiales directos, equipos, materiales de laboratorio, suministros y mano de obra directa e indirecta. También se determinó el costo total de producción y el costo unitario de cada planta de *A. fasciata*.

2.7. Equipos y materiales

2.7.1 Material vegetal

Plantas de *Aechmea fasciata* con hijuelos.

2.7.2 Materiales de laboratorio

- Pinzas
- Probetas 5ml y 100ml
- Frascos de vidrio
- Contenedores plásticos
- Jarras plásticas
- Fundas plásticas
- Papel estéril
- Papel milimetrado estéril
- Papel toalla
- Papel aluminio

2.7.3 Equipos de laboratorio

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Balanza de precisión
- pH metro
- Refrigeradora

2.7.4 Reactivos

- Ácido cítrico
- Ácido ascórbico
- Alcohol al 70%
- Hipoclorito de sodio
- Peróxido de hidrógeno
- Antibiótico (tetraciclina)
- Medio Murashige & Skoog
- Agar
- Ácido Indol acético
- Ácido Indol butírico
- Acido naftalenacético
- Bencil amino purina
- Carbón activado

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Etapa de desinfección

Durante la etapa de desinfección se evaluó la contaminación (bacteriana y fúngica), fenolización y mortalidad de los explantes de *Aechmea fasciata*, a partir de tratamientos con hipoclorito de sodio (NaClO) (0,5%, 0,75% y 1%) y tiempos de inmersión (tres y cinco minutos). La evaluación del efecto de las variables se analizó por separado para cada una de las variables.

3.1.1. Contaminación

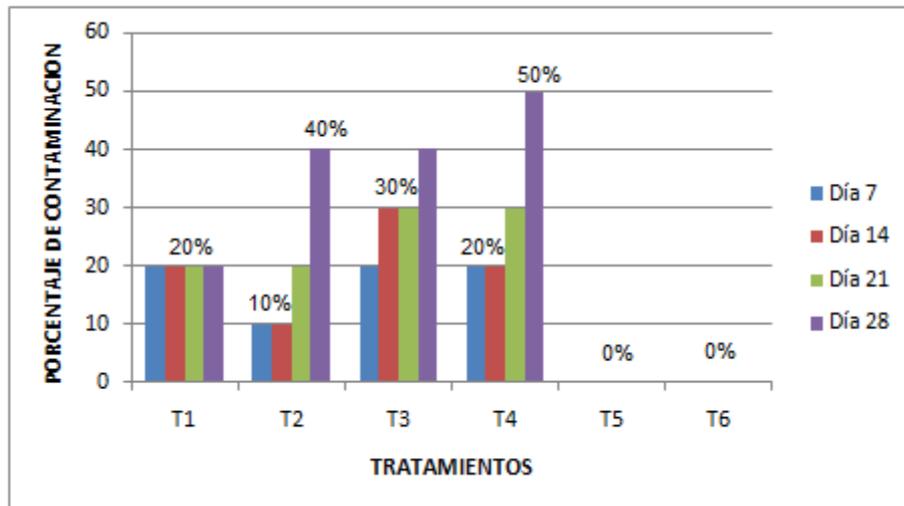
a. Análisis exploratorio de datos

Para evaluar los datos obtenidos en la primera fase de contaminación bacteriana, se realizó una tabla de contingencia Tabla 3.1, donde los resultados indican que el tratamiento 4 presenta el mayor porcentaje de contaminación a los 28 días de ser evaluados los explantes, de manera contraria el tratamiento 5 y 6 indican que no hubo contaminación en los explantes durante los 28 días que duró la etapa de desinfección; lo que indica que a una mayor concentración (1%) de hipoclorito de sodio disminuye la contaminación, además se observa que a bajas concentraciones (0,5% y 0,75%) no existe una gran diferencia entre los tratamientos ya que el porcentaje de contaminación indica una semejanza entre dichos tratamientos Figura 3.1.

Tabla 3.1 Porcentajes de contaminación durante el período de evaluación.

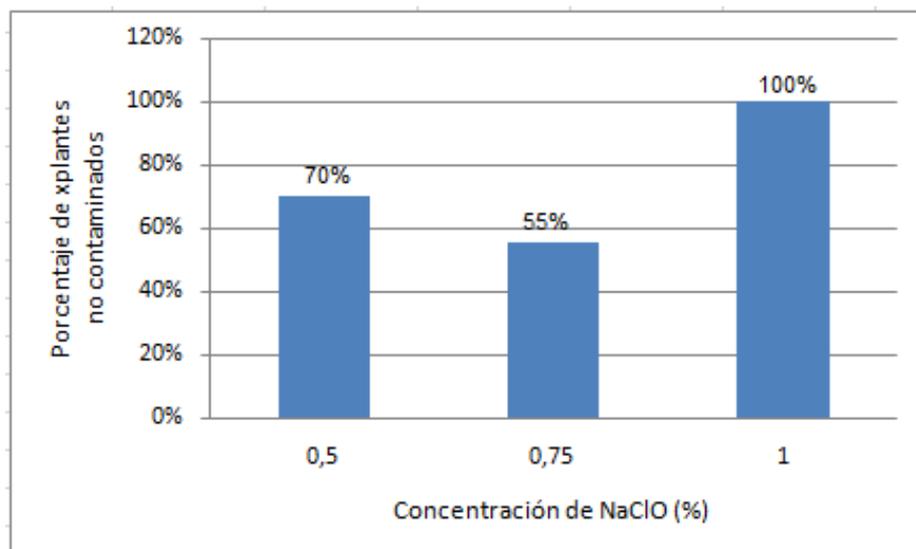
TRATAMIENTO	CONTAMINACIÓN			
	7 días	14 días	21 días	28 días
T1 (0,5% - 3min)	20%	20%	20%	20%
T2 (0,5% - 5min)	10%	10%	20%	40%
T3 (0,75% - 3 min)	20%	30%	30%	40%
T4 (0,75% - 5 min)	20%	20%	30%	50%
T5 (1% - 3 min)	0%	0%	0%	0%
T6 (1% - 5min)	0%	0%	0%	0%

Figura 3.1. Gráfico del porcentaje de contaminación después de la aplicación de los tratamientos de NaClO.



Respecto a la concentración de NaClO se realizó una distribución de frecuencias para analizar el porcentaje de explantes que presentaron una respuesta favorable a dichas concentraciones; se observa que a una concentración de 1% el porcentaje de descontaminación obtuvo un 100%, seguido de la concentración de 0,5% que presentó un porcentaje del 70% y la concentración de 0,75% que presenta una descontaminación del 55% resultando como la concentración menos eficiente para la desinfección (Figura 3.2.).

Figura 3.2 Gráfica de frecuencias de explantes no contaminados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio.



De la misma manera que en la concentración de hipoclorito de sodio, se realizó una distribución de frecuencias del grupo no contaminado que indica el porcentaje en la muestra analizada, presentando que para un tiempo de inmersión de tres minutos el porcentaje de explantes no contaminados es de 67%, mientras que para un tiempo de inmersión de cinco minutos el porcentaje alcanza un 84% de explantes no contaminados, esta diferencia determina que en un mayor tiempo de inmersión del explante en hipoclorito de sodio puede disminuir la contaminación. (Figura 3.3).

Figura 3.3 Gráfica de frecuencias de explantes no contaminados respecto al tiempo de inmersión

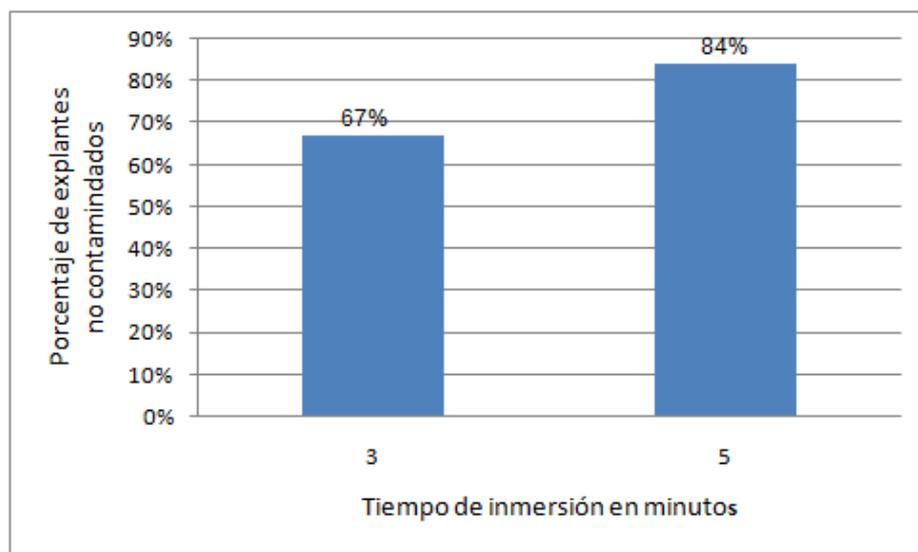
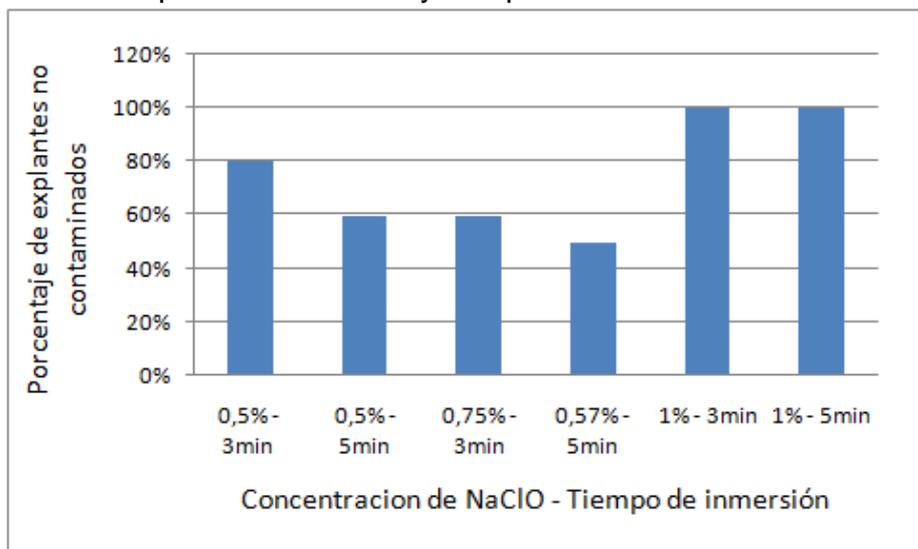


Figura 3.4 Gráfica de frecuencias de explantes no contaminados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión.



La Figura 3.4 muestra la relación entre los factores aplicados, la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión para evaluar la variable contaminación, se realizó una distribución de frecuencias de interacción, donde se evidencia que la concentración de hipoclorito de sodio de 1% es eficiente para el proceso de desinfección y que al aplicarla a un tiempo de inmersión de tres y cinco minutos el resultado es favorable, lo que conlleva a aceptar que el tratamiento cinco y seis son los tratamientos indicados para la desinfección de los explantes de *Aechmea fasciata*. También se puede observar que el tratamiento cuatro es el menos indicado para la realización del proceso de descontaminación de los explantes.

b. Análisis inferencial

Para realizar el análisis de varianza se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman (tabla 3.2). El resultado de la prueba indica que existen diferencias significativas entre tratamientos ya que el valor calculado presenta un $p = 3\%$ demostrando que existen diferencias en las ubicaciones de las distribuciones de probabilidad de contaminación, asignando la letra A, a los tratamientos T5, T6, T1 indicando que no son significativamente diferentes entre sí, letra B a los tratamientos T6 y T1 y una letra C a T1, T2, T3 y T4.

Tabla 3.2 Prueba de Friedman para la variable contaminación.

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n	
T5	27,50	2,75	10	A
T6	27,50	2,75	10	A B
T1	33,50	3,35	10	A B C
T2	39,50	3,95	10	C
T3	39,50	3,95	10	C
T4	42,50	4,25	10	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,050$)

Dado que, para los distintos tratamientos, los valores obtenidos de la variable contaminación son dicotómicos, es necesario un análisis no paramétrico para analizar el comportamiento de la variable según el tratamiento aplicado, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, se determinó que si existe una diferencia significativa entre las distribuciones.

Al analizar las cuatro evaluaciones durante 28 días se determinó que la última semana fue donde se encontró la diferencia entre los tratamientos ($p=3,06\%$), (Anexos 6, 7 y 8).

Tabla 3.3 Prueba de Kruskal-Wallis para la variable contaminación (28 días).

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
CONTAMINACIÓN 1,00	1,00	10	0,20	0,42	0,00	6,93	0,0306
CONTAMINACIÓN 2,00	2,00	10	0,40	0,52	0,00		
CONTAMINACIÓN 3,00	3,00	10	0,40	0,52	0,00		
CONTAMINACIÓN 4,00	4,00	10	0,50	0,53	0,50		
CONTAMINACIÓN 5,00	5,00	10	0,00	0,00	0,00		
CONTAMINACIÓN 6,00	6,00	10	0,00	0,00	0,00		

3.1.2. Fenolización

a. Análisis exploratorio de datos

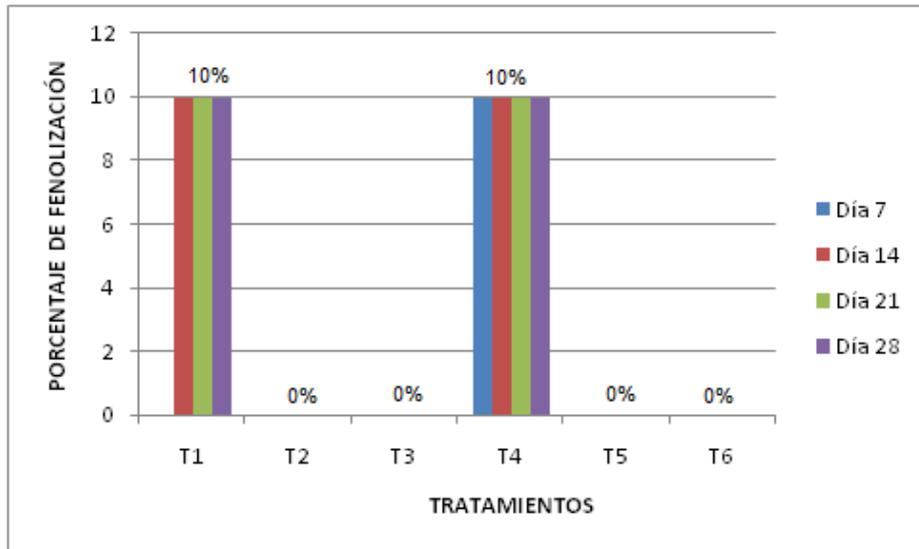
Para los datos obtenidos en la variable fenolización, se realizó una tabla de contingencia (Tabla 3.4) donde los resultados muestran que en el tratamiento 1 y 4, durante los 28 días de evaluación, hubo fenolización en los explantes.

Existe una similitud entre los porcentajes de los dos tratamientos que presentaron fenolización (0,5% y 0,75%, tres y cinco minutos respectivamente) (Figura 3.5) y debido a que no hubo presencia en los cuatro tratamientos restantes, se puede determinar que la variable fenolización no está influenciada por las concentraciones de hipoclorito de sodio utilizadas en la fase de desinfección.

Tabla 3.4 Porcentajes de fenolización durante el período de evaluación.

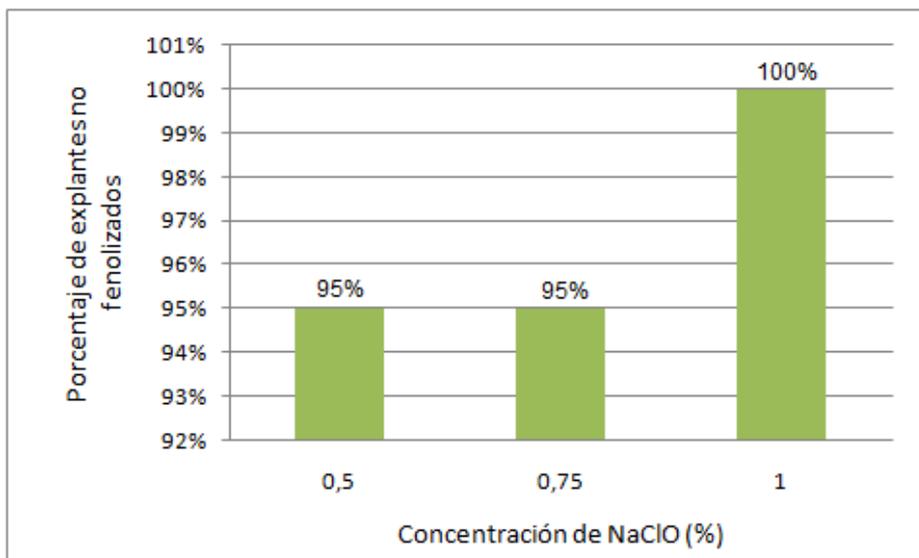
TRATAMIENTO	FENOLIZACIÓN			
	7 días	14 días	21 días	28 días
T1 (0,5% - 3min)	0%	10%	10%	10%
T2 (0,5% - 5min)	0%	0%	0%	0%
T3 (0,75% - 3 min)	0%	0%	0%	0%
T4 (0,75% - 5 min)	10%	10%	10%	10%
T5 (1% - 3 min)	0%	0%	0%	0%
T6 (1% - 5min)	0%	0%	0%	0%

Figura 3.5 Gráfico de porcentaje de fenolización después de la aplicación de los tratamientos de NaClO.



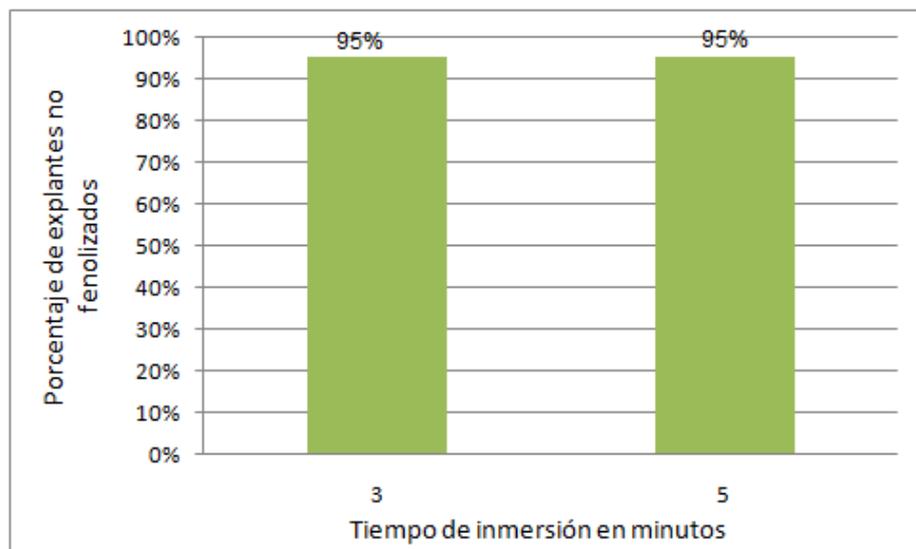
Referente a la concentración de NaClO se efectuó una distribución de frecuencias para analizar el porcentaje de explantes que mostraron una respuesta favorable a las concentraciones utilizadas; se observa que a una concentración de 1% el porcentaje de explantes no fenolizados obtuvo un 100%, mientras que las concentraciones de 0,5% y 0,75% presentan un porcentaje de 95% (Figura 3.6), lo cual indica que no existe una gran diferencia entre los tratamientos.

Figura 3.6 Gráfica de frecuencias de explantes no fenolizados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio.



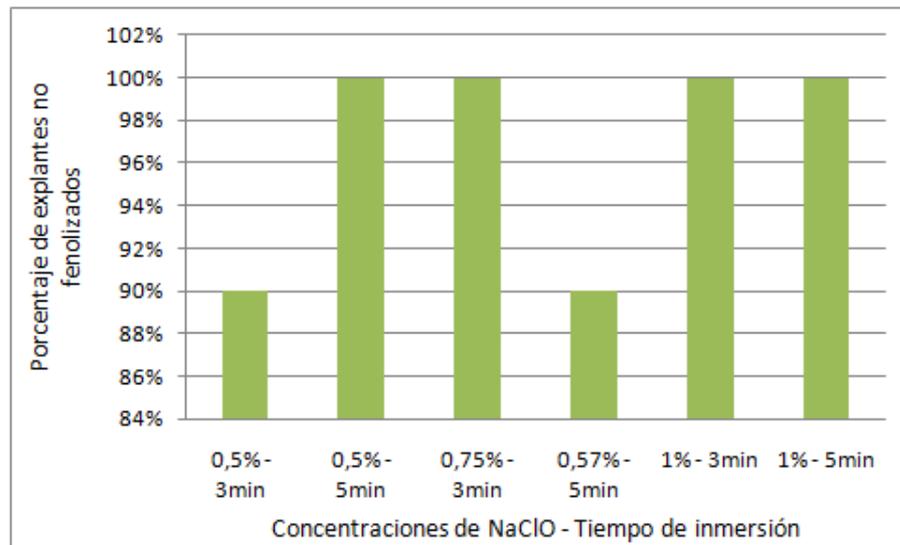
También se realizó una distribución de frecuencias de grupo no fenolizado que indica el porcentaje de la muestra analizada, presentando que para un tiempo de inmersión de tres y cinco minutos el porcentaje de explantes no fenolizados es el mismo, 95% (Figura 3.7).

Figura 3.7 Gráfica de frecuencias de explantes no fenolizados respecto al tiempo de inmersión.



En la Figura 3.8 se puede observar la relación entre los factores aplicados la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión para evaluar la variable fenolización, al realizar una distribución de frecuencias de interacción, se demuestra que la concentración de hipoclorito de sodio al 0,5%, 0,75% y 1% con un tiempo de inmersión de 3 y 5 minutos presenta el mismo vel de porcentaje de explantes no fenolizados, lo que resulta que estos tratamientos no afecta en la variable fenolización.

Figura 3.8 Gráfica de frecuencias de explantes no fenolizados respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión.



b. Análisis inferencial

Para realizar el análisis de varianza se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman debido a que el diseño se ajusta a un diseño de bloques aleatorizados el valor obtenido mediante esta prueba $p = 42\%$ indica que no existen diferencias en las distribuciones de probabilidad de la variable fenolización, asignando la letra A, a todos los tratamientos lo cual representa un mismo nivel de significancia (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Prueba de Friedman para la variable fenolización.

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n
T6	34,00	3,40	10 A
T5	34,00	3,40	10 A
T3	34,00	3,40	10 A
T2	34,00	3,40	10 A
T4	37,00	3,70	10 A
T1	37,00	3,70	10 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p <= 0,050$)

Los resultados obtenidos de la variable fenolización en los distintos tratamientos, es dicotómica, por lo cual es necesario realizar un análisis no paramétrico para analizar el comportamiento de la variable según el tratamiento aplicado, la prueba de Kruskal-Wallis, determinó que no existe una diferencia significativa entre las distribuciones de la fenolización en los tratamientos analizados ($p = 53,95\%$) (Tabla 3.6) (ANEXOS 9, 10 y 11).

Tabla 3.6 Prueba de Kruskal-Wallis para la variable fenolización.

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
FENOLIZACION	1,00	10	0,10	0,32	0,00	0,39	0,5395
FENOLIZACION	2,00	10	0,00	0,00	0,00		
FENOLIZACION	3,00	10	0,00	0,00	0,00		
FENOLIZACION	4,00	10	0,10	0,32	0,00		
FENOLIZACION	5,00	10	0,00	0,00	0,00		
FENOLIZACION	6,00	10	0,00	0,00	0,00		

3.1.3. Mortalidad

a. Análisis exploratorio de datos

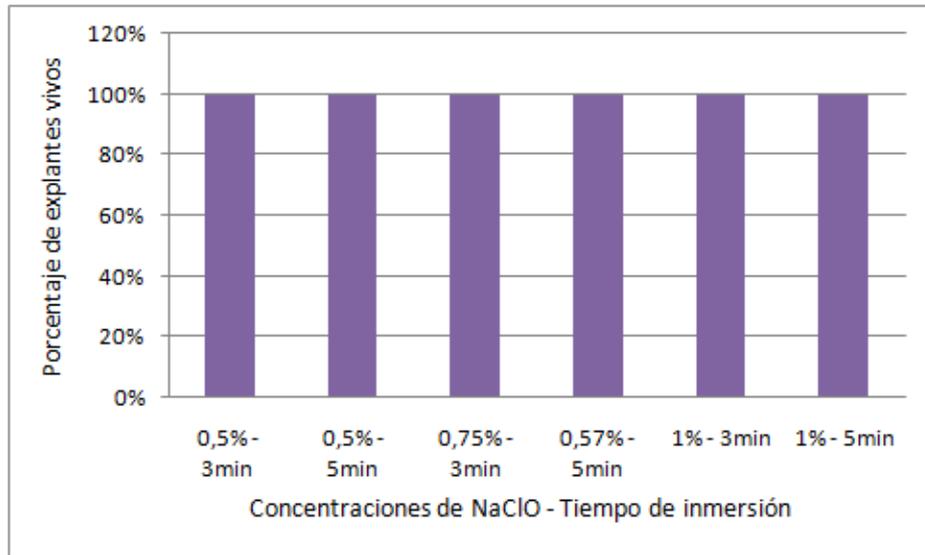
Para organizar los datos obtenidos, se realizó una tabla de contingencia (Tabla 3.7) en la que indica que no hubo mortalidad, es decir que todos los explantes sometidos a los seis diferentes tratamientos sobrevivieron, dando como resultado que las concentraciones de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión no influyen en la variable mortalidad.

Tabla 3.7 Porcentajes de mortalidad durante el período de evaluación.

TRATAMIENTO	MORTALIDAD			
	7 días	14 días	21 días	28 días
T1 (0,5% - 3min)	0%	0%	0%	0%
T2 (0,5% - 5min)	0%	0%	0%	0%
T3 (0,75% - 3 min)	0%	0%	0%	0%
T4 (0,75% - 5 min)	0%	0%	0%	0%
T5 (1% - 3 min)	0%	0%	0%	0%
T6 (1% - 5min)	0%	0%	0%	0%

En la Figura 3.9 se observa la relación entre la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión para evaluar la variable mortalidad, después de realizar la distribución de frecuencias de interacción, se indica que las diferentes concentraciones y tiempos de inmersión no afecta la mortalidad de los explantes de *Aechmea fasciata* en este presente estudio.

Figura 3.9 Gráfica de frecuencias de explantes vivos respecto a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión.



b. Análisis inferencial

Debido a que los tratamientos utilizados no afectan la mortalidad de los explantes de *Aechmea fasciata*, no es necesario evaluar la variable mortalidad con pruebas estadísticas ya que al introducir los datos, no se puede realizar las comparaciones requeridas.

3.2. Fase de establecimiento

Para esta etapa se utilizaron explantes desinfectados, cultivadas en el medio MS suplementado con 5gL^{-1} de sucrosa, además de 1ppm de BAP y combinaciones de ANA, AIA y AIB en concentraciones de 0 y 0,1ppm, las variables evaluadas fueron adaptación de explante, contaminación, fenolización, mortalidad y longitud del explante.

3.2.1. Adaptabilidad

a. Análisis exploratorio de datos

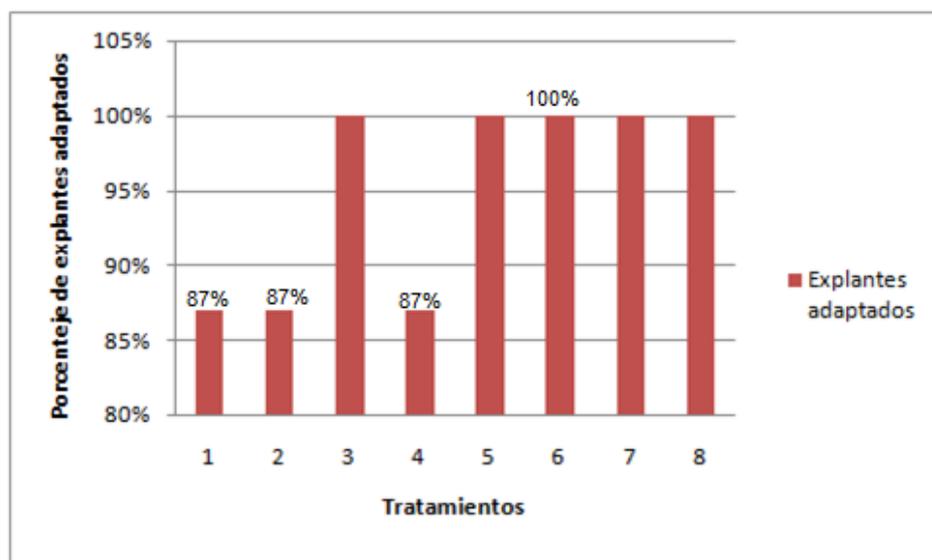
En esta fase se utilizaron ocho tratamientos para el establecimiento de brotes laterales y apicales de *Aechmea fasciata*:

Tabla 3.8 Tratamientos para la fase de establecimiento utilizando tres tipos de auxinas.

Tratamiento	ANA (mg/L)	AIA (mg/L)	AIB (mg/L)
1	0	0	0
2	0	0	0,1
3	0	0,1	0
4	0	0,1	0,1
5	0,1	0	0
6	0,1	0	0,1
7	0,1	0,1	0
8	0,1	0,1	0,1

Para analizar la variable adaptación se evaluó el cambio de pigmentación del explante de color blanco a verde, durante veinte y un días; para esto se realizó una tabla de contingencia (Anexo 5) donde se obtiene que los tratamientos uno, dos y tres presentan un 87% de adaptabilidad y los tratamientos tres, cinco, seis, siete y ocho una adaptabilidad del 100% (Figura 3.10)

Figura 3.10. Gráfica de frecuencias de explantes adaptados según los tratamientos utilizados.



b. Análisis inferencial

Para realizar el análisis de varianza se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman obteniendo como resultado que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 68\%$), es por eso que la prueba asigna la misma letra a todos los tratamientos.

Tabla 3.9 Prueba de Friedman para la variable adaptabilidad.

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n
TRAT 4	33,50	4,19	8 A
TRAT 2	33,50	4,19	8 A
TRAT 1	33,50	4,19	8 A
TRAT 8	37,50	4,69	8 A
TRAT 7	37,50	4,69	8 A
TRAT 6	37,50	4,69	8 A
TRAT 5	37,50	4,69	8 A
TRAT 3	37,50	4,69	8 A

Debido a que los valores obtenidos son dicotómicos es necesario realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, donde se determinó que no existen diferencias significativas entre las distribuciones de adaptabilidad para los tratamientos utilizados ($p = 64\%$).

Tabla 3.10 Prueba de Kruskal-Wallis para la variable adaptabilidad.

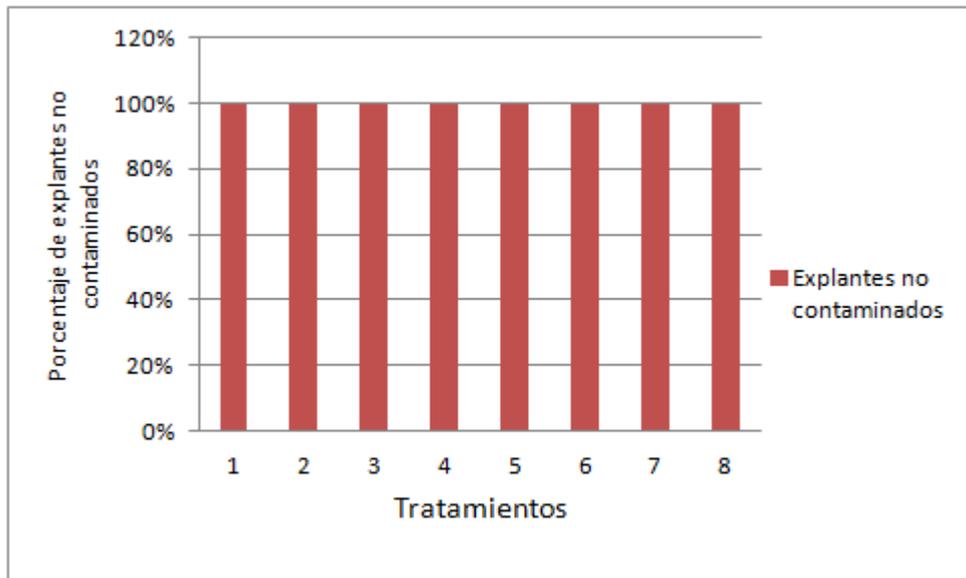
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Dia 21	1,00	8	0,88	0,35	1,00	0,69	0,6400
Dia 21	2,00	8	0,88	0,35	1,00		
Dia 21	3,00	8	1,00	0,00	1,00		
Dia 21	4,00	8	0,88	0,35	1,00		
Dia 21	5,00	8	1,00	0,00	1,00		
Dia 21	6,00	8	1,00	0,00	1,00		
Dia 21	7,00	8	1,00	0,00	1,00		
Dia 21	8,00	8	1,00	0,00	1,00		

3.2.2. Contaminación

a. Análisis exploratorio de datos

Para el análisis de la variable contaminación se evaluó la presencia o ausencia de colonias bacterianas en la superficie del medio o en el explante. Luego de los 21 días de la evaluación se encontró que todos los tratamientos resultaron favorables, es decir que no hubo presencia de bacterias u hongos.

Figura 3.11 Gráfica de frecuencias de explantes no contaminados según los tratamientos utilizados.



3.2.3. Longitud del explante

a. Análisis exploratorio de datos

Para el análisis de esta variable se evaluó el crecimiento del explante a partir de las combinaciones de las concentraciones de auxinas ANA, AIA y AIB. Todos los tratamientos están suplementados con 1mgL^{-1} .

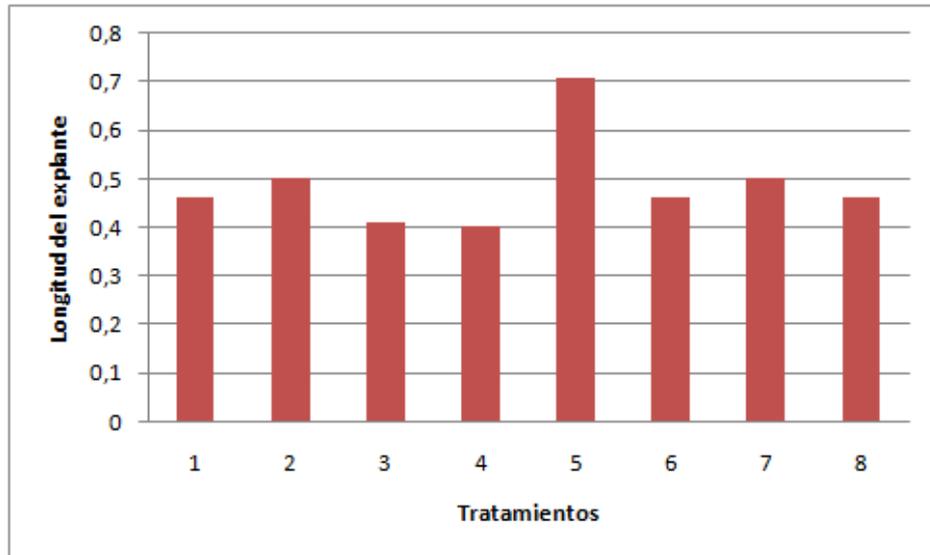
Para analizar las diferencias entre los tratamientos se realizó una tabla de contingencia de los promedios de longitud por tratamiento donde se indica que el tratamiento cinco presenta una mayor medida en la longitud de los explantes, los tratamientos dos y siete le siguen con una diferencia de 0,2 cm, los tratamientos uno, seis y ocho continúan con una diferencia de 0,3cm y por último los tratamientos tres y cuatro que son los que presentan menor longitud en el crecimiento de los explantes de los ocho tratamientos (Tabla 3.11)

Tabla 3.11 Promedio de longitudes de los explantes a partir de los tratamientos utilizados.

Tratamiento	ANA	AIA	AIB	Promedio de longitudes
1	0mg/L	0mg/L	0mg/L	0,46
2	0mg/L	0mg/L	0,1mg/L	0,5
3	0mg/L	0,1mg/L	0mg/L	0,41
4	0mg/L	0,1mg/L	0,1mg/L	0,40
5	0,1mg/L	0mg/L	0mg/L	0,71

Tratamiento	ANA	AIA	AIB	Promedio de longitudes
6	0,1mg/L	0mg/L	0,1mg/L	0,46
7	0,1mg/L	0,1mg/L	0mg/L	0,50
8	0,1mg/L	0,1mg/L	0,1mg/L	0,46

Figura 3.12 Gráfica de frecuencias del promedio de longitudes de los explantes de *Aechmea fasciata*.



b. Análisis inferencial

El ADEVA permitió concluir que existe una diferencia significativa entre los tratamientos $p = 1,9\%$, ya que existen interacciones entre las dosis de auxinas, lo que conllevó a realizar pruebas por cada interacción, utilizando la prueba de Tukey se encontró que el tratamiento con dosis de 0,1ppm de ANA, 0 ppm de AIA y 0ppm de AIB presentan diferencia significativa entre los tratamientos.

A diferencia de esto las auxinas AIB y AIA con concentraciones de 0 y 0,1 no presentan diferencias significativas entre los tratamientos (Anexo 12).

Dicho análisis permite asumir que el mejor tratamiento para evaluar la longitud de los explantes son los tratamientos que contienen como auxina ANA a una concentración de $0,1 \text{ mgL}^{-1}$.

Tabla 3.12 ADEVA para la longitud (cm) promedio de los explantes de *Aechmea fasciata* utilizando las interacciones de auxinas.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,17521
 Error: 0,0124 gl: 56

ANA	AIA	AIB	Medias	n	E.E.	
0,10	0,00	0,00	0,71	8	0,04	A
0,00	0,00	0,10	0,50	8	0,04	B
0,10	0,10	0,00	0,50	8	0,04	B
0,10	0,00	0,10	0,46	8	0,04	B
0,10	0,10	0,10	0,46	8	0,04	B
0,00	0,00	0,00	0,46	8	0,04	B
0,00	0,10	0,00	0,41	8	0,04	B
0,00	0,10	0,10	0,40	8	0,04	B

3.3. Fase de multiplicación

Para esta etapa se utilizó el Medio MS suplementado con 3 dosis de BAP (0,1 y 2ppm), dos tipos de corte del explante (longitudinal y longitudinal y apical) y consistencia del medio mediante dos dosis de agar, líquido y semisólido. Las variables evaluadas fueron: número de brotes, longitud del explante, contaminación y mortalidad del explante.

Para esta fase se utilizaron 12 tratamientos (Tabla 3.13) con 8 repeticiones cada una.

Tabla 3.13 Tratamientos utilizados en la fase de multiplicación.

Tratamiento	Dosis de BAP (ppm)	Tipo de corte del explante	Consistencia del medio
T1	0,0	Longitudinal	Líquido
T2	1,0	Longitudinal	Líquido
T3	2,0	Longitudinal	Líquido
T4	0,0	Longitudinal	Semisólido
T5	1,0	Longitudinal	Semisólido
T6	2,0	Longitudinal	Semisólido
T7	0,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Líquido

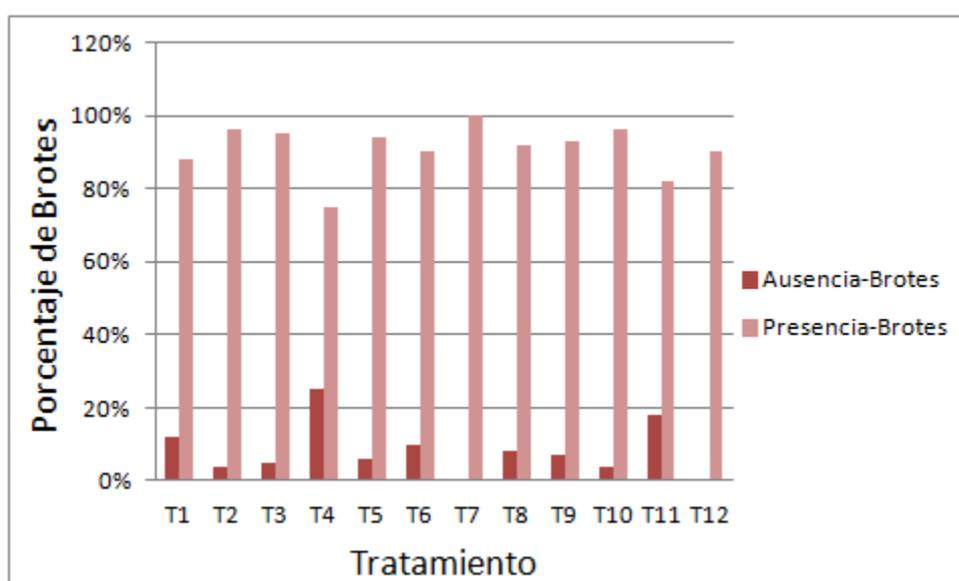
Tratamiento	Dosis de BAP (ppm)	Tipo de corte del explante	Consistencia del medio
T8	1,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Líquido
T9	2,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Líquido
T10	0,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Semisólido
T11	1,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Semisólido
T12	2,0	Longitudinal y ruptura de dominancia apical	Semisólido

3.3.1. Número de brotes

a. Análisis exploratorio de datos

Para analizar la variable número de brotes se realizó primero un gráfico de frecuencias indicando el porcentaje en cuanto a la presencia o ausencia de brotes por tratamiento.

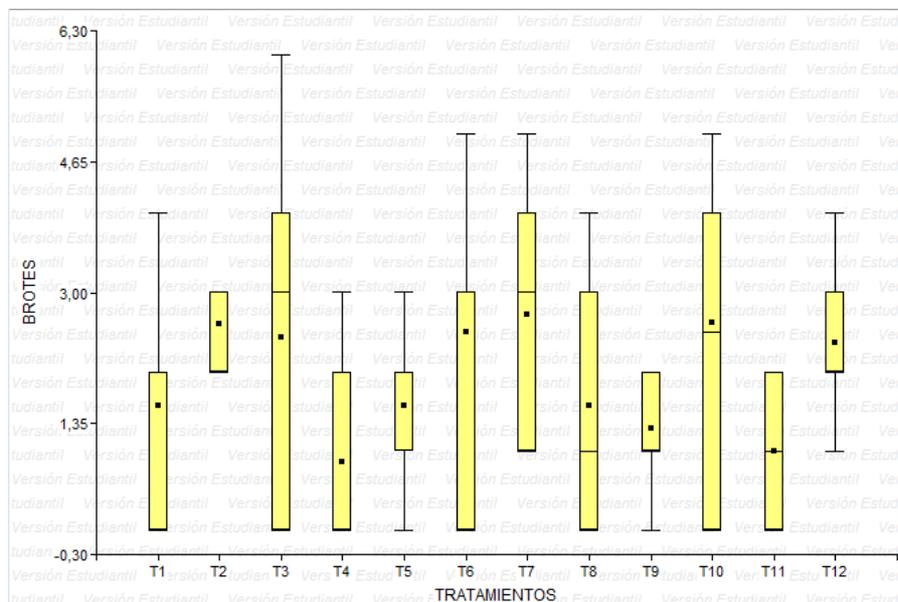
Figura 3.13 Gráfico de frecuencias del porcentaje de brotes en los 12 tratamientos.



La variable número de brotes se obtuvo del conteo de brotes de los explantes utilizados en los 12 tratamientos, a la sexta semana en la que fueron evaluados.

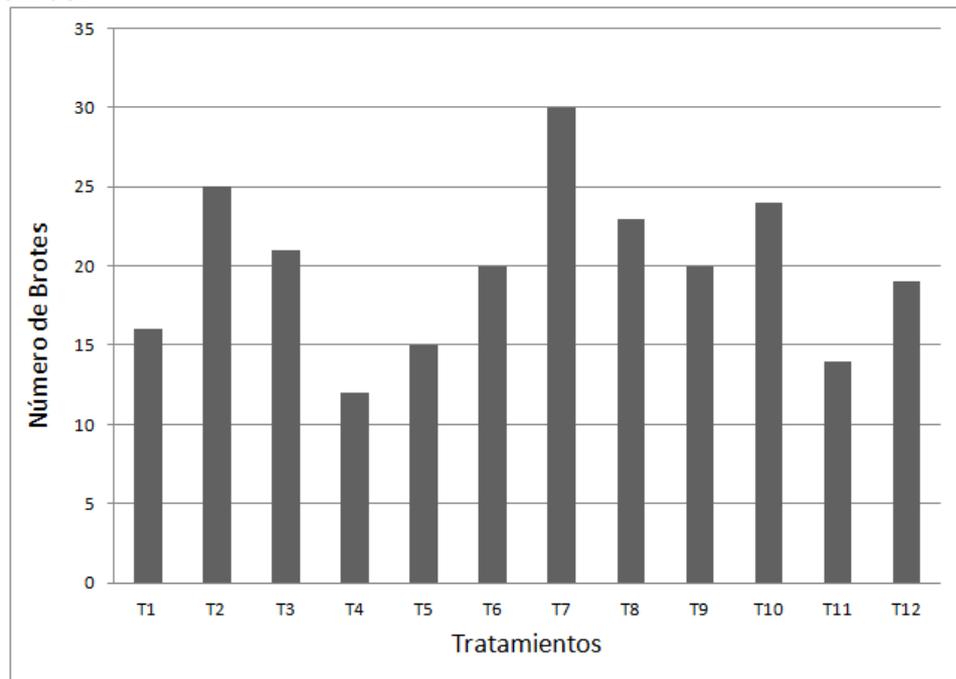
La Figura 3.14 indica las medias del número de brotes de cada tratamiento, se encontró que los tratamientos con mayor número de brotes son: T7 con una media de 2,7 brotes por explante, T2 con una media de 2,4 y T10 con una media de 2,1. Los tratamientos que presentaron menor número de brotes son T4 con una media de 0,8 brotes por explante y T11 con una media de 0,7.

Figura 3. 14 Gráfico de cajas mostrando las medias del número de brotes respecto a los 12 tratamientos.



La Figura 3.15 indica el número de brotes que se obtuvo de los explantes de las 8 repeticiones por cada tratamiento, dando como resultado que el mayor número de brotes presentó el tratamiento T7 con 30 brotes, seguido por el tratamiento T2 con 25 brotes; también se observa los tratamientos con menor número de brotes como son T11 con 14 número de brotes y T2 con 12 número de brotes.

Figura 3. 15 Gráfico de frecuencias respecto al número de brotes en los 12 tratamientos.



b. Análisis inferencial

Al realizar el ADEVA (ANEXO 15) se encontró que no existen diferencias significativas para el efecto de la hormona BAP, el corte del explante y el tipo de medio utilizados durante la evaluación del número de brotes.

De otro modo al realizar la prueba LSD de Fisher utilizando modelos lineales mixtos se encontró dos grupos estadísticos al analizar la interacción de BAP y tipo de corte, donde el grupo A está formado por los tratamientos T2, T3, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 y T12 y el grupo B lo conforman los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T9, T11 y T12.

Al analizar la interacción entre la concentración de BAP, el tipo de corte y la consistencia del medio la prueba de LSD de Fisher agrupa en dos grupos los tratamientos, grupo A formado por los tratamientos T1, T2, T3, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 y T12 y el grupo B formado por T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T9, T10, T11 y T12; lo cual se podría analizar que para el crecimiento de brotes no es necesario la presencia de la hormona BAP.

Tabla 3.14 Prueba LSD de Fisher para la interacción de BAP, tipo de corte y consistencia del medio.

Medias ajustadas y errores estándares para BAP*TIPO.CORTE*MEDIO
LSD Fisher (Alfa=0,05)

BAP	TIPO.CORTE	MEDIO	Medias	E.E.	
0	long y apical	liquido	3,75	0,80	A
1	longitudinal	liquido	3,13	0,80	A B
0	long y apical	semisólida	3,00	0,80	A B
1	long y apical	liquido	2,88	0,80	A B
2	longitudinal	liquido	2,63	0,80	A B
2	longitudinal	semisólida	2,50	0,80	A B
2	long y apical	semisólida	2,38	0,80	A B
0	longitudinal	liquido	2,00	0,80	A B
1	longitudinal	semisólida	1,88	0,80	A B
2	long y apical	liquido	1,75	0,80	A B
1	long y apical	semisólida	1,75	0,80	A B
0	longitudinal	semisólida	1,50	0,80	B

3.3.2. Longitud de brotes

a. Análisis exploratorio de datos

Esta variable se obtuvo del promedio de longitudes de los explantes de los brotes de las unidades experimentales viables, a la sexta semana de cultivo de los 12 tratamientos.

En las siguientes figuras se indica la variación de longitud de los explantes de cada tratamiento, también se indica las medias de las longitudes, dando como resultado que las mayores longitudes son: tratamiento T7 con una media de 3,75cm de longitud, seguida de los tratamientos T2 con una media de 2,75 cm y T10 con una media de 2,11 cm. Además el menor tamaño se observó en el tratamiento T11 1,1cm de longitud.

Figura 3.16 Gráfico de cajas mostrando las medias de la longitud de explantes respecto a los 12 tratamientos.

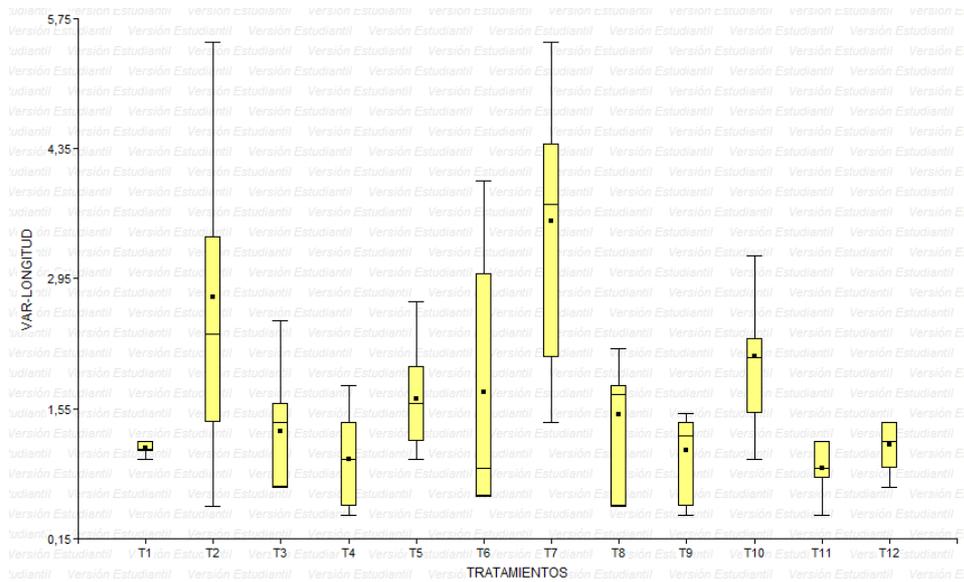
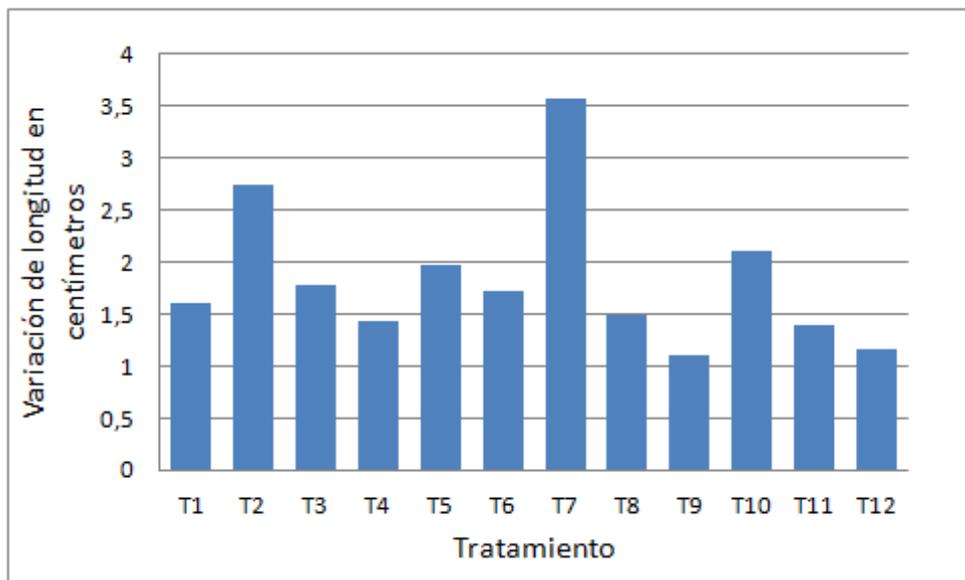


Figura 3. 17 Gráfico de frecuencias de variación de longitud respecto a los tratamientos utilizados.



b. Análisis inferencial

De acuerdo al análisis de varianza (ADEVA) para el efecto de la concentración de hormona BAP, se encontró un valor ($p = 3\%$), menor al nivel de significación nominal de la prueba ($\alpha = 5\%$), es decir que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos. Con respecto a la prueba de LSD de Fisher se encontró dos grupos estadísticos, las concentraciones 0 y

1ppm comparten el grupo A y las concentraciones 1 y 2 ppm pertenecen al grupo B, por lo que se evidencia que existen diferencias significativas (ANEXO 18).

El ADEVA demostró también que existe una diferencia significativa ($p = 0,03\%$) entre la relación concentración de la hormona BAP y el tipo de corte del explante, indicando que los tratamientos presentan diferencias (Anexo 19). La prueba de LSD de Fisher contempla tres grupos, donde el grupo A lo conforman los tratamientos T7 y T10 (0ppm de BAP y corte longitudinal y apical) y los tratamientos T2 y T5 (1ppm de BAP y corte longitudinal), el grupo B está formado por los tratamientos T2 y T5 (1ppm de BAP y corte longitudinal) y los tratamientos T3 y T6 (2ppm de BAP y corte longitudinal) y el grupo C lo conforman los tratamientos T3 y T6 (2ppm de BAP y corte longitudinal), T1 y T4 (0ppm de BAP y corte longitudinal), T8 y T9 (1ppm de BAP y corte longitudinal y apical) y T11 y T12 (2 ppm de BAP y corte longitudinal y apical). (Anexo 20)

Con respecto a la relación entre el medio y la concentración de BAP no existe diferencia significativa al realizar el ADEVA, sin embargo al realizar la prueba LSD de Fisher, se encontró que existen dos grupos, el grupo A compuesto por los tratamientos T1, T7, T2 y T8, y el segundo grupo B los tratamientos T3, T4, T5, T6, T9, T10, T11 y T12.

Al relacionar las tres variables concentración de BAP, consistencia del medio y tipo de corte y realizar la prueba de LSD de Fisher se encontró la formación de tres grupos, con esta prueba se puede observar que para el crecimiento longitudinal de los explantes no es necesario la presencia de BAP y en medio líquido presentan una buena respuesta (Tabla 3.15).

Tabla 3.15 Prueba LSD de Fisher para la interacción de BAP, tipo de corte y consistencia del medio, respecto a la longitud del explante.

Medias ajustadas y errores estándares para BAP*TIPO.CORTE*MEDIO
LSD Fisher (Alfa=0,05)

BAP	TIPO.CORTE	MEDIO	Medias	E.E.		
0	long y apical	liquido	3,58	0,40	A	
1	longitudinal	liquido	2,75	0,40	A	B
0	long y apical	semisólida	2,11	0,40	B	C
1	longitudinal	semisólida	1,98	0,40	B	C
2	longitudinal	liquido	1,79	0,40	B	C
2	longitudinal	semisólida	1,73	0,40	B	C
0	longitudinal	liquido	1,61	0,40		C
1	long y apical	liquido	1,49	0,40		C
0	longitudinal	semisólida	1,44	0,40		C
1	long y apical	semisólida	1,39	0,40		C
2	long y apical	semisólida	1,16	0,40		C
2	long y apical	liquido	1,10	0,40		C

3.3.3. Contaminación y mortalidad de explantes

a. Análisis exploratorio de datos

Después de haber realizado la desinfección de los explantes durante la primera fase, y haber continuado con el resto de las siguientes fases utilizando los explantes totalmente descontaminados, en el proceso de evaluación de la fase de multiplicación no se encontraron explantes con la presencia de bacterias u hongos.

Todos los explantes sobrevivieron durante esta fase, dando buenos resultados en su crecimiento y desarrollo, se trabajó con mucho cuidado para que los explantes al ser manipulados no tengan problemas en su proceso.

3.4. Enraizamiento

Para la etapa de enraizamiento se utilizó el medio MS suplementado con 3 dosis (0, 0,5 y 1 ppm) de auxinas AIB (Ácido Indolbutírico) y AIA (Ácido Indolacético). Las variables evaluadas fueron las siguientes: longitud de la raíz, altura del explante, color del explante y mortalidad.

Para esta fase se utilizaron nueve tratamientos con 10 repeticiones cada una.

Tabla 3.16 Tratamientos utilizados en la fase de enraizamiento.

Tratamiento	Dosis de AIB (ppm)	Dosis de AIA(ppm)
T1	0,0	0,0
T2	0,5	0,0
T3	1,0	0,0
T4	0,0	0,5
T5	0,5	0,5
T6	1,0	0,5
T7	0,0	1,0
T8	0,5	1,0
T9	1,0	1,0

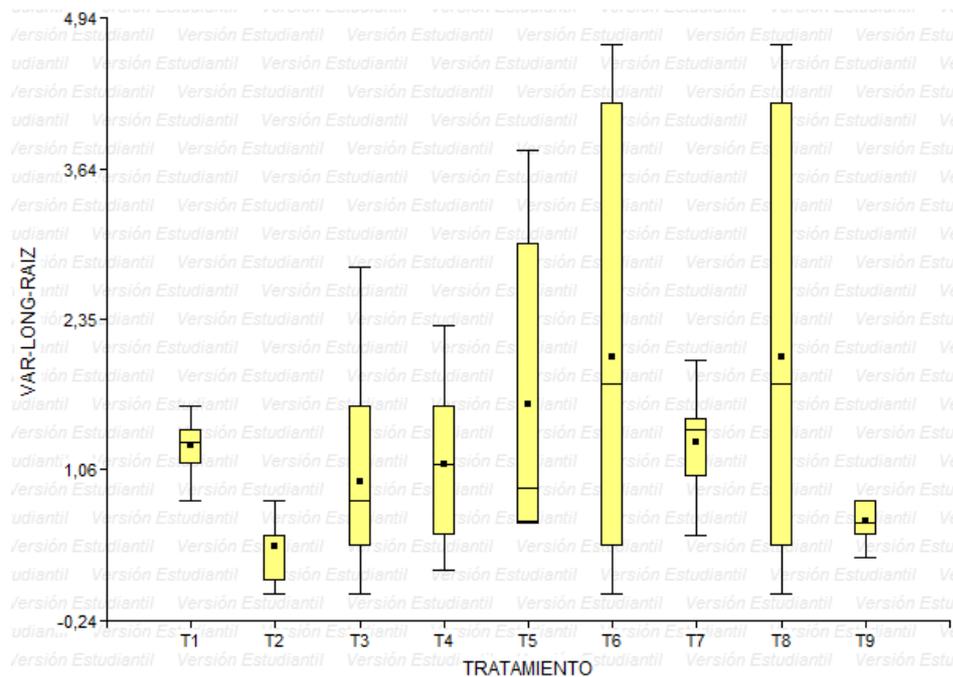
3.4.1. Longitud de la raíz

a. Análisis exploratorio de datos

Para analizar la variable longitud de raíces se realizó un gráfico de cajas en el que se indica las medias de cada tratamiento evaluadas a las 6 semanas de haber concluido la evaluación.

La figura 3.18 indica las medias de las longitudes correspondientes a cada tratamiento, dando como resultado la media más alta corresponde al tratamiento T6 y T8 con una media de 2,03 cm de longitud, seguida del tratamiento T6 y T2 con una media de 1,2 cm de longitud, también se observó lo tratamientos con medias bajas como es el caso del tratamiento T2 y T9 con una media de 0,7 cm de longitud.

Figura 3.18 Gráfico de cajas mostrando la variación de longitud de las raíces respecto a los tratamientos utilizados.



b. Análisis inferencial

Se realizó un análisis de varianza ADEVA para el efecto de las concentraciones de auxinas que, se encontró un valor ($p = 5\%$) igual al nivel de significancia ($\alpha = 5\%$), es decir que no existe diferencia significativa, al analizar por separadas los 2 tipos de auxinas no presentan un nivel de significancia; lo que conlleva a interpretar que por separado las hormonas no afectan en mayor porcentaje el crecimiento de las raíces.

Sin embargo al analizar la interacción de las 2 auxinas se encontró un valor ($p = 0,8\%$) menor al nivel de significancia lo que sugiere que la interacción entre las dos hormonas tiene resultados positivos (Anexo 25).

La prueba LSD de Fisher no encontró grupos estadísticos en los tratamientos al analizar individualmente las hormonas de crecimiento pero la prueba encontró tres grupos estadísticos al analizar la interacción de las 2 hormonas, por lo tanto, el grupo A está formado por los tratamientos T1, T6, T8, T5 y T7, el grupo B por los tratamientos T6, T8, T5, T7, T4 y T3 y por último el grupo C formado por los tratamientos T5, T7, T4, T3, T9 y T2.

Tabla 3.17 Prueba LSD de Fisher para el análisis de la interacción entre las hormonas AIA y AIB para la longitud de la raíz.

Medias ajustadas y errores estándares para AIB*AIA

LSD Fisher (Alfa=0,05)

AIB	AIA	Medias	E.E.	
0	0	2,26	0,41	A
1	0,5	2,03	0,41	A B
0,5	1	2,03	0,41	A B
0,5	0,5	1,62	0,41	A B C
0	1	1,29	0,41	A B C
0	0,5	1,10	0,41	B C
1	0	0,96	0,41	B C
1	1	0,78	0,41	C
0,5	0	0,71	0,41	C

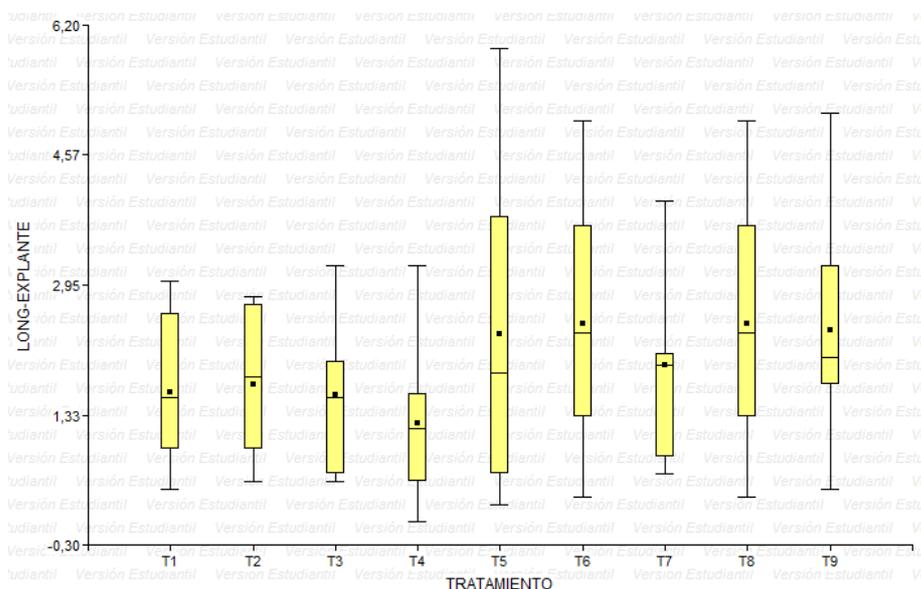
3.4.2. Longitud del explante

a. Análisis exploratorio de datos

La variable longitud del explante se obtuvo del promedio de longitudes de los explantes, a la sexta semana de cultivo de los 9 tratamientos.

En la siguiente figura se observa la variación de longitud a partir de las medias de cada tratamiento analizado, los explantes que presentaron mayor tamaño fueron los siguientes: T6 con una media de 2,5 cm, seguido por el tratamiento T8 con una media de 2,4 cm y el tratamiento 2,3 cm. También se observó los tratamientos que presentaron menores longitudes en los explantes: T3 con una media de longitud de 1,5cm y T4 con una media de 1,2cm.

Figura 3. 19 Gráfico de cajas mostrando la longitud del explante respecto a los 9 tratamientos utilizados.



b. Análisis inferencial

Respecto al análisis de varianza (ADEVA) para el efecto de la concentración de las tres auxinas se encontró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos ya que el valor ($p = 24\%$) es mayor al nivel de significancia requerido ($p = 5\%$) lo que indica que no se rechaza la hipótesis nula (ver Anexo 26).

Al realizar la prueba LSD de Fisher se encontró la formación de dos grupos, cuando se analizó la interacción de las 2 hormonas, en cambio que analizar individualmente no se encontraron grupos estadísticos (ver Anexo 27).

Los 2 grupos encontrados se agrupan de la siguiente manera, el grupo A formado por los tratamientos T8, T6, T9, T5, T7, T2, T1 y T3 y el grupo B que los conforman los tratamientos T5, T7, T2, T1, T3 y T4.

Tabla 3.18 Prueba LSD de Fisher para el análisis de la interacción entre AIA y AIB para la longitud del explante.

Medias ajustadas y errores estándares para AIB*AIA
LSD Fisher (Alfa=0,05)

AIB	AIA	Medias	E.E.	
0,5	1	2,46	0,40	A
1	0,5	2,46	0,40	A
1	1	2,39	0,40	A
0,5	0,5	2,34	0,40	A B
0	1	1,95	0,40	A B
0,5	0	1,70	0,40	A B
0	0	1,61	0,40	A B
1	0	1,57	0,40	A B
0	0,5	1,23	0,40	B

3.4.3. Color del explante

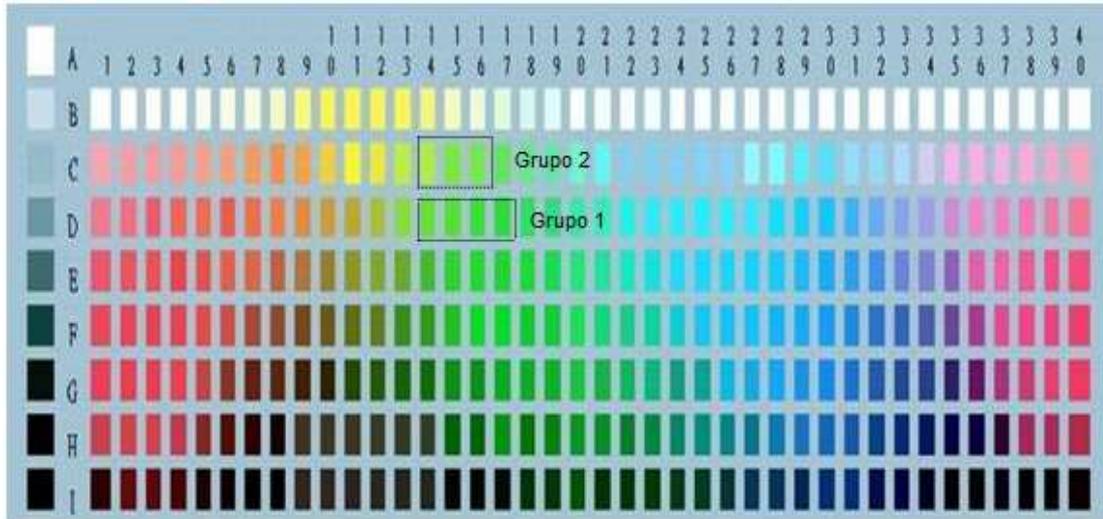
a. Análisis de datos

Se evaluó el color mediante la escala colorimétrica establecida por Lindsey y Brown 2006, para determinar si existe variación del color antes y después del enraizamiento del explante.

Los resultados obtenidos después de 6 semanas de haber concluido la fase de enraizamiento, fueron dos niveles de color de acuerdo a una tonalidad

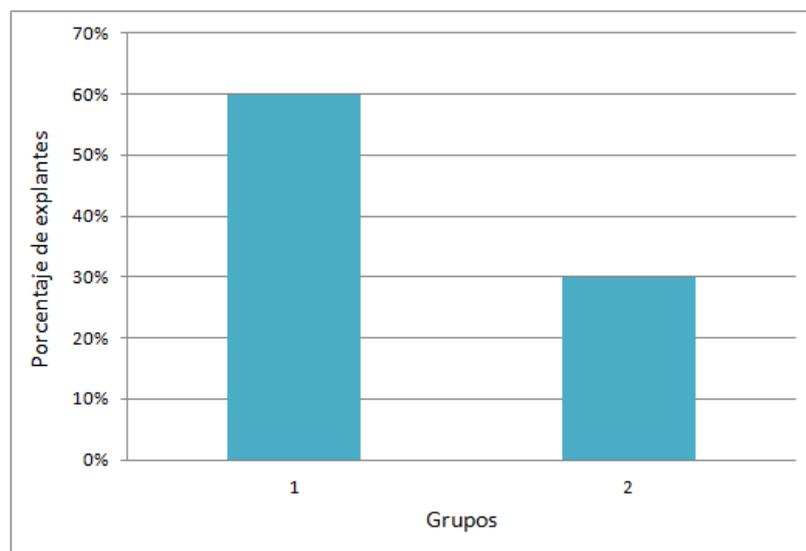
del color verde que presentaron los explantes, el grupo 1 se mantuvo en tres tonos de color verde y el grupo 2 mantuvo una tonalidad de verde a un verde – amarillo.

Figura 3.20 Escala colorimétrica para evaluar los cambios de color de los explantes



Al analizar los explantes se encontró que un 60% de explantes enraizados cambiaron su color en una tonalidad verde desde que fueron sembradas, es decir forman parte del grupo 1, mientras que un 30% cambio su color, cuando estas fueron sembradas presentaron un color verde, y conforme pasaron los días de evaluación cambio el color de las hojas a verde – amarillo (Figura 3.21.).

Figura 3.21 Gráfica de frecuencias del porcentaje de explantes al cambiar su color dentro del rango del color verde.



Es probable que los explantes que cambiaron el color de verde a verde – amarillo estuvieron más expuestos al sol que los otros explantes, así como pudieron influir otros factores como la humedad, la manipulación, etc.

3.5. Determinación de la estrategia más económica para la regeneración de plantas de *Aechmea fasciata*.

Se aplicó la metodología del presupuesto parcial según Perrin *et al.*, (1976) considerando los costos variables de cada tratamiento, así como los costos fijos en cada una de las fases de protocolo de desinfección, introducción, multiplicación y enraizamiento.

a. Análisis exploratorio de datos

En primer lugar se determinó el costo de los materiales de laboratorio que se utilizarán durante las 4 fases del proyecto, el uso de los materiales se estableció a partir del costo año, para la reproducción de plantas de *Aechmea fasciata in vitro*.

Tabla 3.19 Determinación del costo para los materiales de laboratorio para *Aechmea fasciata*.

Materiales	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Hojas de bisturí	4	0,50	2,00
Pinzas	2	15,00	30,00
Probeta 10ml	1	4,50	4,50
Frascos de vidrio	15	0,25	3,75
Cuchillo	1	3,00	3,00
Jeringuillas 10ml y 5ml	1 caja	10,00	10,00
Mandil	1	8,00	8,00
Zapatos	1 par	10,00	10,00
Mascarilla	2	0,60	1,20
Gorro	2	0,60	1,20
Marcador de vidrio	1	2,00	2,00
Cinta envolvente	1 rollo	3,50	3,50
TOTAL			43,25

La siguiente tabla indica la determinación del costo de suministros necesarios para todas las 4 fases realizadas, durante el tiempo que se efectuó la micropropagación de la planta.

Tabla 3.20 Determinación del costo de suministros de producción de *Aechmea fasciata*.

Suministros	Unidad	Consumo mensual (USD)	Valor total (6 meses)
Luz	kWh	193,70	16,8
Agua	M ³	8,00	81,9
TOTAL			98,7

A continuación se detallan los costos fijos del proyecto que se utilizaron durante el tiempo de micropropagación de *Aechmea fasciata*.

Tabla 3.21 Determinación de los costos fijos del proyecto

Detalle	Valor total
Material de laboratorio	43,25
Suministros	98,7
Total	141,95

3.5.1 Fase de desinfección

A continuación se presentan los insumos directos para la fase de desinfección.

Tabla 3.22 Determinación del costo de insumos directos utilizados en la fase de desinfección.

Descripción	Cantidad	Precio unitario	Costo total (USD)
Explantos de <i>Aechmea</i>	20	1,00	20,00
Alcohol al 70%	1 galón	10,00	10,00
Ácido cítrico	2g	0,22	0,44
Peróxido de hidrógeno	1 frasco	1,80	1,80
Tetraciclina	80mg		1,00
Jabón líquido	1 frasco	2,14	2,14
Agua estéril	2 galones	2,50	5
Papel toalla	1 rollo	1,00	1,00
Papel estéril	1 paquete	3,50	3,50
Papel aluminio	1 rollo	3,50	3,50
Frascos de vidrio	60 unidades	1,00	60,00
Medio MS	20,64g		1,39
Agar	0,5g	0,07	0,042
TOTAL			108,38

El costo directo de maquinaria y equipos se determinó a partir de la relación entre el costo de este, su vida útil y el porcentaje de utilidad para los

365 días de duración del proyecto. El costo del uso de la maquinaria y equipos se estableció a partir del costo día, por los días utilizados durante la fase de desinfección.

Tabla 3.23 Determinación del costo de maquinarias y equipos para *Aechmea fasciata* utilizados en la fase de desinfección.

Equipo	Cantidad	Costo total	Vida útil	Costo día (USD)	Días utilizados	Costo uso (USD)
Autoclave	1	2916,00	10	0,79	4	3,16
Balanza analítica digital	1	965,00	5	0,52	2	1,04
Cámara de flujo laminar	1	3784,00	7	1,48	4	5,92
Estufa digital	1	829,00	6	0,37	2	0,74
pH - metro	1	283,00	5	0,15	2	0,30
Refrigeradora	1	300,00	8	0,10	5	0,50
TOTAL						11,66

3.5.1.1 Costo por tratamiento

En la siguiente tabla se describen los insumos que se utilizaron para los 6 tratamientos con 10 repeticiones cada una, en esta fase varía el volumen de hipoclorito de sodio que se requirió para cada tratamiento.

Tabla 3. 24 Determinación de costos de insumos directos utilizados en cada tratamiento de la fase de desinfección.

Descripción	Precio / NaCl	Insumos	Maquinaria y equipos	Mano de obra	Costo total (USD)
T1	0,05	18,06	1,94	5,17	25,22
T2	0,05	18,06	1,94	5,17	25,22
T3	0,08	18,06	1,94	5,17	25,25
T4	0,08	18,06	1,94	5,17	25,25
T5	0,11	18,06	1,94	5,17	25,28
T6	0,11	18,06	1,94	5,17	25,28

3.5.1.2 Costos por fase

El costo total de la fase de desinfección de *Aechmea fasciata in vitro* se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 3.24. Determinación del costo de elaboración en la fase de desinfección *Aechmea fasciata*.

COSTO	(USD)
Insumos directos	151,50

3.5.2 Fase de introducción

A continuación se detallan los insumos para la fase de introducción utilizando los 8 tratamientos:

Tabla 3.25 Determinación del costo de insumos directos utilizados en la fase de introducción.

Descripción	Cantidad	Precio unitario	Costo total (USD)
Explantos desinfectados	80		
Papel estéril	1 paquete	3,50	3,50
Papel aluminio	1 rollo	3,50	3,50
Frascos de vidrio	80 unidades	1,00	80,00
BAP	1mgL	0,01	0,01
TOTAL			87,00

Los costos para los materiales del laboratorio, se detallan a continuación para la reproducción de plantas de *Aechmea fasciata in vitro* en un año.

Tabla 3.26 Determinación del costo de maquinarias y equipos para *Aechmea fasciata* para la fase de introducción.

Equipo	Cantidad	Costo total	Vida útil	Costo día (USD)	Días utilizados	Costo uso (USD)
Autoclave	1	2916,00	10	0,79	4	3,16
Balanza analítica digital	1	965,00	5	0,52	2	1,04
Cámara de flujo laminar	1	3784,00	7	1,48	4	5,92
Estufa digital	1	829,00	6	0,37	2	0,74
pH - metro	1	283,00	5	0,15	2	0,30
Refrigeradora	1	300,00	8	0,10	5	0,50
TOTAL						11,66

3.5.2.1. Costos por tratamiento

A continuación se describen los insumos que se utilizaron para los 8 tratamientos con 8 repeticiones cada una, en esta fase varía la composición del medio que se requirió para cada tratamiento.

Tabla 3.27 Determinación de insumos directos utilizados en cada tratamiento de la fase de introducción.

Descripción	Precio/medio + hormonas	Insumos	Maquinaria	Mano de obra	Costo total (USD)
T1	0,31	10,5	1,45	3,75	16,01
T2	0,31	10,5	1,45	3,75	16,01
T3	0,31	10,5	1,45	3,75	16,01
T4	0,32	10,5	1,45	3,75	16,02
T5	0,31	10,5	1,45	3,75	16,01
T6	0,32	10,5	1,45	3,75	16,02
T7	0,31	10,5	1,45	3,75	16,01
T8	0,33	10,5	1,45	3,75	16,03

3.5.2.2. Costos por fase

Tabla 3.28 Determinación del costo de elaboración en la fase de introducción *Aechmea fasciata*

COSTO	(USD)
Insumos directos	128,12

3.5.3 Fase de multiplicación

A continuación se detallan los insumos para la fase de introducción utilizando 12 tratamientos:

Tabla 3.29 Determinación del costo de insumos directos utilizados en la fase de multiplicación.

Descripción	Cantidad	Precio unitario	Costo total (USD)
Explantos desinfectados	70		
Papel estéril	2 paquetes	3,50	7,00
Medio MS	2lt	2,32	6,96
Agar	5g	0,015	0,225
BAP	3mgL	0,01	0,01
Contenedores plásticos	120 unidades	0,10	12,00
TOTAL			25,96

El costo directo de maquinaria y equipos se determinó a partir de la relación entre el costo de este, su vida útil y el porcentaje de utilidad para los 365 días de duración del proyecto. El costo del uso de la maquinaria y equipos se estableció a partir del costo día, por los días utilizados durante la fase de multiplicación.

Tabla 3.29 Determinación del costo de maquinarias y equipos para *Aechmea fasciata* para la fase de multiplicación.

Equipo	Cantidad	Costo total	Vida útil	Costo día (USD)	Días utilizados	Costo uso (USD)
Autoclave	1	2916,00	10	0,79	4	3
Balanza analítica digital	1	965,00	5	0,52	2	1,04
Cámara de flujo laminar	1	3784,00	7	1,48	4	6
Estufa digital	1	829,00	6	0,37	4	1,48
pH – metro	1	283,00	5	0,15	2	0,30
TOTAL						11,82

3.5.3.1. Costo por tratamiento

En la siguiente tabla se describen los insumos por tratamientos para la fase de multiplicación.

Tabla 3.30 Determinación del costo de insumos para los 12 tratamientos utilizados en la fase de multiplicación.

Descripción	Medio + hormonas	Insumos	Maquinaria	Mano de obra	Costo total (USD)
T1	0,58	2,16	0,98	5	8,72
T2	0,59	2,16	0,98	5	8,73
T3	0,60	2,16	0,98	5	8,74
T4	0,61	2,16	0,98	5	8,75
T5	0,62	2,16	0,98	5	8,76
T6	0,63	2,16	0,98	5	8,77
T7	0,58	2,16	0,98	5	8,72
T8	0,59	2,16	0,98	5	8,73
T9	0,60	2,16	0,98	5	8,74
T10	0,61	2,16	0,98	5	8,75
T11	0,62	2,16	0,98	5	8,76
T12	0,63	2,16	0,98	5	8,77

3.5.3.2. Costo por fase

El costo total de la fase de multiplicación de *Aechmea fasciata in vitro* se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 3.31 Determinación del costo de elaboración en la fase de multiplicación *Aechmea fasciata*.

COSTO	(USD)
Insumos directos	104,94

3.5.4 Fase de enraizamiento

A continuación se detallan los insumos para la fase de introducción utilizando los 9 tratamientos:

Tabla 3.32 Determinación del costo de insumos directos utilizados en la fase de enraizamiento.

Descripción	Cantidad	Precio unitario	Costo total (USD)
Explantes	90		

Descripción	Cantidad	Precio unitario	Costo total (USD)
Papel estéril	2 paquetes	3,50	7,00
Carbón activado			0,5
Contenedores plásticos	90 unidades	0,2	18,00
TOTAL			25,50

El costo directo de maquinaria y equipos se determinó a partir de la relación entre el costo de este, su vida útil y el porcentaje de utilidad para los 365 días de duración del proyecto. El costo del uso de la maquinaria y equipos se estableció a partir del costo día, por los días utilizados durante la fase de enraizamiento.

Tabla 3.33 Determinación del costo de maquinarias y equipos para *Aechmea fasciata* para la fase de enraizamiento.

Equipo	Cantidad	Costo total	Vida Útil	Costo Día (USD)	Días utilizados	Costo uso (USD)
Autoclave	1	2916,00	10	0,79	4	3
Balanza analítica digital	1	965,00	5	0,52	2	1,04
Cámara de flujo laminar	1	3784,00	7	1,48	4	6
Estufa digital	1	829,00	6	0,37	4	1,48
pH – metro	1	283,00	5	0,15	2	0,30
TOTAL						11,82

3.5.4.1 Costo por tratamiento

Tabla 3.34 Determinación del costo de los 9 tratamientos utilizados en la fase de enraizamiento.

Descripción	Medio + hormonas	Insumos	Maquinaria	Mano de obra	Costo total (USD)
T1	1,45	2,83	1,31	5	11,59
T2	1,46	2,83	1,31	5	11,60
T3	1,46	2,16	1,31	5	11,60
T4	1,46	2,16	1,31	5	11,60
T5	1,47	2,16	1,31	5	11,61
T6	1,47	2,16	1,31	5	11,61
T7	1,46	2,16	1,31	5	11,60
T8	1,47	2,16	1,31	5	11,61
T9	1,47	2,16	1,31	5	11,61

3.5.4.2. Costo por fase

El costo total de la fase de enraizamiento de *Aechmea fasciata in vitro* se detalla en la siguiente tabla,

Tabla 3.35 Determinación del costo de elaboración en la fase de enraizamiento *Aechmea fasciata*.

COSTO	(USD)
Insumos directos	104,43

La suma de los costos de las cuatro fases son los costos variables del análisis económico del proyecto.

Tabla 3. 36 Determinación de los costos variables del proyecto.

COSTO	(USD)
Fase de desinfección	141,95
Fase de introducción	128,12
Fase de multiplicación	104,94
Fase de enraizamiento	104,43
TOTAL	479,44

El costo total de la micropropagación de *Aechmea fasciata*, corresponde a la suma de los costo fijo y costos variables.

Tabla 3.37. Costo total de la producción de *Aechmea fasciata in vitro*

COSTO	(USD)
Costos fijos	141,25
Costos variables	479,44
TOTAL	620,69

La mano de obra se estimó de acuerdo a horas de trabajo del tesista, se consideró la hora de trabajo alrededor de \$ 1,875.

Al hacer un análisis general se obtuvo un valor de \$ 620,69 que significó realizar el proyecto después de las 4 fases requeridas para la micropropagación *in vitro* de plantas completas de *Aechmea fasciata*.

Se realizó un conteo de las plantas obtenidas y se obtuvo un total de 810 plantas completas, utilizando para la multiplicación el tratamiento T7 donde la media de brotes es la más alta respecto de los otros tratamientos.

En el mercado se encuentran plántulas a un costo aproximado de un dólar; mientras que para la producción en el laboratorio, según el estudio realizado, se obtuvieron dos explantes viables a multiplicar a un costo de \$1,53.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4.1. Etapa I: Desinfección

El protocolo de desinfección utilizado para la limpieza de hongos y bacterias en *Aechmea fasciata* se obtuvieron de trabajos realizados en plantas de la misma familia.

4.1.1. Explantes contaminados

Los ensayos previos se realizaron con material traído de un invernadero de la Provincia de Imbabura, los cuales sirvieron para realizar pre-tratamientos, estos presentaron un elevado porcentaje de contaminación, por lo que se necesitó realizar pruebas microbiológicas para determinar el tipo de bacteria que crecía junto a la planta.

Se realizaron pruebas de KOH y antibiogramas (Anexos 2 y 3), utilizando antibióticos de amplio espectro, dando como resultado la presencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas, por lo que fue necesario utilizar un antibiótico en el medio para tratar de contrarrestar la contaminación.

Zamora y Juárez, 2008 recomiendan realizar una primera desinfección con Hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos antes de ingresar a cámara, y una segunda desinfección en cámara con hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos, sin embargo los explantes de *A. fasciata* no dieron una buena respuesta a este método ya que el hipoclorito de sodio actúa como oxidante, por lo que se optó por realizar un solo lavado en cámara siguiendo los tratamientos recomendados.

El uso de alcohol en el último de los lavados de los explantes ayudó a eliminar la contaminación método recomendado por la directora del proyecto M.Sc. Jadán, así como también el uso de antibiótico en el medio, en este caso se utilizó tetraciclina dando muy buenos resultados en la fase de desinfección.

Debido a la forma que presenta *A. fasciata*, las hojas en forma de roseta, esta acumula agua y restos vegetales entre su tallo, por lo que es necesario eliminar toda la humedad que esta pueda contener dejándola secar 15 días antes de realizar la desinfección, solo se debe colocar agua en la tierra y no entre las hojas. De esta manera se puede eliminar una parte de la contaminación que presente.

4.2.1. Fenolización y mortalidad

Los primeros ensayos realizados presentaron un elevado índice de fenolización por lo que se recomendó utilizar antioxidantes en el medio para tratar de eliminar esta variable que puede conllevar a la muerte del explante.

Según Hernández 2001, la oxidación es producto de compuestos fenólicos que normalmente son almacenados en vacuolas, peroxisomas y vesículas que son secretadas como un mecanismo de defensa al haber ruptura de las células; estos compuestos se disuelven y causan la inactivación de las enzimas y por esto ocasionan necrosamiento; por lo que se necesitó suplementar el medio con un antioxidante que ayude a evitar el necrosamiento del explante.

Con el uso del ácido ascórbico como antioxidante se obtuvo un bajo porcentaje del 10% de fenolización en dos de los seis tratamientos que se realizaron.

Respecto a la mortalidad del explante, los resultados obtenidos fueron positivos, ya que no hubo presencia de mortalidad entre ellos, lo que conlleva a asegurar que la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión utilizados en los tratamientos, no afectaron en la sobrevivencia del explante.

4.2. Etapa II: Introducción

4.2.1. Adaptabilidad

Para esta variable se evaluó el cambio de color blanco a color verde que indica que el explante se encuentra desarrollándose de manera positiva en el medio donde ha sido sembrado, de los 8 tratamientos que se utilizaron para evaluar la interacción de las auxinas, 5 presentaron un porcentaje del 100% de explantes adaptados y tres un porcentaje del 87%, dando un resultado estadístico que los 8 tratamientos son factibles para la adaptación del explante.

De la adaptación depende que continúe el progreso de crecimiento del explante, y posteriormente funcione en las fases que continuará siendo evaluado el explante.

Según Zamora y Juárez 2008, el BAP influye directamente en la expresión del color verde de las hojas. Las citoquinas promueven la conversión de etioplastos en cloroplastos vía estimulación de la síntesis de clorofila. Además García 2004, plantea la hipótesis de que las citoquinas previenen la pérdida de fragmentos de ADN, permitiendo así que continúen la síntesis de enzimas y la producción de otros compuestos tales como la clorofila, es por eso que a los 8 tratamientos utilizados fueron añadidos 1 ppm de BAP.

4.2.2. Longitud del explante

Respecto a la longitud del explante se encontró que el mejor tratamiento para el crecimiento de los explantes resultó al utilizar $0,1\text{mgL}^{-1}$ de ANA y 0mgL de AIA y 0mg/L de AIB, además se pudo considerar que al relacionar las interacciones de ANA con AIA y ANA con AIB estas pueden generar un efecto inhibitor en los explantes; Basantes 2011, menciona que la investigación realizada por Pérez 1998, indica que los brotes jóvenes son una rica fuente de producción de auxinas, esto hace que no sea necesario su adición y que al existir esta hormona endógenamente, el aumento de la misma tiene un efecto inhibitor en los explantes, esto puede indicar que al utilizar tratamientos con varias concentraciones de auxinas no proporcionan un crecimiento en el tamaño del explante.

4.3. Etapa III: Multiplicación

4.3.1. Número de brotes

No hubo una buena interacción entre los factores medio de cultivo, consistencia del medio y tipo de corte, ya que el análisis estadístico presenta similitud entre los tratamientos, Zamora y Juárez 2008, mencionan que las plantas se deben cortar en 2 partes longitudinalmente porque garantizan que se obtengan 2 plantas morfológicamente similares en su crecimiento, pero además añaden que representan una ventaja económica al incrementarse la cantidad de plantas obtenidas.

Sin embargo, el tratamiento que presentó un mayor número de brotes, ya que en todas las repeticiones hubo crecimiento, fue el tratamiento con una concentración 0mgL^{-1} de BAP, medio líquido y corte longitudinal - apical, presentando un número de brotes de 30, seguido del tratamiento con una concentración 1mgL^{-1} de BAP, medio líquido y corte longitudinal de 25 brotes.

Zamora y Juárez, 2008 mencionan que los medios líquidos favorecen la producción de brotes por una mejor absorción de nutrientes, además reportan que Gupta *et. al.* 1981, encontraron que los medios líquidos facilitan la

absorción de nutrientes por la planta debido a la distribución homogénea de los diferentes constituyentes de los medios de cultivo.

4.3.2. Longitud del explante

Los mejores tratamientos para apreciar los mayores tamaños de longitud del explante fueron los tratamientos donde la consistencia del medio no contenía agar, es decir el medio líquido fue el mejor para el crecimiento de los explantes. Las concentraciones de BAP se encuentran entre 0mgL^{-1} y 1mgL^{-1} .

Al igual que en los brotes los mejores resultados se obtuvieron en medios líquidos, Zamora y Juárez 2008, mencionan además que se han encontrado altas tasas de regeneración en medio líquido en los cultivares de ciertas especies de piña.

Diversos autores concuerdan que en recipientes de cultivos tradicionales el efecto del medio líquido puede presentar beneficios en algunas especies, sin embargo, en algunas sin embargo, aunque el medio líquido con altas concentraciones de BAP ($2\text{-}3\text{mgL}^{-1}$) puede aumentar el promedio de brotes y el crecimiento de las hojas y raíces, generalmente produce una respuesta hiperhídrica que afecta posteriormente la aclimatización e incluso provocar la muerte de las plantas obtenidas debido a esta condición *in vitro*, citado por Zamora y Juárez 2008.

4.3.3. Contaminación y mortalidad

Se obtuvieron porcentajes de 0% de contaminación y mortalidad, en esta sección no hubo situaciones graves que alteren el progreso de la evaluación de las unidades experimentales, además la manipulación del explante y el adecuado uso de los materiales estériles permitieron mantener las condiciones asépticas del cultivo.

4.4. Etapa IV: Enraizamiento

4.4.1. Longitud de la raíz

La longitud de la raíz de *A. fasciata* en un período de seis semanas de desarrollo, se encuentra en un rango promedio de 0,7cm a 2,03 cm, los tratamientos utilizados no presentaron diferencia significativa entre ellos.

Es importante recalcar que los tratamientos que obtuvieron una media de longitud de raíz mayor fueron los tratamientos T6 y T8 con concentraciones de AIB y AIA de 0,5 y 1mgL y 1 y 0,5mgL respectivamente.

De acuerdo con Hurtado y Merino 1994, las auxinas son un factor importante en la promoción del crecimiento de las mismas, porque pueden incrementar significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces, tanto *in vitro* como *in vivo*, además de que incrementan su crecimiento, citado por Zamora y Juárez 2008.

El papel de las auxinas en la iniciación y crecimiento de las raíces es bien conocida, recomendándose su empleo en la mayor parte de los medios de enraizamiento y es precisamente el AIA una de las auxinas mas empleadas en esta fase (Rocha y Treminio, 2008).

4.4.2. Longitud del explante

La longitud del explante presento un promedio entre 2,5cm y 1,2cm siendo los tratamientos T6 y T8 los que presentaron mayor medias de longitud entre los 9 tratamientos utilizados.

Los mejores tratamientos para la longitud de la raíz son los mismos para el tamaño de longitud del explante.

4.4.3. Color del explante

Para esta ultima parte de la fase de enraizamiento se analizó el cambio de color de los explantes, dando buenos resultados ya que la mayoría de los

explantes mantuvieron el color verde característico de los explantes de *A. fasciata*.

Hubieron explantes que el tono del color verde cambio a un tono verde – amarillo, debido a que fueron explantes que estuvieron más en contacto con los rayos solares.

4.5. Análisis económico

Para realizar este estudio económico se necesitó hacer un análisis exhaustivo de todos los materiales que se utilizaron durante el desarrollo del proyecto, insumos directos, maquinaria, materiales de laboratorio, insumos y mano de obra.

Se analizaron los costos por tratamiento y por fase para conocer el costo individualmente que conlleva elaborar este proyecto, y observar los gastos que se pueden evitar. Así como también aprovechar los métodos para mejorar la técnica de propagación si se desea tener una producción de esta planta ornamental.

En el mercado se encuentra plántulas a un costo aproximado de un dólar, mientras que la producción en el laboratorio según el estudio realizado se obtuvo dos explantes viables a multiplicar a un costo de \$ 1,46.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

1. Una concentración de 1% de hipoclorito de sodio por un tiempo de cinco minutos de inmersión permite obtener explantes viables y libres de contaminación en el proceso de desinfección de *Aechmea fasciata*; es necesaria la aplicación de un antioxidante en el medio de cultivo para ayudar a que el explante no elimine fenoles de manera inmediata y pueda empezar a adaptarse al medio.
2. Los explantes adaptados al medio de cultivo empiezan a cambiar su color, de blanco a verde conforme avance su desarrollo.

3. La longitud del explante permitió establecer estadísticamente el mejor tratamiento de introducción debido a la diferencia significativa obtenida, donde el tratamiento adecuado fue T5 ($0,1\text{mgL}^{-1}$ de ANA, 0mgL^{-1} de AIA y 0mgL^{-1} de AIB) alcanzando la mayor longitud.
4. El mayor número de brotes en la fase de multiplicación estuvo favorecido por el tratamiento que contenía el medio con sales M&S, suplementado con 0mgL^{-1} de la hormona BAP.
5. La longitud del explante y el crecimiento de brotes presentan un mejor desarrollo en un medio M&S sin la adición de agar.
6. Las concentraciones de 0,5 y 1mgL de AIA y AIB son las que favorecieron en un mayor tamaño tanto en la longitud de la raíz como en la longitud del tamaño del explante durante la fase de enraizamiento.
7. El color de los explantes se mantuvo en el mismo tono verde, indicando el avance de su desarrollo.
8. El uso de carbón activado provee un ambiente de oscuridad al medio de cultivo, aumentado en gran manera la generación de raíces.
9. El método de multiplicación para *Aechmea fasciata* presenta un costo para el mercado de 0,76 centavos de dólar.
10. La realización de este proyecto de micropropagación de *Aechmea fasciata* durante el tiempo que se requirió para desarrollar las fases indicadas, dio como resultado la obtención de 810 plantas completas, listas para su aclimatación.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

1. Al momento de recolectar el material vegetal se recomienda mantenerlos en lugares apartados del resto de plantas, si es el caso, para evitar la contaminación.

2. El uso del alcohol después de la desinfección de los explantes es beneficiosa porque desnaturalizan proteínas bacterianas eliminando la contaminación; se recomienda usar alcohol al 70%.
3. Se recomienda controlar las condiciones ambientales a las que se encuentra la planta, ya que un exceso de humedad o rayos solares puede dañar el explante.
4. Con el fin de disminuir el coeficiente de variación se debe homogenizar el material vegetal, para que los explantes de *Aechmea fasciata* utilizados estén en iguales condiciones.
5. Se recomienda realizar ensayos adicionales para la conservación de este material vegetal, ya que es una especie que se encuentra en peligro de extinción.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

1. Castillo A. 2004. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Santa Rosa-Uruguay. Extraído el 19 de julio del 2010, http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:ppZzzKCT3Y0J:www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf+multiplicacion+in+vitro+de+plantas&hl=es&gl=ec&pid=bl&srcid=ADGEESj_P87kqwgCldq_JDZ7xOUFa5_04S3YDxS7kzglqtHJZjtqIOFHnhT8bbuaFdmpp4vGfvQr8Tcy1eFkwUxiHxM5v5zlmUKaTUSGYyf5ZDsuc_7g2wPdY7j1rHkhl4q_6Vh8DB&sig=AHIEtbRZkUQx0zF9OAOPrQnN6T8T6iUg9Q.
2. Castillo, R., & Davies, A. (1999). Introducción completa a la fisiología vegetal. Cuarta edición. Greenwood
3. Cueva A., Espinosa C. y Jordan M. (2006). Efficient *in vitro* multiplication of *Aechmea "Little Harv"* and *Tillandsia Cyanea* linden Ex K. Koch. Propagation of Ornamental Plants. Volumen 6, 165- 169
4. Devlin, R. (1976). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Tercera edición. pp. 57-60.

5. Esquivel, F. & Escalant C. (1994). Plant cell culture. A practical approach. Oxford University Press.
6. García, A. (2006). Metodología para la Evaluación de Sistemas de Manejo incorporando Indicadores de Sustentabilidad. *Revista CEPAL, Valparaíso-Chile*, 15-16.
7. García B, F. J. 2004. Fitorreguladores. Universidad Politécnica de Valencia. España. Extraído el 23 de Abril del 2012. www.Evita.Upv.es/VARIOS/BIOLOGIAT/temas/tema_14htm-431K-.
8. Gonzales M., Mogollón N., Díaz J. (2008) Efecto del ácido naftalenacético y el tamaño del explante sobre el enraizamiento de *Achmea fasciata* cultivada *in vitro*. Venezuela.
9. Guerra M. y Vesco L. (2009). Strategies for the Micropropagation of Bromeliads.
10. Gutiérrez F. Venta y cuidado de bromelias y orquídeas. <http://www.bromeliasdexcaret.com/clasificacion.htm>
11. Haro X, 2004. Distribución de Bromeliaceae en dos parcelas de la Reserva de Biosfera Sumaco LYIONA. Journal of ecology and application. Extraído el 21 de Julio del 2010, de <http://www.lyonia.org/viewArticle.php?articleID=335#top>
12. Hernández A. (2001). Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
13. Lucas E. 2002. Auxinas. Perú. Extraído el 5 de septiembre del 2011, de <http://www.monografias.com/trabajos10/auxinas/auxinas.shtml#tres>.
14. Manzanares J. 2002. Jewels of the Jungle. Bromeliaceae of Ecuador. Part I. Bromelioidae. Ecuador. Extraído el 20 de septiembre del 2010. http://www.terraecuador.net/revista_39/39_bromelias_del_ecuador.html

15. Menderhall W. y Sincich T. (1997) Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. Cuarta edición. Prentice Hall.
16. Morales J. 2002. Jardinería y Plantas. España. Extraído el 5 de septiembre del 2011, de http://articulos.infojardin.com/plantas_de_interior/multiplicacion-reproduccion-plantas-1.htm
17. Pierik R. 1990. Cultivo in vitro de las Plantas Superiores. Madrid: Ediciones Mundi Prensa.
18. Roca y Mroginski. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación.
19. Rocha R. y Treminio J. (2008). Universidad Nacional Agraria. Embriogénesis somática en reproducción *in vitro* de piña (*Ananas comosus*. L. Merr) cultivar MD-2. Nicaragua.
20. Sandoval F. 2001. Biotecnología aplicada para la micropropagación de banano y plátano (Musa AAA, AAB). San José: Editorial Loria, M.
21. Trigiano R. y Gray D. (2005). Plant development and biotechnology. New York:
22. Vásquez, Y. 1998. El fósforo en las Bromelias. Extraído el 5 de septiembre del 2011, de <http://www.monografias.com/trabajos72/fosforo-bromelias/fosforo-bromelias.shtml>.
23. Vidal, G. (2008). Desafíos ambientales en nuestros tiempos. Revista Avances y perspectivas. Vol. 20. pp. 5-6.
24. Weaver J. Robert. 1987. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Universidad de California, Devis. México: Editorial Trillas.
25. Zamora A. y Juárez D. (2008). Universidad Nacional Agraria. Micropropagación en piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cultivar MD-2. Nicaragua

