

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE
MICROPROPAGACIÓN DE HORTENSIA (*Hydrangea
macrophylla*) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES, COMO
UNA ESTRATEGIA DE PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA,
PARA SU UTILIZACIÓN ORNAMENTAL EN LOS
ESPACIOS PÚBLICOS DEL DISTRITO METROPOLITANO
DE QUITO”

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

WILSON PATRICIO OROZCO FREIRE

Sangolquí, 11 de diciembre del 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Wilson Patricio Orozco Freire

**DIRECTORA DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA**

Ing. Grace Tatiana Páez Barrera, MC.

Sangolquí, 11 de diciembre del 2012

CERTIFICACIÓN

Certificó que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. WILSON PATRICIO OROZCO FREIRE como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología.

Sangolquí, 11 de diciembre del 2012

Ing. Grace Tatiana Páez Barrera, MC.

DIRECTOR

Quim. Jaime Francisco Gía Bustamante, MSc.

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Wilson Patricio Orozco Freire

Declaro que:

El proyecto de grado denominado ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE HORTENSIA (*Hydrangea macrophylla*) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES, COMO UNA ESTRATEGIA DE PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA, PARA SU UTILIZACIÓN ORNAMENTAL EN LOS ESPACIOS PÚBLICOS DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO, ha sido desarrollado en 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, 11 de diciembre del 2012

Wilson Patricio Orozco Freire

AUTORIZACIÓN

Yo, Wilson Patricio Orozco Freire

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE HORTENSIA (*Hydrangea macrophylla*) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES, COMO UNA ESTRATEGIA DE PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA, PARA SU UTILIZACIÓN ORNAMENTAL EN LOS ESPACIOS PÚBLICOS DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 11 de diciembre del 2012

Wilson Patricio Orozco Freire

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, por haberme dado unos padres tan geniales y la oportunidad de estudiar que no todos la tienen.

A mi mami Eliana, la mejor del mundo, que ha sido siempre mi inspiración y razón de vivir, continuamente motivándome para no rendirme y guiando mi camino hasta este punto como mi ángel guardián, sin ella estaría perdido. Gracias mami te amo.

A mi papi Wilson por siempre estar pendiente de mí, aconsejándome y dándome toda su ayuda para que salga adelante y sea un profesional, luchando de cualquier manera para ayudarnos. Este logro también es tuyo, gracias papi.

A Jessica por todo su apoyo incondicional durante todo el desarrollo del trabajo.

Wilson Patricio Orozco Freire

AGRADECIMIENTO

A mi hermana Ivonne, parte de mi alegría, que ha sido una más de mis motivaciones para seguir luchando, te adoro negrita.

A mis abuelitos Teresa y Ruperto, que han sido como mis otros padres, siempre estarán en mi corazón.

A mis tías Leonor y Marilú, que han estado durante todo el desarrollo de mi vida y que siempre me han apoyado y querido bastante, gracias por todo.

A mis primos Juan, Geovanny, Pablito, Esteban, Freddy que son como mis hermanos.

A la Ingeniera Tatiana Páez, por todo su apoyo y por ser una gran maestra y guía de la carrera de Biotecnología.

Al Ingeniero Jaime Gía, por toda su ayuda en el desenvolvimiento de este trabajo, por estar presto para colaborarme cuando lo necesité, más que un director un amigo, muchas gracias.

A María Fernanda Loayza, por ser tan linda persona y a pesar de todos los obstáculos que se presentaron nunca dejo de defendernos, por su incondicional apoyo a pesar de no formar directamente la parte docente de este proyecto.

Al Ing. Cristian Reyes, por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis en las instalaciones del Municipio de Quito, por toda la colaboración prestada durante todo este tiempo.

A la Ing. Lorena Oña, por compartir su valioso conocimiento, por su colaboración desde el primer hasta el último día de trabajo, manteniendo siempre el equilibrio en el laboratorio.

A Andrea González, por transmitir toda su felicidad, conocimiento y experiencia, por haber estado cuando más difíciles estaban las cosas. Siempre te consideraré mi gran amiga.

A Carlita y Majito, por ser muy buenas amigas, por todos sus consejos y buena energías, que bueno haber conocido personas como ustedes durante mi vida universitaria y durante el trabajo.

A todos mis amigos de la universidad por haber compartido con ellos momentos inolvidables, Carito, Gustavo, José, Iván, Daniel, Danilo, Gabi Z., Gabi, V., Naya, Karen, Dolly, Alejita, Javier, Frank y Cris.

Finalmente, y como agradecimiento especial, quiero reconocer a Jessy Gordón, por ser más que mi novia mi gran amiga, con quien atravesamos cada uno de los problemas que se presentaron y unidos logramos sobrellevarlos, solo nosotros sabemos lo que significó realizar este sueño. Gracias por ser mi inspiración y razón para seguir adelante, sin ti no lo hubiese podido lograr, siempre estarás en mi corazón.

Wilson Patricio Orozco Freire

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iv
AUTORIZACIÓN	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	ix
LISTADO DE TABLAS	xii
LISTADO DE FIGURAS	xiv
ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMEN	xviii
ABSTRACT.....	xix
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos de la investigación	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos	7
1.4 Marco teórico	7
1.4.1 Características de la planta (<i>Hydrangea macrophylla</i>).....	7
1.4.2 Cultivo <i>in vitro</i>	14
1.4.3 Medios de cultivo.....	20
1.4.4 Micropropagación vegetal mediante organogénesis.....	23
1.5 Sistema de hipótesis	31
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.1 Participantes	32
2.1.1 Instituciones	32
2.1.2 Personal académico.....	32
2.1.3 Personal empresarial	32
2.2 Fase de campo	32

2.2.1	Localización geográfica del vivero.....	32
2.2.2	Plantas Donadoras.....	33
2.3	Fase de laboratorio	35
2.3.1	Localización geográfica del laboratorio	35
2.3.2	Etapas de desinfección de los explantes de <i>Hydrangea macrophylla</i>	36
2.3.3	Etapas de establecimiento <i>in vitro</i> de los explantes de hortensia.....	39
2.3.4	Etapas de propagación clonal de <i>Hydrangea macrophylla</i>	41
2.3.5	Etapas de enraizamiento de los explantes de hortensia.....	43
2.4	Análisis de datos	46
2.5	Periodo de tiempo de investigación	46
CAPÍTULO 3: RESULTADOS		47
3.1	Ensayos preliminares	47
3.2	Etapas de desinfección de los explantes de <i>Hydrangea macrophylla</i>	48
3.2.1	Contaminación, viabilidad y necrosis.....	48
3.2.2	Porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica.....	50
3.2.3	Longitud de los brotes.....	52
3.2.4	Análisis costo-beneficio de la etapa de desinfección.....	53
3.3	Etapas de establecimiento <i>in vitro</i> de los explantes de hortensia	55
3.3.1	Porcentaje de contaminación y viabilidad	55
3.3.2	Longitud de los brotes.....	57
3.4	Etapas de propagación clonal de <i>Hydrangea macrophylla</i>	62
3.4.1	Porcentaje de contaminación y viabilidad	63
3.4.2	Número de brotes.....	64
3.4.3	Índice de propagación.....	65
3.4.4	Porcentaje de inducción de brotes múltiples.....	67
3.5	Etapas de enraizamiento de los explantes de hortensia	68
3.5.1	Porcentaje de contaminación y viabilidad	68
3.5.2	Masa radicular.....	69
3.5.3	Porcentaje de plántulas enraizadas	71
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....		73
4.1	Etapas de desinfección de los explantes de <i>Hydrangea macrophylla</i>	73

4.1.1	Contaminación, viabilidad y necrosis.....	73
4.1.2	Porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica.....	76
4.1.3	Longitud de los brotes.....	77
4.1.4	Análisis costo-beneficio de la etapa de desinfección.....	77
4.2	Etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de los explantes de hortensia	78
4.2.1	Porcentaje de contaminación y viabilidad	78
4.2.2	Longitud de los brotes.....	78
4.3	Etapa de propagación clonal de <i>Hydrangea macrophylla</i>	80
4.4	Etapa de enraizamiento de los explantes de hortensia	82
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....		85
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES		87
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....		89

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Tratamientos planteados para el DCA de la etapa de desinfección del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Hydrangea macrophylla</i>	38
Tabla 2.2 Tratamientos planteados para el DBCA en medio MS y MS/2 de la etapa de establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Hydrangea macrophylla</i>	40
Tabla 2.3 Tratamientos planteados para el DBCA de la etapa de propagación <i>in vitro</i> de <i>Hydrangea macrophylla</i>	42
Tabla 2.4 Tratamientos planteados para el DBCA en medio MS y MS/2 de la etapa de enraizamiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Hydrangea macrophylla</i>	44
Tabla 3.1 Porcentajes de necrosis, contaminación y viabilidad, correspondientes a cada tratamiento con antibióticos en medio MS, de la etapa de desinfección.....	49
Tabla 3.2 Porcentajes de contaminación de tipo fúngica y bacteriana en cada uno de los tratamientos de desinfección.	50
Tabla 3.3 Porcentajes globales de contaminación fúngica y bacteriana del total de explantes descartados de la etapa de desinfección.....	52
Tabla 3.4 Análisis de costo-beneficio del T2 y T5 de la etapa de desinfección.	54
Tabla 3.5 Porcentajes de contaminación y viabilidad en los diferentes tratamientos, en medio MS y MS/2, en la fase de establecimiento.	56
Tabla 3.6 Porcentajes de contaminación y viabilidad en la etapa de propagación <i>in vitro</i> de <i>Hydrangea macrophylla</i>	63
Tabla 3.7 Número de brotes obtenidos en la etapa de propagación de <i>Hydrangea macrophylla</i>	64
Tabla 3.8 Índices de propagación de cada uno de los tratamientos planteados en la etapa de propagación de <i>Hydrangea macrophylla</i>	66
Tabla 3.9 Porcentaje de inducción de brotes múltiples de cada uno de los tratamientos planteados en la etapa de propagación de <i>Hydrangea macrophylla</i>	67
Tabla 3.10 Porcentajes de contaminación y viabilidad en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Hydrangea macrophylla</i>	68

Tabla 3.11 Porcentaje de plántulas enraizadas de cada uno de los tratamientos planteados en la etapa de enraizamiento de <i>Hydrangea macrophylla</i>	71
--	----

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1 Mapa tipo relieve de la ubicación del Vivero de Cununyacu y del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la UEP-DMQ.	33
Figura 2.2 Plantas madre de hortensia (<i>Hydrangea macrophylla</i>) ubicadas en lotes de 1.5 m de ancho por 2.5 m de largo, en el vivero de Cununyacu de la EPMMOP-Q.	33
Figura 2.3 A. Selección y corte de los explantes de hortensia B. Segmentos nodales de <i>Hydrangea macrophylla</i> , cortados con una dimensión de 2 a 3 cm.	35
Figura 2.4 Material necesario para la desinfección de los segmentos nodales de <i>Hydrangea macrophylla</i> (agua estéril, alcohol al 70%, Clorox al 2%, gasa estéril).	36
Figura 2.5 A. Proceso de siembra de los segmentos nodales de <i>Hydrangea macrophylla</i> en la etapa de establecimiento B. Incubación de los explantes.	39
Figura 2.6 A. Preparación de los explantes de <i>Hydrangea macrophylla</i> previamente establecidos para su siembra en un medio de cultivo para propagación B. Incubación de los frascos de propagación.	42
Figura 2.7 A. Siembra de los brotes de <i>Hydrangea macrophylla</i> obtenidos del proceso de propagación en un medio de cultivo de enraizamiento B. Incubación de los frascos de enraizamiento.	44
Figura 2.8 Categorías planteadas para la etapa de enraizamiento de <i>Hydrangea macrophylla</i> 1. Poca presencia 2. Abundante presencia 3. Muy abundante presencia.	45
Figura 3.1 Tipos de contaminación observadas en los ensayos preliminares de <i>Hydrangea macrophylla</i>	47
Figura 3.2 Problemas encontrados en el cultivo de meristemos de <i>Hydrangea macrophylla</i>	48
Figura 3.3 Porcentajes de necrosis, contaminación y viabilidad, correspondientes a cada tratamiento con antibióticos en medio MS, de la etapa de desinfección.	49
Figura 3.4 Porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica de cada uno de los tratamientos planteados en la fase de desinfección.	51

Figura 3.5 Porcentajes globales de contaminación fúngica y bacteriana del total de explantos descartados de la etapa de desinfección.	52
Figura 3.6 Distribución no paramétrica de la variable longitud de la fase de desinfección.	53
Figura 3.7 Medias y desviaciones estándar de la variable longitud de cada uno de los tratamientos de desinfección al final del ensayo.	53
Figura 3.8 Análisis de costo-beneficio del T2 y T5 de la etapa de desinfección.	55
Figura 3.9 Porcentajes de contaminación y viabilidad en los diferentes tratamientos, en el medio MS y MS/2, en la fase de establecimiento.	57
Figura 3.10 Distribución no paramétrica de la variable longitud de los tratamientos propuestos en el medio MS de la fase de establecimiento.	58
Figura 3.11 Evolución de las medias de crecimiento y desviaciones estándar por cada semana de cada uno de los tratamientos propuestos en el medio MS de la fase de establecimiento.	58
Figura 3.12 Medias globales, desviaciones estándar, máximos, mínimos y outliers de cada tratamiento propuesto en el medio MS de la etapa de establecimiento.	59
Figura 3.13 Distribución normal de la variable longitud de los tratamientos propuestos en el medio MS/2 de la fase de establecimiento.	59
Figura 3.14 Evolución de las medias de crecimiento y desviaciones estándar por cada semana de cada uno de los tratamientos propuestos en el medio MS/2 de la fase de establecimiento.	60
Figura 3.15 Medias de crecimiento globales y desviaciones estándar de cada uno de los tratamientos propuestos en medio MS a la mitad de su concentración de la fase de establecimiento.	60
Figura 3.16 Medias de crecimiento globales y desviaciones estándar en el medio de cultivo MS y MS a la mitad de su concentración de la etapa de establecimiento.	61
Figura 3.17 Porcentajes de contaminación y viabilidad de los tratamientos planteados en la etapa de propagación de <i>Hydrangea macrophylla</i>	64
Figura 3.18 Desviación estándar y medias de cada tratamiento planteado en la etapa de propagación de <i>Hydrangea macrophylla</i>	66

Figura 3.19 Porcentajes de contaminación y viabilidad de los tratamientos planteados en la etapa de enraizamiento de <i>Hydrangea macrophylla</i>	69
Figura 3.20 Medias y desviaciones estándar de cada uno de los tratamientos planteados en el medio MS y MS/2 respecto a la masa radicular, de la etapa de enraizamiento de <i>Hydrangea macrophylla</i>	70
Figura 3.21 Medias y desviaciones estándar del medio MS y MS/2 respecto a la masa radicular, de la etapa de enraizamiento de <i>Hydrangea macrophylla</i>	71

ABREVIATURAS

DMQ:	Distrito Metropolitano de Quito
EPMMOP:	Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas
UEP:	Unidad de Espacio Público
m:	Metro
cm:	Centímetro
mm:	Milímetro
g.L ⁻¹ :	Gramo por litro
cc.L ⁻¹ :	Centímetro cúbico por litro
mg.L ⁻¹ :	Miligramo por litro
mg.mL ⁻¹ :	Miligramo por mililitro
mL:	Mililitro
pH:	Potencial hidrógeno
°C:	Grado centígrado
m.s.n.m:	Metros sobre el nivel del mar
h:	Horas
min:	Minutos
MS:	Formulación Murashige y Skoog
MSVG:	Formulación Murashige y Skoog con vitaminas Gamborg
MS/2:	Formulación Murashige y Skoog a la mitad de su concentración
MSVG/2:	Formulación Murashige y Skoog con vitaminas Gamborg a la mitad de su concentración
AG ₃ :	Ácido giberélico
AIA:	Ácido indol acético
AIB:	Ácido indol butírico
ANA:	Ácido naftalen acético
BAP:	6-bencilaminopurina
KIN:	Kinetina
ZEA:	Zeatina
2,4-D:	Ácido 2, 4 diclorofenoxiacético
M:	Concentración expresada en molaridad (mol.L ⁻¹)
RCV:	Regulador de crecimiento vegetal

RESUMEN

El Distrito Metropolitano de Quito en las últimas décadas ha experimentado un crecimiento desmesurado tanto en extensión como en población, lo que ha causado que cada año se resten alrededor de 730 hectáreas de cobertura vegetal nativa, razón por la cual se propuso la utilización de técnicas biotecnológicas para la producción masiva de plantas para la ornamentación y reforestación. La hortensia (*Hydrangea macrophylla*) es una especie exótica nativa de los bosques húmedos japoneses; debido a su cabeza floral enorme y a su abundante follaje de color verde es muy utilizada como ornamento en interiores y exteriores. El objetivo de este estudio fue establecer un protocolo óptimo de micropropagación de hortensia a partir de segmentos nodales como una estrategia para la producción a gran escala de la especie. En la etapa de desinfección se probaron varias concentraciones de antibióticos en un medio de cultivo MS (0.08 mg.L⁻¹, 0.12 mg.L⁻¹, 0.16 mg.L⁻¹, 0.2 mg.L⁻¹, 0.3 mg.L⁻¹, 0.4 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹). En el ensayo de establecimiento se examinaron dos tipos de medio de cultivo, un MS y MS/2, en ambos se adicionaron diferentes cantidades del regulador de crecimiento BAP (0 mg.L⁻¹, 0.25 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹, 0.75 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 1.25 mg.L⁻¹). Por otro lado, en la propagación se utilizó MSVG/2 suplementado con BAP y KIN en ocho concentraciones (0 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 1.5 mg.L⁻¹, 2 mg.L⁻¹, 3 mg.L⁻¹, 4 mg.L⁻¹, 6 mg.L⁻¹). El enraizamiento se llevo a cabo en los medios MS y MS/2, con 0.2 g.L⁻¹ de carbón activado, suplementado con varias concentraciones de AIB (0 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 1.5 mg.L⁻¹, 2 mg.L⁻¹, 3 mg.L⁻¹). La desinfección de los explantes con 0.12 mg.L⁻¹ de kanamicina y estreptomycin, redujo la contaminación a un 10%, mientras que el mejor establecimiento se logró al utilizar 0.5 mg.L⁻¹ de BAP en MS/2. En la etapa de propagación el mayor número de brotes se obtuvo con la adición de 4 mg.L⁻¹ de BAP. Finalmente, se indujo el enraizamiento en los explantes sin el suplemento de AIB en el medio. Los resultados reportados constataron la viabilidad del establecimiento *in vitro* de hortensia.

ABSTRACT

In the last decades, the Metropolitan District of Quito has experienced an excessive population and extension growth, causing every year a decrease of almost 730 hectares of native vegetation, so it was proposed the use of biotechnological techniques for plants mass production. The hydrangea (*Hydrangea macrophylla*) is an exotic species native from the Japanese rain forests; because of its huge flower heads and abundant green foliage is used as indoor and outdoor ornament. The objective of this project was to establish an optimum hydrangea micropropagation protocol from nodal segments as a strategy for this species on large scale production. In the disinfection phase several antibiotic concentrations were tested in a MS medium (0.08 mg.L⁻¹, 0.12 mg.L⁻¹, 0.16 mg.L⁻¹, 0.2 mg.L⁻¹, 0.3 mg.L⁻¹, 0.4 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹). In the establishment essay two culture mediums were examined, MS and MS/2, with the addition of different quantities of BAP growth regulator (0 mg.L⁻¹, 0.25 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹, 0.75 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 1.25 mg.L⁻¹). Furthermore, in the propagation MSVG/2 was used, supplemented with BAP and KIN, in eight concentrations (0 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 1.5 mg.L⁻¹, 2 mg.L⁻¹, 3 mg.L⁻¹, 4 mg.L⁻¹, 6 mg.L⁻¹). The rooting was conducted in MS and MS/2 mediums, with 0.2 g.L⁻¹ activated charcoal, supplemented with several IBA concentrations (0 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 1.5 mg.L⁻¹, 2 mg.L⁻¹, 3 mg.L⁻¹). The explants disinfection with 0.12 mg.L⁻¹ kanamycin and streptomycin decreased the contamination to 10%, while the best establishment was achieved when using 0.5 mg.L⁻¹ BAP in MS/2. In the propagation phase the highest number of buds was obtained with the addition of 4 mg.L⁻¹ BAP. Finally, the explants rooting were induced without IBA in the medium. Reported results confirmed the hydrangea *in vitro* establishment viability.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Desde finales del siglo XIX y hasta la primera guerra mundial, comenzando ya el siglo XX, se produce un cambio gigantesco en la historia del hombre y su evolución debido al inicio del fenómeno de urbanización y la primera etapa de la revolución industrial, provocando que se dé un crecimiento desmesurado de las ciudades y de su número de habitantes, que como consecuencia de sus actividades económicas, agrícolas, de transporte, de vivienda, comunicación, etc., han ido restando cada vez más espacio verde a las poblaciones, predominando intereses diferentes sobre el cuidado ambiental y la salud de las personas (Ochoa, 1999).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), uno de los mayores problemas que vive actualmente la humanidad es el crecimiento inmoderado de las metrópolis y de sus poblados especialmente en zonas urbanas.

El proceso de urbanización es un fenómeno irreversible. La economía de los países en vías de desarrollo se basa en el producto interno bruto que generan las ciudades, que es alrededor del 60 al 80% (Fernández, 1996).

Se estima que para el año 2025, más de las tres quintas partes de la población mundial vivirá en zonas urbanas y el porcentaje de urbanismo llegará a un 84% con 5.200 millones de personas (Gómez, 2005).

Debido a esta pérdida inminente de los espacios verdes la OMS realizó un estudio y aseveró que el área verde óptima para que una ciudad mantenga un equilibrio ambiental es de 15 m² por habitante, además recomendó como mínimo 9 m² por habitante (El Universo, 2011).

En la actualidad el Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) no ha sido la excepción, ha tenido un aumento poblacional de 4 veces en los últimos 30 años y en poco más de un siglo su superficie se ha incrementado 40 veces (Fernández, 1996).

Se ha registrado una tasa de crecimiento del 2,2% desde el año 2001, llegando a tener 2.239.191 habitantes hasta el año 2010. De acuerdo a una proyección realizada por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) la población para el año 2022 será de 2.763.882 personas (Estévez, 2010).

De la misma manera, en el año de 1986, el territorio poblado de Quito ocupaba alrededor de 7.060 hectáreas, mientras que en el año 2010 llegó a ocupar alrededor de 23.846 hectáreas. Este crecimiento poblacional acompañado del fenómeno de urbanización ha provocado que cada año se resten alrededor de 730 hectáreas de cobertura vegetal nativa por otros usos del suelo, siendo los más importantes la vivienda, industria, viabilidad, recreación, agricultura, entre otros. (Diario La Hora, 2011).

La Dirección Metropolitana de Parques y Jardines en el año 2008 afirmó que la relación de espacios verdes por cada individuo era muy baja, a pesar de la presencia de los parques metropolitanos del norte y del sur, siendo alrededor de 15 m² por habitante. También constataron la existencia de zonas puntuales con escasez de superficies verdes, como por ejemplo, el sur de Quito donde hay áreas sin árboles, sin arbustos y sin plantas (Diario La Hora, 2008).

La pérdida de espacios verdes también ha sido inducida por la falta de cuidado ambiental por parte de los quiteños, al arrojar basura a las laderas y quebradas, destruir plantas, cortar los árboles e incendiar los bosques (Burbano & Herdoíza, 2009).

Además la presencia masiva de automóviles en la metrópoli, ha provocado que la visión de urbanismo se enfoque en la creación y ampliación de vías, intercambiadores, reducción del ancho de veredas, destino de parques y áreas verdes como estacionamientos para carros (León & Naranjo, 2005).

La extinción de zonas verdes genera muchas problemáticas tanto a nivel local como a nivel nacional e internacional, influyendo no solo en las condiciones ambientales, al contribuir con problemas como el efecto invernadero y el calentamiento global, sino que también tienen impacto sobre los aspectos sociológicos, políticos, ecológicos, culturales, técnicos, además de daños sobre la salud de la gente. Muchos

más son los inconvenientes que puede acarrear la falta de áreas verdes, sin embargo los citados son los más importantes.

Para la reforestación y ornamentación del DMQ, el municipio cuenta con la existencia de viveros, donde se producen por métodos convencionales, como siembra de semillas y cultivo de estacas alrededor de 300.000 plantas por año, cantidad que no abastece la demanda. Por este motivo se vio la necesidad de implementar otras maneras de producción de plántulas, tomando las técnicas biotecnológicas y específicamente las del cultivo de tejidos como una alternativa (El Comercio, 2009).

1.2 Justificación del problema

La implementación y mantenimiento de jardines y espacios verdes se remonta hace muchos siglos, las antiguas civilizaciones de Mesopotamia, Roma, Babilonia, Grecia, Egipto etc., ya lo practicaban, de esta manera lograban acercar su vida cotidiana a la naturaleza viva, además de favorecerse de las innumerables cualidades que prestaba su adecuación (Ros, 2006).

Desde el año de 1850 se estudian las funciones, composición e importancia de los parques y jardines en las urbes como tal, en una nueva ciencia creada denominada urbanística, que surge en respuesta a dos problemáticas importantes, la higiene de las ciudades y la especulación del suelo (Gómez, 2005).

Según Gómez (2005), la existencia de vegetación urbana, induce a una mejora en la calidad de vida de las personas, conservando una buena salud física y mental, además manteniendo un equilibrio con el ecosistema haciendo que su implementación sea una exigencia y una necesidad por parte de la comunidad.

En la actualidad existe una nueva concepción de desarrollo urbanístico en las metrópolis, la cual incluye en su proyección el tema verde, vinculada a ideas básicas como los valores y recursos naturales (Salvador, 2009).

Por medio de una planificación y ordenamiento adecuado de la colocación de los espacios verdes en las localidades, es posible obtener una serie de beneficios los cuales son indispensables para que el medio funcione correctamente (Ramos, 1996).

Los réditos obtenidos gracias a la presencia de zonas verdes son innumerables, ya que influyen en varios ámbitos como sociales, ambientales, ecológicos, paisajísticos, políticos, culturales, económicos, etc. En el aspecto social, permiten generar un incremento en las relaciones interpersonales; además, se ha demostrado que intervienen en el buen desenvolvimiento, productividad y rendimiento del trabajo humano (Gómez, 2005).

Respecto a la temática ambiental, es uno de los elementos claves para el mantenimiento del equilibrio del ecosistema, ya que influye directamente sobre la calidad de vida de los ciudadanos. En primer lugar actúa sobre el estrés climático, ayudando a controlar la contaminación atmosférica; eliminan del aire partículas contaminantes como por ejemplo ceniza, polvo, hollín y humo de carros, polen, etc. los cuales pueden llegar a causar enfermedades respiratorias por daños a los pulmones de las personas. La vegetación, por medio del fenómeno de fotosíntesis, absorbe gases tóxicos como el dióxido de carbono y a la vez produce por cada árbol alrededor de 1000 m³ de oxígeno diarios; además retienen las aguas atmosféricas, contribuyen a la evapotranspiración; evitan la erosión del suelo provocada por el viento; y, por último son un excelente regulador del intercambio de aire, calor y humedad con el entorno urbano (Gómez, 2005).

En segundo lugar también contribuyen a reducir la contaminación acústica, disminuyendo entre 8 y 10 decibeles por cada metro de espesor de las copas de los árboles. Este tipo de problema puede causar alteraciones en el humor de las personas, la tolerancia y la concentración mental, lo cual puede influir el momento de realizar las actividades diarias de cada individuo (Denuncias verdes, 2008).

En cuanto a las características paisajísticas, pueden causar un impacto en el estado de ánimo y psicología de la gente, disminuyendo el estrés, la tensión, la fatiga y aumentando la salud psíquica (Denuncias verdes, 2008).

Los espacios verdes de un área urbana o metropolitana a parte de lo mencionado anteriormente, cumplen la importante función de vertebración de todo el territorio (Ramos, 1996).

El Ecuador es un país relativamente pequeño que tiene alrededor de 250.000 Km², sin embargo la variedad tanto en flora como en fauna es incomparable. El DMQ es uno de los cantones que cuenta con una gran biodiversidad en el país, razón por la cual es muy importante cuidar los espacios verdes (Burbano & Herdoíza, 2009).

Debido a la problemática anteriormente citada, las autoridades del Cabildo vieron la necesidad de recuperar alrededor de 70 mil hectáreas de zonas verdes, utilizando para ello medios como la reforestación, mejoras de suelo, restauración y mantenimiento de ecosistemas (Diario La Hora, 2011); entre las que se incluye la campaña “Quito Verde” impulsada por el Municipio y empresas privadas que persigue rescatar, cuidar y mantener limpias las áreas verdes y espacios públicos del cantón (Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas, 2011).

Debido a los fines ya mencionados, se creó el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Unidad de Espacio Público (UEP), para la producción masiva de plantas usando biotecnología (El Comercio, 2009).

El método más adecuado para la producción intensiva de plantas es el cultivo de tejidos vegetales por medio del cual se pretende llegar a abastecer de 1.000.000 de plantas al año para reforestar, adornar gran parte de la capital y mejorar el aire de Quito (Diario La Hora, 2008).

El cultivo de tejidos es un conjunto de técnicas que permiten multiplicar plantas *in vitro*, en condiciones de cultivo asépticas a partir de órganos, tejidos, células y protoplastos usando para ello medios nutritivos artificiales, que incluyen reguladores de crecimiento vegetal (RCV). Dentro de la biotecnología es la técnica que ha brindado mayores aportes con aplicaciones como obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva, la producción de metabolitos secundarios, etc. (Pérez, 1998).

Debido a estas razones se adoptó la decisión de implementar estas técnicas para la producción de plántulas, ya que ofrecen mayor rendimiento, mayor calidad y menor costo de producción en el DMQ (CIAC, 2010).

El Laboratorio de Micropropagación actualmente produce especies nativas para procesos de reforestación como magnolia (*Magnolia grandiflora*), arupo (*Chionanthus pubescens*), floripondio (*Brugmansia arborea*). Respecto a especies ornamentales se propaga cucarda (*Hibiscus rosa-sinensis*), terciopelina (*Coleus arcobaleno*), escancel (*Aerva sanguinolenta*), entre otras.

La hortensia (*Hydrangea macrophylla*) es una planta ornamental de características atrayentes, posee una cabeza floral enorme, que puede adquirir una amplia gama de colores, entre ellos: blanco, rojo, rosado en suelos básicos y tonalidades de azul en suelos ácidos; follaje abundante y grueso de color verde. Debido a estas particularidades son plantas muy usadas como ornamento en jardines, terrazas, patios, etc., siendo muy aptas para su ubicación en todos los espacios verdes del Quito, por lo tanto incluidas en el programa de propagación del municipio y las cuales aportarán con todos los beneficios analizados con anterioridad (Gilman, 1999).

Finalmente, cabe recalcar que la propagación de hortensia por métodos convencionales no se ajusta a los requerimientos de cantidad, necesarios para realizar la adecuación de los espacios públicos o áreas verdes; además las plantas producidas por estacas no son de la misma calidad y sanidad que las obtenidas por medio de métodos biotecnológicos.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Establecer un protocolo óptimo de micropropagación de Hortensia (*Hydrangea macrophylla*) a partir de segmentos nodales como una estrategia para la producción a gran escala de la especie, para su utilización ornamental en los espacios públicos del Distrito Metropolitano de Quito.

1.3.2 Objetivos específicos

- Realizar estudios preliminares de la fase de desinfección, establecimiento, propagación y enraizamiento del cultivo *in vitro* de los segmentos nodales de *Hydrangea macrophylla*.
- Establecer un protocolo óptimo de desinfección de segmentos nodales de *Hydrangea macrophylla* con el fin de controlar y eliminar la contaminación microbiana.
- Determinar la concentración adecuada de citoquinina para el establecimiento de los explantes de hortensia.
- Seleccionar un regulador de crecimiento vegetal y su concentración más favorable para la fase de propagación *in vitro* de *Hydrangea macrophylla*.
- Identificar la concentración de auxina requerida para el enraizamiento de los explantes propagados de hortensia.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Características de la planta (*Hydrangea macrophylla*)

1.4.1.1 Generalidades

La hortensia es una especie de carácter exótico, nativa de los bosques húmedos japoneses, que muy fácilmente se adapta a climas de zonas costeras con alta humedad relativa (Codarin, Galopin, & Chasseriaux, 2006).

Debido a sus características y abundante follaje de color verde, es muy utilizada como una planta de flor en maceta para la decoración de paisajes interiores y hogares, además en exteriores en forma de arbusto leñoso. *Hydrangea macrophylla* es la especie más conocida y cultivada en todo el mundo de entre todas las de su género; de

esta se han obtenido muchas variedades de diferentes colores (Alvarez, Cabrera, & Sosa, 2009).

Actualmente, las hortensias también se han transformado en un cultivo de flores de corte menor. Las características ornamentales de estas plantas surgen debido a que presentan una inflorescencia enorme que puede exhibir varios colores como blanco, rosado, azul, rojo o púrpura, debido a la presencia de una antocianina, delfinidina 3-glucósido en su estructura y mediada por la acidez o basicidad del suelo. Los sépalos son comúnmente más conspicuos que los pétalos, por lo tanto el espectáculo lleno de color será siempre debido a estos, además están compuestos por flores decorativas que son largas y coloreadas y no decorativas que son pequeñas y discretas (Kesumawati, Kimata, Uemachi, Hosokawa, & Yazawa, 2006).

Además de los colores que se encuentran usualmente en el mercado, últimamente se ha estado comercializando una variedad de hortensia que tiene sépalos decorativos de color verde, que se produce como consecuencia de la diferenciación de los cloroplastos (Kitamura, Hosokawa, Uemachi, & Yazawa, 2009).

Para obtener diferentes coloraciones en la inflorescencia para las plantas de maceta y las líneas de vivero es indispensable mantener un adecuado control del pH y un detallado monitoreo de los niveles de fósforo y aluminio en el suelo. *Hydrangea macrophylla* se encuentra dentro del grupo de especies que toleran ciertas concentraciones de aluminio en su metabolismo y el cambio de color de rojo a azul en sus sépalos es atribuido a diferencias en su movilidad en la tierra, como Al^{3+} , en función del pH; para que se pueda manifestar una inflorescencia de color rosado, los cultivos requieren que el pH del suelo se encuentre en un rango de 5.8 a 6.2, altos niveles de fósforo y bajas concentraciones de potasio y molibdeno; por otro lado para obtener flores de color azul es necesario mantener un pH más ácido, de entre 5.0 a 5.5, suplementado con varias aplicaciones de Al [$Al_2(SO_4)_3$], bajos niveles de fósforo y altas cantidades de potasio y molibdeno, durante la producción de verano. Existe una competencia entre el fósforo y el ion aluminio; si se usa fertilizantes ricos en fósforo o ácido fosfórico se puede llegar a obtener sépalos de color púrpura o malva (Schreiber, Jones, Lariviere, Mayhew, & Cain, 2011).

La hortensia puede tolerar ambientes con condiciones de sol parcial a entornos de profunda sombra, sin embargo cuando no existe mayor cantidad de luz la formación de flores no va a ser abundante (Anderson *et al.*, 2009).

Su necesidad de agua para lograr obtener su mejor desarrollo es mucho mayor que la de otras especies de *Hydrangeas*. Las hojas grandes y suaves que poseen, se deshidratan fácil y rápidamente; cuando se exponen al calor del sol, incluso con un riego abundante, las hojas se desvigorizan y pueden llegar a marchitarse. Es importante mantenerlas en sombra por las tardes y es recomendable ya sea mediante riego o lluvia proporcionar tres litros de agua por semana (Smith, Chenault, & Tilt, 2010).

Las principales condiciones ambientales conocidas que afectan al tiempo de florecimiento son la irradiación, la calidad de la luz, la duración del día, y la temperatura ambiente durante el desarrollo (Nordlia, Strømb, & Torrea, 2011).

Las hortensias son ampliamente cultivadas como arbustos leñosos en la mayoría de territorio Norteamericano, más de 500 variedades de cultivos se encuentran registrados y existentes en el mercado por todo el mundo, las cuales son el resultado de la investigación genética tanto en Europa como en Japón, desarrolladas en el primer cuarto del siglo XX (Rinehart, Scheffler, & Reed, 2006).

A pesar de ser ampliamente utilizada, esta planta es afectada por una serie de plagas y enfermedades, las cuales por lo general provocan lesiones foliares y florales, que al estar presentes pueden tener un impacto significativo en la salud y la apariencia de la misma, reduciendo su calidad y alterando su valor en el mercado (Mmbaga, Kim, Mackasmiel, & Li, 2012).

Se pueden encontrar afecciones de tipo fúngico como por ejemplo la antracnosis en la cual predominan las manchas secas, oscuras e irregulares causadas por el hongo *Pestalotiopsis guepinii*. También se presenta la viruela, la cual exhibe lesiones redondeadas de hasta 0.5 cm de diámetro, con margen oscuro, rodeadas por un halo purpúreo y centro claro, el causante es *Cercospora hydrangeae*. Además se puede hallar la patología denominada alternariosis, con manchas foliares oscuras e irregulares ubicadas en los bordes de las hojas, el causante es un hongo del género *Alternaria*. Se

ha reportado también la podredumbre de las raíces relacionadas con la presencia de *Fusarium sp.* (Cabrera, Alvarez, Cundom, & Gutiérrez, 2009).

Existe otra enfermedad denominada oídio que es frecuentemente observada cuando el crecimiento se lo hace en invernaderos; en el caso de presencia de esta patología la planta se vuelve prácticamente no comercial. Los síntomas son a menudo discretos, siendo la primera señal la presencia de pequeñas manchas circulares de color blanco con bordes plumosos aleatoriamente dispersas a través de las superficies inferiores de una o más hojas. El hongo causante de esta enfermedad es el denominado *Erisiphe polygoni* (Hagan & Mullen, 2001).

Su gran valor ornamental, por lo tanto comercial ha provocado que muchos científicos se encuentren atraídos por su investigación y desarrollo. Uno de los estudios llevados a cabo es la variación del tamaño del genoma y la relación entre especies del género *Hydrangea*. El tamaño del genoma es un parámetro importante en el manejo de herramientas moleculares para el mejoramiento de la agricultura y características hortícolas de la planta (Cerbah *et al.*, 2001).

1.4.1.2 Taxonomía

REINO: PLANTAE

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: CORNALES/ROSALES

FAMILIA: HYDRANGEACEAE

GÉNERO: *Hydrangea*

ESPECIE: *H. macrophylla*

NOMBRE BINOMIAL: *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.

(ITIS, 2012)

Hydrangeaceae es una familia de diversos géneros, en la cual se puede encontrar árboles o arbustos y en algunos casos enredaderas. De hojas opuestas, simples, a menudo persistentes, sin estípulas, el margen entero o dentado. Las

inflorescencias pueden ser racemosas, corimbosas o en panículas cimosas (Durán, 1999).

Las flores son comúnmente hermafroditas, algunas de la cimas son estériles y conspicuamente alargadas. El número de sépalos varía de 4 a 10, situados sobre el hipantio que por lo general es acostillado. Por otro lado los pétalos pueden variar también de 4 a 10, valvados, imbricados o convolutos. Los estambres son 8, los filamentos subulados a lineares o planos. El ovario puede ser ínfero o simínfero, los carpelos de 2 a 5, los estilos libres o unidos, prácticamente persistentes, el estigma terminal o introso. Los óvulos pueden ser de pocos a numerosos, anátropos. Los frutos pueden ser de tipo capsular, urceolado a cónico, ocasionalmente esferoidal. Las semillas se generan numerosas o solitarias (Durán, 1999).

La familia Hydrangeaceae según Durán (1999), consiste de 17 géneros y 170 especies, repartidas en climas subtropicales de la parte septentrional del hemisferio. Dentro de esta familia el género *Hydrangea* cuenta con alrededor de 80 especies nativas de Asia, América Central y América del Sur.

1.4.1.3 Descripción botánica y etnobotánica

Hydrangea macrophylla es un arbusto, su altura varía de 1 a 3 metros y su corteza es lisa. Sus hojas son de carácter opuesto, simples, pecioladas, obovado-elípticas a ampliamente ovadas, coriáceas, glabras, de 3 a 12.5 cm de largo y 2 a 9 cm de ancho; el margen es aserrado; el ápice puede ser acuminado a agudo; la base es cuneada; el nervio medio y primarios planos en el haz, resaltados en el envés; el peciolo varía de 0.5 a 3 cm de largo y 0.8 a 2.3 mm de ancho (Durán, 1999).

Las inflorescencias están en posición horizontal y son inicialmente compuestas por muchos flósculos fértiles en el centro y de algunos grupos de flores estériles en la periferia con largos sépalos coloreados (Galopin, Codarin, Viemont, & Morel, 2008).

Son inflorescencias corimbosas, terminales, de 6.5 a 18 cm de largo y de 8.5 a 25 cm de ancho, escasamente pubescente, el pedúnculo varía de 2 a 6 cm de largo y de 1.2 a 3 mm de ancho (Durán, 1999).

Los pedicelos pueden medir de 0.8 a 3.5 cm de largo y 0.3 a 0.8 mm de ancho, escasamente pubescentes. Los sépalos pueden variar en número de 4 a 5, ampliamente obovados a elípticos, libres, de 1 a 1.7 cm de largo por 0.6 a 1.6 cm de ancho. Son 4 el número de pétalos, ovalados-elípticos, valvados, de 1.6 a 2.4 mm de largo y 0.9 a 1.5 mm de ancho, deciduos durante la antesis. Los estambres se encuentran en un número de 8, fértiles, intercalando con los pétalos; los filamentos de 0.9 a 1.7 mm de largo y 0.2 a 0.4 mm de ancho; las anteras dorsifijas, biloculares, redondeadas, de 0.7 a 1 mm de largo y 0.6 a 1 mm de ancho, la dehiscencia longitudinal; el ovario es ínfero, ovado, de 0.5 a 0.9 mm de largo y 0.8 a 1 mm de ancho; los estilos son de 2 a 3, subulados, de 0.3 a 0.7 mm de largo y de 0.2 a 0.4 mm de ancho; los estigmas son truncados (Durán, 1999).

Sinonimia: *Viburnun macrophyllum* Thunb.

Hortensia opuloides Lam.

Hydrangea chungii Rehder.

Hydrangea hortensia Siebold.

Hydrangea hortensis Sm. (Harling & Andersson, 1992).

Distribución en el Ecuador: Pichincha, Azuay, Tungurahua, Imbabura.

Nombres comunes: Hortensia, Bigleaf Hydrangea, French Hydrangea.

Altitud: 850-3.000 m.s.n.m.

Tipo de vegetación: escapada de cultivo, por lo que se encuentra en muy diversos tipos de vegetación.

Floración: se da de marzo a noviembre o durante todo el año.

Uso medicinal: las hojas sumergidas en agua caliente y posteriormente pasadas por aceite comestible frío, se usan para madurar los tumores (abscesos con pus) y tratar el dolor (Jørgensen, Neil, & León, 1999).

Uso ornamental: adorno de exteriores, adorno de interiores, arreglos florales de flor seca. Su cultivo no es fácil a causa de heladas, pero es muy apreciada para arreglos florales, utilizando sus inmensas inflorescencias globosas (Carvalho, 2010).

Varietades: Endless Summer, Ayesha, Penny-Mac, Pia, Madam Emile Mouillere, Fuji Waterfall, Lilacina, Veitchii, Beaute Vendomoise, Blue Wave, Lanarth White. Algunas de las variedades se pueden observar en el anexo B (Smith *et al.*, 2010).

1.4.1.4 Importancia de la especie

Hydrangea macrophylla ha sido un importante cultivo en la industria floral a nivel mundial, manteniéndose como una de las especies que mayores aportes económicos ha dado a los países productores de flores. Uno de los ejemplos es Noruega donde las hortensias son utilizadas como una planta de flores en maceta, típica en épocas de primavera, aunque en estos tiempos son producidas en invernaderos durante casi todo el año (Nordlia *et al.*, 2011).

En los Estados Unidos, es uno de los arbustos leñosos de hoja caduca más distribuidos en los viveros, ocupa el cuarto lugar en ventas y genera alrededor de 22 millones de dólares anuales. Por otro lado como plantas ornamentales en maceteros, su mercantilización produce entre 10 millones de dólares anuales (Anderson *et al.*, 2009).

Hydrangea macrophylla es la más popular especie de su género, aunque otras cuatro especies más son cultivadas en este país (Rinehart *et al.*, 2006).

El Ecuador es uno de los principales países productores de flores, interesado en mantener una buena calidad y variedad de las mismas, motivo por el cual la fabricación y venta de hortensias no ha sido la excepción; estas son comercializadas en los viveros con un precio que varía entre los cuatro a ocho dólares.

Además del valor ornamental, en otros estudios se ha descrito que un extracto preparado en base de *Hydrangea macrophylla* tiene actividad anti fúngica en especial muy efectivo en contra de *A. alternata*, *A. flavus*, *F. solani*, por lo tanto podría ser una

materia prima importante para preparar fungicidas útiles en ciertos cultivos (Sagar, Joshi, & Srivastava, 2011).

1.4.2 Cultivo *in vitro*

1.4.2.1 Generalidades

El cultivo de tejidos vegetales tiene su origen alrededor del año de 1902, cuando Haberlandt intentó cultivar células aisladas de plantas y gracias a sus estudios postuló el principio de la totipotencia celular que se transformaría en la base de todos los estudios posteriores del cultivo *in vitro*, ayudando al desarrollo de estas técnicas hasta la actualidad (Pérez, 1998).

El cultivo de tejidos se puede definir como un conjunto de técnicas que permiten cultivar un inóculo (segmentos nodales, yemas apicales, yemas axilares, hojas, tallo, semillas, meristemos, embriones, etc.) con potencialidad de diferenciación, bajo condiciones estériles, en presencia de un medio de cultivo nutritivo artificial balanceado más la adición de fitohormonas por su función como RCV (Esquivel & Escalant, 1994).

Mediante la micropropagación de plantas por estos métodos se obtiene como resultado una descendencia que lleva la misma información genética, es decir se producen clones idénticos a la planta madre, exceptuando el cultivo de semillas que tienen su propia información genética obtenida de sus progenitores (Esquivel & Escalant, 1994).

Dentro de la biotecnología, ha sido una de las áreas que mayor contribución práctica ha aportado a la ciencia, con aplicaciones como obtención de plantas libres de patógenos, propagación masiva, conservación de germoplasma, producción de metabolitos secundarios, mejoramiento genético y la ingeniería genética (Pérez, 1998).

Gracias a los avances logrados en la regeneración de plantas *in vitro* hasta la actualidad, se ha creado toda una industria de micropropagación intensiva a nivel mundial, especialmente en Europa y Estados Unidos, produciendo más de 500 millones de unidades por año (Pérez, 1998).

Para que se lleve a cabo un buen desarrollo y crecimiento de una planta *in vitro*, existen una serie de factores complejos que hay que tomar en cuenta, como la constitución genética de la planta, los nutrientes (agua, macro y micro elementos, azúcares), factores físicos que influyen sobre el crecimiento (luz, temperatura, pH, concentraciones de O₂ y CO₂) y algunas sustancias orgánicas como los reguladores, vitaminas, etc. (Pierik, 1990).

1.4.2.2 Totipotencia celular

Las técnicas de clonación *in vitro* han demostrado el hecho de que las células somáticas vegetales bajo condiciones apropiadas pueden diferenciarse y llegar a formar un tejido, un órgano y hasta una planta completa, esta capacidad para regenerarse se denomina *totipotencia celular* (Razdan, 2003).

Debido a que el potencial radica principalmente en la diferenciación celular, esto indica que todos los genes necesarios para llevar cabo este proceso se encuentran presentes en cada una de las células y muchos de ellos permanecen inactivos en tejidos u órganos diferenciados, los cuales se podrán expresar solo bajo condiciones de cultivo adecuadas. La formación de un organismo adulto desde una sola célula (zigoto), es el resultado de la integración de la división y de la diferenciación celular (Pierik, 1990).

Para que una célula diferenciada exprese totipotencia tiene primero que sufrir un proceso de des-diferenciación para luego re-diferenciarse. El fenómeno por medio del cual una célula madura se revierte a un estado meristemático y forma un tejido calloso no diferenciado se denomina des-diferenciación, mientras que el proceso mediante el cual una célula des-diferenciada llega a formar un tejido, un órgano y hasta una planta completa, se denomina re-diferenciación (Razdan, 2003).

Las técnicas que se aplican en el cultivo de tejidos ofrecen una excelente oportunidad para estudiar los factores responsables de la diferenciación celular en plantas (Razdan, 2003).

1.4.2.3 Técnicas de regeneración vegetativa

Para regenerar plantas *in vitro* existen dos procesos morfogénicos muy utilizados, la organogénesis directa o la indirecta y la embriogénesis somática (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

La organogénesis es un fenómeno que influye tanto en la parte morfológica como genética del explante, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema dando como resultado un brote vegetativo, manteniendo siempre una relación entre el brote nuevo y el tejido paterno (Pérez, 1998).

La organogénesis directa se desarrolla cuando los brotes que se forman pueden generarse directamente del explante, mientras que en la indirecta se da un paso intermedio a través de la formación de un conjunto de células denominada callo. A diferencia de la embriogénesis somática en la organogénesis se utilizan diferentes medios de cultivo, ya que aquellos medios que inducen la formación de brotes inhiben la formación de raíces y viceversa (Pérez, 1998).

Se determinó que la proporción de ciertos compuestos era indispensable para generar una diferente respuesta morfogénica *in vitro*. Siendo la relación entre los RCV (auxinas/citoquininas) las más importantes; si la proporción de auxina es alta comparada con la proporción de citoquinina se promueve la formación de raíces, caso contrario si es baja se lleva a cabo la formación de yemas (Roca & Mroginsky, 1993).

Para que se lleve a cabo una organogénesis exitosa es importante tener en cuenta ciertos aspectos que pueden afectar en el procedimiento. Con respecto al explante hay que tener en cuenta su edad fisiológica y ontogénica, su tamaño, el tejido u órgano del que es extraído; además también influyen el estado fisiológico de la planta madre, el medio de cultivo y la época del año cuando se realiza el proceso. Cualquier combinación o interacción de estos factores puede provocar cambios morfológicos en la planta (Roca & Mroginsky, 1993).

La organogénesis se puede inducir a partir de diferentes tipos de explantes, entre ellos podemos cultivar segmentos nodales, yemas axilares, yemas apicales, hojas, meristemos, etc. (Pérez, 1998).

El cultivo de segmentos nodales consiste en el aislamiento de una yema axilar que viene acompañada con una porción de tallo, la cual se siembra en el medio de cultivo para obtener un vástago a partir de la yema (Anexo C). Esta técnica es la más natural de las utilizadas en la propagación vegetativa de plantas *in vitro*, ya que también es muy utilizada *in vivo* (Pierik, 1990).

Las yemas generalmente utilizadas son las que se encuentran en las axilas de las hojas. Cuando se ha realizado con éxito la regeneración de la planta, es posible obtener la cantidad de clones necesarios mediante una propagación. Cuando se obtiene el número de vástagos requeridos, estos se enraízan para finalmente ser transferidos al suelo en la etapa de aclimatización (Pierik, 1990).

1.4.2.4 Factores de influencia

Existen cuatro factores que son los que más intervienen en la obtención y crecimiento de nuevos órganos *in vitro*: el genotipo de la planta, las condiciones químicas seleccionadas para realizar el cultivo, de igual manera las condiciones físicas y por último el explante (Levitus *et al.*, 2010).

El genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos, desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro*, proliferación de callo, diferenciación, hasta la producción de nuevos órganos. Debido a esta influencia, no es posible plantear y generalizar protocolos o metodologías de trabajo específicos, razón por la cual es necesario determinar medios de cultivo y condiciones para cada situación en particular (Levitus *et al.*, 2010).

En el caso de las condiciones químicas, varios son los compuestos que influyen en los patrones morfogénicos *in vitro*. Uno de ellos es la composición salina de los medios de cultivo, que por lo general el más usado es la formulación de Murashige y Skoog (MS) (1962), aunque existen otras diseñadas para inducir determinadas

respuestas. Además interviene una estrecha relación entre la composición hormonal del explante y la concentración de reguladores de crecimiento adicionada al medio de cultivo (Roca & Mroginsky, 1993).

A pesar de que la composición salina del medio de cultivo usado no sea la correcta, la influencia de las fitohormonas es tan fuerte que puede promover la morfogénesis. Si se logra establecer un adecuado equilibrio entre el medio de cultivo y RCV, se puede aumentar significativamente la diferenciación de órganos. Los tipos y concentraciones de fitohormonas utilizadas están íntimamente ligados con el genotipo de los explantes (Pérez, 1998).

Otros compuestos químicos que afectan procesos morfogénicos son los antibióticos, entre los más utilizados se encuentran la cefotaxime, kanamicina, estreptomicina y carbenicilina, por lo general aplicados para la eliminación de bacterias endógenas (Levitus *et al.*, 2010).

El carbón activado es consumido también para adsorber compuestos tóxicos de la micro atmósfera gaseosa o el exceso de RCV presentes en el medio de cultivo (Levitus *et al.*, 2010).

El uso de un agente gelificante también es determinante en la morfogénesis, pueden emplearse en medios de cultivo en consistencias semisólidas o líquidas. El agente comúnmente adicionado es el agar, que es extraído de diversas algas marinas. Las diferentes calidades de este existentes en el mercado pueden llegar a modificar la expresión morfogénica, debido a que pueden contener sustancias promotoras o a la vez pueden tener sustancias inhibitorias del crecimiento (Roca & Mroginsky, 1993).

Por último se encuentra la atmósfera gaseosa, la cual esta condicionada al tipo y tamaño del envase utilizado en el cultivo, así como también al método por el cual es sellado (algodón, papel aluminio, película de resinete transparente o tapas rígidas de polipropileno). El intercambio gaseoso varía dependiendo de la cobertura manejada, por lo tanto la atmósfera interna también tolerará variaciones. La cantidad de oxígeno existente en el recipiente disponible para el explante, condiciona el crecimiento (Pierik, 1990).

Respecto a las condiciones físicas, las que provocan mayores efectos son la luz, la temperatura y la humedad relativa (Razdan, 2003).

Cada especie estudiada tiene un rango de temperatura óptimo de crecimiento *in vivo* y aunque en la naturaleza las plantas se encuentran sometidas a variaciones de temperatura en el día y la noche o en cambio de estaciones, en cultivo de tejidos la temperatura *in vitro* se intenta mantener siempre constante e igual a la óptima de crecimiento (Levitus *et al.*, 2010).

La humedad relativa se expresa como la cantidad de vapor de agua presente en la atmósfera relativa del recipiente donde se realiza el cultivo y es un parámetro físico muy importante que hay que tener en cuenta. Esta varía dependiendo de la cobertura utilizada para sellar el recipiente, por lo tanto si el sello es hermético, la humedad relativa va a ser del 100%, sin embargo, si el sello permite un intercambio gaseoso, la humedad interna podría llegar a descender a niveles cercanos al 50%, causando una deshidratación masiva del medio de cultivo, variando la concentración de sus componentes con el riesgo de que lleguen a ser tóxicos (Levitus *et al.*, 2010).

En cuanto a la luz como factor físico, es importante cuidar que el suministro sea el adecuado respecto a la intensidad, calidad y periodo de exposición. En el caso de que se quiera inducir la formación de callo, la oscuridad es primordial, mientras que para inducir la formación de órganos, la luz es propicia (Pérez, 1998).

A parte de los factores ya citados, los procesos morfogénicos también dependen del explante seleccionado. El tratamiento preliminar o también llamado fase preparativa, las condiciones físicas y fisiológicas de las plantas madre, su lugar de origen y la sección de la cual se tome el explante, determinarán en conjunto las respuestas obtenidas *in vitro* (Levitus *et al.*, 2010).

1.4.3 Medios de cultivo

1.4.3.1 Generalidades

Los medios de cultivo son una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos que aportan con todos los nutrientes necesarios para el mantenimiento y la manipulación de los cultivos *in vitro*. Se han descrito más de dos mil diferentes medios, los cuales pueden tener de 6 a 40 componentes diferentes. La constitución básica de estos es a partir de agua, una fuente de carbono (azúcares), nutrientes minerales, vitaminas, RCV, agentes gelificantes y otras sustancias más que se pueden adicionar dependiendo del objetivo de uso (Levitus *et al.*, 2010).

1.4.3.2 Componentes

El componente más abundante en el medio de cultivo es el agua, constituyendo alrededor del 95% del volumen total. Al ser el de mayor proporción es de vital importancia que cumpla con ciertas condiciones: tiene que ser desmineralizada, destilada y de la mejor calidad posible, de manera que se encuentre libre de cualquier otro tipo de compuesto o contaminante que afecte el proceso (Pierik, 1990).

El crecimiento de las plantas en condiciones de laboratorio es hostil, en este ambiente no se lleva a cabo normalmente el proceso de fotosíntesis, por lo que los explantes tienden a ser muy poco autotróficos, prácticamente son heterótrofos siendo muy importante la adición de una fuente de carbono que ayude con su metabolismo (Pierik, 1990).

La fuente que se utiliza por lo general es la sacarosa en concentraciones del 2 al 5%, aunque en algunos trabajos se la ha remplazado por glucosa, maltosa o galactosa (Levitus *et al.*, 2010).

En orden de importancia los nutrientes minerales son subsecuentes a los azúcares. Los macro elementos esenciales que todas las plantas demandan son nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio y hierro. Los micro elementos son

también indispensables, sin embargo su requerimiento es en cantidades sumamente pequeñas, se encuentra el boro, molibdeno, manganeso, cobalto, zinc, cobre, cloro e iodo (Esquivel & Escalant, 1994).

El nitrógeno es abastecido en el medio en forma de amonio o nitrato, aunque también se puede añadir en forma de urea, glutamina o caseína hidrolizada; mientras que el hierro debe ser suplementado unido a un agente quelante para que este pueda estar disponible en un amplio rango de pH (Levitus *et al.*, 2010).

Existen muchas combinaciones posibles que se pueden diseñar con los macro y micro nutrientes y cada una de ellas determina un medio de cultivo diferente. Como por ejemplo, algunos de los más importantes citados son el medio White formulado para el cultivo de raíces, MS para inducir organogénesis y regeneración de plantas y el medio Gamborg creado para cultivo de células en suspensión y callos (Razdan, 2003).

Con respecto al requerimiento vitamínico, las plantas *in vivo* son capaces de producir endógenamente las vitaminas necesarias para catalizar varios de sus procesos metabólicos; sin embargo cuando se practica el cultivo *in vitro*, los explantes sintetizan solo algunas esenciales y en cantidades muy pequeñas, por lo que es importante incorporar estas en el medio de cultivo (Razdan, 2003).

De todas las vitaminas que se añaden en las preparaciones es probable que en forma general solo sea esencial la inclusión de la tiamina, la cual parecería ser la única que influye realmente en el crecimiento de los cultivos, a pesar de que las más usadas para estimular procesos específicos son: la biotina, ácido nicotínico, riboflavina, ácido fólico, retinol, ácido ascórbico, piridoxina y mioinositol (Jha & Ghosh, 2005).

Respecto a los RCV, existen cuatro clases que son las más importantes en el cultivo de tejidos: las auxinas, las citoquininas, las giberelinas y el ácido abscísico. El crecimiento, la diferenciación y la organogénesis solo se pueden llevar a cabo cuando se agrega uno o más hormonas al medio (Levitus *et al.*, 2010).

Una fitohormona puede ser definida como una molécula orgánica pequeña que interfiere en las respuestas fisiológicas de las plantas a muy bajas concentraciones. Estas

juegan un papel muy importante ya que ayudan a la comunicación celular entre el ambiente y el genoma, produciendo diferentes reacciones a nivel fenotípico (Jha & Ghosh, 2005).

Del grupo de las auxinas las más utilizadas son: el ácido naftalenacético (ANA), el ácido indolbutírico (AIB), el ácido indolacético (AIA), el ácido 2,4 diclofenoxiacético (2,4 D) y el picloran. Una característica común de las auxinas es que inducen a la división celular (Esquivel & Escalant, 1994).

Las citoquininas más utilizadas son la kinetina (KIN), la benzilaminopurina (BAP), el thidiazurón, la zeatina (ZEA). Estas se utilizan por lo general para estimular el crecimiento y el desarrollo, también provocan la división celular. En concentraciones altas, pueden inducir la formación de vástagos adventicios y axilares, inhiben la formación de raíces y disminuyen la dominancia apical (Pierik, 1990).

La giberelina más usada es el ácido giberélico (AG_3). Es una hormona muy sensible al calor, se puede llegar a perder un 90% de su actividad después del autoclaveado. Esta induce la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro* (Pierik, 1990).

Finalmente es importante destacar que se puede preparar medios de carácter semisólidos o sólidos y para ello se usan agentes gelificantes. Los geles ayudan a dar soporte a los tejidos que se encuentran en crecimiento en condiciones estáticas (Razdan, 2003).

El agente frecuentemente usado es el agar a concentraciones del 0.6 al 1%. Este es un polisacárido natural que proviene de algas rojas marinas (Jha & Ghosh, 2005).

Es importante tomar en cuenta la pureza del agar, ya que ocasionalmente aparecen contaminantes de variada naturaleza. La marca y las concentraciones utilizadas pueden causar diferentes respuestas *in vitro* a las esperadas (Roca & Mroginsky, 1993).

Existen otro tipo de gelificantes usados como el gelrite, agargel, transfergel, phytigel, agarosa, etc. (Pierik, 1990).

1.4.4 Micropropagación vegetal mediante organogénesis

1.4.4.1 Generalidades

Murashige en el año de 1974, indicó según el análisis de sus estudios que para lograr una micropropagación vegetativa se requería de tres fases indispensables, sin embargo según la evolución de la ciencia y la tecnología en el campo del cultivo de tejidos, actualmente la mayoría de investigadores y micropropagadores proponen que realmente se pueden diferenciar cinco fases críticas para obtener una exitosa multiplicación (Pérez, 1998).

La primera etapa o fase 0 es la denominada *preparativa*, la cual es casi imprescindible para realizar una posible propagación real y repetible; la fase I es la llamada *establecimiento* en donde el objetivo principal es obtener un cultivo viable y axénico; la fase II subsecuente es la *propagación* en la cual se busca alcanzar la proliferación del explante previamente establecido, pero sin obviar los objetivos de la fase III, el *enraizamiento*; y, por último se encuentra la fase IV nominada como *aclimatización*. Cada una de estas etapas tienen sus problemas específicos, pero además existe una serie de inconvenientes que son característicos y en común para todas (Pérez, 1998).

1.4.4.2 Fase preparativa

En un inicio esta etapa fue planteada debido a que se presentaba un alto índice de contaminación en el posterior establecimiento de los explantes. En la actualidad esta concepción se ha complementado y se ha afirmado que esta fase es importante e indispensable para el desarrollo de un sistema de micropropagación eficiente y repetible, además tiene una alta influencia en la calidad de las plantas finalmente obtenidas tanto desde el punto de vista genético, sanitario y fisiológico (Pérez, 1998).

Para lograr un buen proceso de micropropagación es de vital importancia partir de material vegetal adecuado. La planta donadora o también llamada planta madre debe tener buenas características genéticas debido a que están ligadas con la frecuencia de aparición de variantes somaclonales en el desarrollo; conjuntamente se debe realizar una correcta selección individual de plantas con características fenotípicas especiales que correspondan con el clon o variedad a propagar. Es muy usual seleccionar las donadoras en base a plántulas micropropagadas anteriormente que se encuentren en ambientes controlados como invernaderos, lo que previene que una serie de riesgos se presenten a futuro (Pérez, 1998).

Por otro lado, el estado fisiológico de las plantas es otro factor muy influyente en el comportamiento de la respuesta de los tejidos en cultivo. Es recomendable utilizar especímenes con una edad fisiológica semejante que demuestren un crecimiento activo con un desarrollo vigoroso y sano. Para lograr lo antes nombrado se ha planteado una serie de pre-tratamientos (Pierik, 1990).

Como se conoce la mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* es la planta madre, el crecimiento bajo condiciones higiénicas de la misma, asegura una notable reducción de los contaminantes, en especial de origen fúngico. En el caso de que se lograra establecer plantas madre libres de patógenos, se podría aseverar que la posterior aparición de contaminación sería debido a un mal uso de las técnicas o procedimientos. La práctica más común para obtener plantas donadoras libres de patógenos, es aplicar la selección negativa en condiciones de campo o invernadero, el empleo de fungicidas, bactericidas, insecticidas, desinfectantes durante todo el desarrollo, en el material de plantación (estacas, secciones nodales, yemas, tubérculos, bulbos, rizomas) y en las plantas madre debe ser riguroso y sin olvidar que todas las condiciones deben ser higiénicas (Pérez, 1998).

Otro pre-tratamiento para lograr uniformar el estado fisiológico de las plantas aparte del ya citado, es conservar las condiciones ambientales necesarias. Las plantas tienen que encontrarse en un entorno controlado de luz, temperatura, humedad relativa, con niveles apropiados de acuerdo a la especie. En la mayoría de casos no es estrictamente obligatorio mantener a punto todos estos factores, solo son

acondicionados mediante el uso de una cubierta plástica, condiciones higiénicas y un sistema de riego (Pérez, 1998).

1.4.4.3 Desinfección

Como se mencionó anteriormente el cultivo *in vitro* consiste en sembrar un explante con alto potencial de diferenciación bajo condiciones asépticas en un medio balanceado con nutrientes y fitohormonas. A la vez de favorecer el crecimiento de los explantes, también estos medios contribuyen al desarrollo de los microorganismos contaminantes presentes, razón por la cual es de importancia la desinfección antes de iniciar un proceso de propagación (Esquivel & Escalant, 1994).

La contaminación es uno de los principales problemas a resolver en la industria de la micropropagación. Dos pueden ser las fuentes de las cuales se origina una infección, primeramente aquellas que vienen de la superficie (contaminación exógena) o en ciertos casos las que se encuentran en el interior de los tejidos de la planta donadora (contaminación endógena), y en segundo lugar las que provienen por fallas de manipulación de los procedimientos de laboratorio (Pérez, 1998).

Las superficies de los tejidos de las plantas constituyen hábitats perfectamente adecuados para que existan microorganismos, pudiendo alojarse en estomas, lenticelas o cualquier otra abertura natural, lo cual vuelve más complicada su eliminación. El objetivo del proceso de desinfección superficial de los explantes consiste en tratar de erradicar los patógenos presentes, pero tratando de causar el menor daño posible, ya que las sustancias desinfectantes utilizadas son demasiado fuertes (Esquivel & Escalant, 1994).

Son varios los agentes desinfectantes recomendados entre los que se puede encontrar el hipoclorito de sodio (cloro comercial del 2 al 5%) y el hipoclorito de calcio (del 6 al 12%), que son los menos tóxicos. También es comúnmente usado el etanol al 70%. Además antes de la adición de estas sustancias por lo general se somete a los explantes a una solución con detergente, el más usado Tween 20 (2 a 4 gotas por litro), que ayuda a romper la tensión superficial y aumentar el contacto de los explantes con los desinfectantes (Chawla, 2004).

En el caso de que exista una contaminación endógena, es recomendado el uso de antibióticos en el medio de cultivo, aunque no siempre surte el efecto requerido; es importante determinar el patógeno a tratar para saber que antibiótico utilizar, o se puede a la vez aplicar uno de más amplio espectro, es decir que actúe en contra de una variedad de microorganismos (Pérez, 1998).

Después de la exposición a los desinfectantes previamente citados, es importante lavar las muestras con abundante agua destilada estéril para evitar que el químico siga actuando y quemando el tejido. Es usual realizar de 2 a 3 lavados. Finalmente los explantes quedan listos y libres de contaminación, para pasar a la siguiente etapa que es el establecimiento (Roca & Mroginsky, 1993).

1.4.4.4 Establecimiento

El objetivo primordial de esta etapa es obtener un cultivo axénico de los explantes previamente desinfectados en un medio nutritivo adecuado para que se de un buen desarrollo y crecimiento, para así establecer plantas vigorosas con las que se puede comenzar el proceso de multiplicación (Pierik, 1990).

Una mejor respuesta *in vitro* se consigue cuando los explantes son tomados de plantas madre jóvenes debido a que tienen zonas de crecimiento mucho más activas que una donadora adulta, cuanto más tierno sea el tejido y menos diferenciado mejor va a ser la reacción (Esquivel & Escalant, 1994).

El tamaño del explante también influye en el establecimiento, mientras más grande sea su dimensión más fácil será la regeneración pero más probabilidades de contaminación existirán; al contrario con la reducción del tamaño más difícil será la regeneración, pero el peligro de contaminación se reducirá (Pérez, 1998).

Existen diferentes tipos de explantes para realizar una introducción *in vitro* sin embargo con fines comerciales los más usados son los meristemas o ápices, además de los segmentos axilares y nodales. El empleo de uno u otro tipo depende mucho del objetivo que se persiga con la propagación, como por ejemplo si se quiere obtener plantas libres de virus o enfermedades sistémicas es necesaria la utilización de

meristemos; por otro lado si el fin es simplemente la propagación masiva es frecuente el manejo de ápices caulinares debido a que la manipulación y la regeneración de plantas es más fácil (Pérez, 1998).

No existe un medio de cultivo utilizado para la introducción que sea de carácter universal y obligatorio pero en la mayoría de los estudios de micropropagación se usa el propuesto por Murashige y Skoog (1962), con algunas modificaciones en sus ingredientes dependiendo de la especie a tratar. Un equilibrio hormonal entre auxinas y citoquininas en el medio es requerido para la formación adecuada y viable de los explantes; este balance va a estar mediado por las concentraciones endógenas de estas fitohormonas presentes naturalmente; algunas especies son establecidas sin la necesidad de ningún tipo de RCV, debido a la presencia de suficiente cantidad endógena (Pérez, 1998).

Usualmente en los ápices y meristemos las citoquininas endógenas se encuentran en insuficiencia, debido a que el principal sitio de síntesis de esta clase de hormonas son las raíces, por lo que la adición exógena en los medios es generalizada. Las más empleadas han sido el BAP, KIN y ZEA. Por lo contrario las auxinas son sintetizadas en los ápices y meristemos, conteniendo una gran cantidad endógena, razón por la cual en los medios de cultivo se encuentran en proporciones muy pequeñas o en algunos casos sin su presencia. Las giberelinas al parecer en la mayoría de los explantes se metabolizan en suficiente cantidad (Pierik, 1990).

1.4.4.5 Multiplicación

Esta es considerada la fase más importante e influyente dentro de todo el proceso, aquí se realiza la verdadera multiplicación de una especie o variedad. Se puede definir el número de propágulos que se van a obtener al final del ensayo, gracias al cálculo del índice de propagación, de igual manera se determinará la calidad genética. El objetivo principal en este procedimiento es conseguir la mayor cantidad de plántulas posibles a partir de cada explante previamente establecido. La multiplicación se puede realizar por tres diferentes métodos: propagación en base a yemas axilares, a yemas adventicias y por medio de embriogénesis somática que es en la actualidad la técnica de mayor eficiencia cuantitativa y económica (Pérez, 1998).

Los medios de cultivo y las combinaciones de RCV que se usan en esta etapa interactúan para inducir la brotación en los explantes procedentes del establecimiento. Cada brote obtenido representa una nueva planta que puede reiteradamente ingresar a un proceso de propagación, obteniendo más generaciones y en sí más individuos (clones). Estos ciclos pueden repetirse hasta conseguir el número de plántulas que se requiera y que finalmente pasarán al enraizamiento que es la etapa siguiente (Roca & Mroginsky, 1993).

La vía a través de la cual se realice el proceso de propagación ya sea yemas axilares o yemas adventicias deberá apoyarse en un estudio íntegro de la frecuencia de variantes somaclonales o fisiológicas que se generan *in vitro*. La multiplicación por medio del método de yemas axilares es la que posibilita la mayor estabilidad genética en las plantas producidas y puede ser alcanzada más fácilmente en la mayoría de las especies (Pérez, 1998).

El sustrato más utilizado para este objetivo en los inicios del cultivo de tejidos fue el medio White (1963), sin embargo en la actualidad el más aplicado es el MS suplementado con dosis variables de citoquininas combinadas y en algunos casos adicionadas también con auxinas. De igual manera que en el establecimiento, es más importante el aditamento de citoquininas debido a que ayudan a inducir la brotación inhibiendo la dominancia apical y además porque la cantidad endógena es muy pobre. El balance auxinas-citoquininas es muy determinante e influye íntegramente en el coeficiente de multiplicación (Pérez, 1998).

1.4.4.6 Enraizamiento

En esta etapa, todas y cada una de las plantas multiplicadas en la fase previa (brote, esqueje o yema) de forma individual, tienen que ser cultivadas en un medio que induzca la formación y crecimiento de un pseudotallo o tallo con las primeras hojas y; además constituya y desarrolle varias raíces que ayuden a la absorción de nutrientes cuando la plántula sea transferida sobre un sustrato enriquecido, convirtiéndose así en una vitroplanta aclimatizada totalmente preparada para ser acoplada al campo (Pérez, 1998).

La uniformidad de la calidad de las vitroplantas que salen de esta fase, determina el valor comercial, además las diferencias en el desarrollo pueden dar indicios de la existencia de variabilidad epigenética o genética. Para alcanzar un buen porcentaje en eficiencia productiva, biológica y económica, algunos factores deben controlarse adecuadamente, entre ellos el uso de medios de cultivo simples y si es viable en estado líquido, luz natural como fuente de energía, frascos de vidrio de tamaños apropiados para la especie tratada, entre otros (Roca & Mroginsky, 1993).

Los RCV que se utilizan por lo general en mayor cantidad en esta etapa son las auxinas, que son las que estimulan a que la planta desarrolle raíces adventicias. Las más usadas son ANA, AIA, AIB y 2,4-D. Se conoce que algunas especies tienen una buena producción de auxina endógena por lo que muchas veces pueden ser cultivarlas en un medio exento de cualquier fitohormona (Razdan, 2003).

Ciertos propagadores para evitar poner auxinas en los medios de cultivo de enraizamiento, antes de la siembra, embeben durante varios minutos (min) a los explantes en soluciones con altas concentraciones de auxina (Jha & Ghosh, 2005).

Otra práctica para estimular la formación de raíces es reducir la concentración de sales minerales a la mitad, un tercio o un cuarto de la normalmente utilizada en la formulación de los medios basales. El procedimiento más aplicado es la disminución a la mitad (Razdan, 2003).

Además de lo ya citado, en la mayoría de los medios de cultivo para provocar el enraizamiento también se recomienda aumentar la concentración de sacarosa, con el fin de lograr un crecimiento vigoroso de las raíces. Las vitroplantas que se obtienen con altas cantidades de azúcares también han demostrado tener una mayor sobrevivencia al ser transferidas a la etapa de aclimatización (Pierik, 1990).

Dos factores medioambientales, la luz y la temperatura, influyen directamente en la formación de raíces. La iluminación debe ser considerada en sus tres componentes: la intensidad, duración del periodo de exposición y la calidad. La cantidad de luz requerida por las vitroplantas no es la misma que la utilizada por las plantas autótrofas *ex vitro* debido a que en el laboratorio la fotosíntesis no es una actividad obligatoria, ya

que el medio de cultivo se provee todos los nutrientes necesarios sin embargo la luz sirve para regular ciertos procesos morfogénicos (Pérez, 1998).

1.4.4.7 Aclimatización

Todas las fases anteriores son consideradas *in vitro*, donde las plantas se desarrollan en ambientes con alta humedad, baja intensidad de luz, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos en especial sacarosa, lo que hace que las vitroplantas finalmente obtenidas después de la fase de enraizamiento sean demasiado delicadas ante cualquier cambio y estén acostumbradas a tener todo disponible para realizar su metabolismo. La aclimatización constituye el paso de las plántulas a condiciones ambientales *ex vitro*, lo que provoca una serie de fenómenos que hacen que las plántulas se estresen y muchas de ellas no sobrevivan al proceso. Es por ello que se ha planteado ciertas técnicas que permiten reducir el daño causado por la aclimatización y además ayudan a que las plantas retornen gradualmente a su estado funcional y morfológico normal (Pérez, 1998).

El objetivo de estas técnicas es controlar las condiciones ambientales para que no se produzca un cambio brusco de aquellas, se busca reducir gradualmente la humedad relativa, aumentar la cantidad de luz y permitir un crecimiento autotrófico; todo en un medio aséptico (Jha & Ghosh, 2005).

Las dos primeras semanas después de la aclimatización son críticas y es importante simular un ambiente parecido al que se manejaba en condiciones *in vitro*, hasta que las plantas logren adaptarse a las nuevas condiciones (Chawla, 2004).

Las instalaciones que generalmente se utilizan para ubicar las plantas que salen del proceso de propagación que sirven para controlar todas las condiciones ambientales en el proceso de aclimatización son los umbráculos, que son las infraestructuras más sencillas, de menor costo y los invernaderos que pueden ser implementados con o sin control de clima (Pérez, 1998).

Para la siembra de las plantas a aclimatizar se utilizan una serie de sustratos, que son materiales sólidos y porosos de origen natural o sintético, que solos o

combinados, garantizan que las vitroplantas tengan un adecuado crecimiento bajo condiciones ambientales controladas, proveyendo un sostén mecánico; y, a la vez permitiendo que las raíces tomen aire y agua constantemente. Los materiales utilizados deben mantener una buena sanidad, los más comunes son: la turba, el humus de lombriz, el compost, la zeolita, el cascajo (Pérez, 1998).

1.5 Sistema de hipótesis

Existe una combinación óptima de componentes del medio de cultivo y reguladores de crecimiento mediante la cual se establece en forma significativa el cultivo *in vitro* de Hortensia (*Hydrangea macrophylla*) a partir de segmentos nodales, como una estrategia de producción a gran escala, para su utilización ornamental en los espacios públicos del Distrito Metropolitano de Quito.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

2.1.1 Instituciones

- Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas del Municipio del Distrito Metropolitano de Quito (EPMOP-Q).
- Escuela Politécnica del Ejército (ESPE).

2.1.2 Personal académico

- Tatiana Páez, MC. Directora del proyecto.
- Jaime F. Gía, MSc. Codirector del proyecto.

2.1.3 Personal empresarial

- Cristián Reyes, MSc. Director del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.
- Andrea González, encargada del área de siembra del laboratorio.
- Ing. Lorena Oña, encargada del área de producción de medios de cultivo del laboratorio.
- Ing. Segundo Aguilar, Director del banco de semillas.

2.2 Fase de campo

2.2.1 Localización geográfica del vivero

El vivero de Cununyacu, donde se encontraron las plantas madre de *Hydrangea macrophylla* necesarias para el desarrollo de este estudio y en el cual se sitúan las instalaciones del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, está ubicado en la vía Intervalles Km 2 $\frac{1}{2}$ de la parroquia Cumbayá, al nororiente del Distrito Metropolitano de Quito, provincia de Pichincha. Sus coordenadas geográficas son 0° 13' 59" S de latitud y 78° 25' 70" W de longitud, a una altura de 2433 m.s.n.m. (Fig. 2.1).



Fuente: Google Earth, 2012.

Figura 2.1 Mapa tipo relieve de la ubicación del Vivero de Cununyacu y del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la UEP-DMQ.

2.2.2 Plantas Donadoras

Las plantas madre de hortensia utilizadas para este estudio tuvieron dos años de edad aproximadamente, las cuales se encontraron dispuestas en el vivero de Cununyacu en lotes de 1.5 m de ancho por 2.5 m de largo, rotulados con su respectivo nombre común y científico (Fig. 2.2). Estas plantas fueron adquiridas en el vivero “Camila” ubicado en Nayón, el cual a su vez se abastece constantemente de hortensias que son producidas por medio de estacas en las florícolas de la provincia de Imbabura.

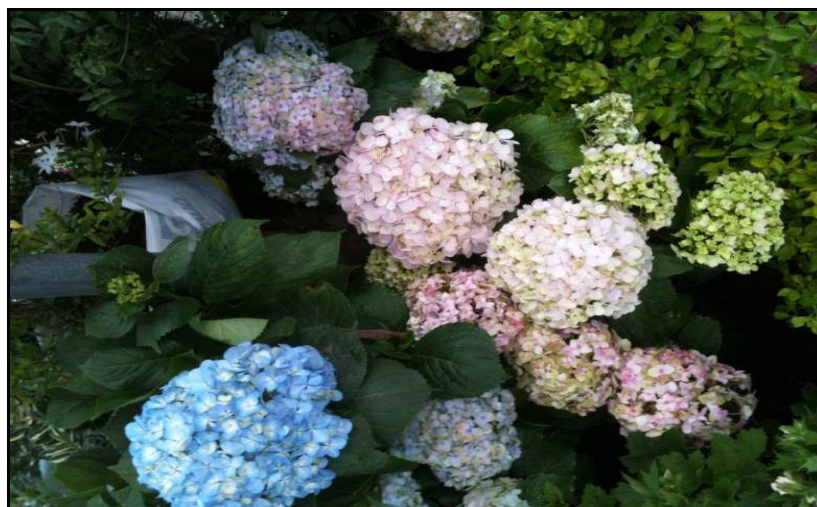


Figura 2.2 Plantas madre de hortensia (*Hydrangea macrophylla*) ubicadas en lotes de 1.5 m de ancho por 2.5 m de largo, en el vivero de Cununyacu de la EPMMOP-Q.

2.2.2.1 Tratamiento Preliminar

Con el objetivo de eliminar la mayoría de patógenos presentes y además de tratar de llegar a un estado fisiológico uniforme en todas las hortensias, se realizaron una sucesión de aspersiones alternando fungicidas y bactericidas cada dos semanas. Los utilizados fueron:

- Phyton: bactericida/fungicida sistémico preventivo y curativo, su ingrediente activo es sulfato de cobre pentahidratado, es una solución acuosa agrícola que sirve para aplicación al follaje, ayuda a tratar botrytis, antracnosis, sclerotinia, pseudomonas, entre otras. La dosis utilizada fue 1 cc.L⁻¹.
- Talón: fungicida agrícola en polvo, sus ingredientes activos son mancozeb y metalaxyl. La dosis utilizada fue 1 g.L⁻¹.
- Fegadazin: fungicida sistémico preventivo y curativo, su ingrediente activo es el carbendazim. Se aplica al follaje sin embargo puede ser absorbido por la raíz y el tallo. La dosis utilizada fue 1 cc.L⁻¹.

Para realizar cada una de las aplicaciones, se tomó en cuenta que la planta debía estar en un estado activo de intercambio foliar, es decir, en un instante en el cual podía lograr una buena absorción de la sustancia química. Para esto se optó por realizarlas en horarios donde la temperatura ambiental era más baja, ya que si existía una mayor, los estomas de las hojas se iban a cerrar para evitar la deshidratación dificultando el traspaso. Las primeras horas de la mañana y las últimas horas de la tarde fueron las más apropiadas.

2.2.2.2 Selección y corte de los explantes

El tipo de explante que fue utilizado en este estudio, es el denominado segmento uni-nodal obtenido de ramas jóvenes, el cual según el objetivo principal del trabajo que es la micropropagación y si lo que se quiere es explotar la brotación, es uno de los más recomendables y más utilizados *in vitro*.

Un segmento uni-nodal consiste en una yema axilar acompañada de una porción de tallo, que después de la siembra en un medio de cultivo, se transforma en un

vástago, realizándose los replicados cuando sean necesarios. Ya cuando se obtiene una cantidad suficiente de brotes, estos son enraizados y finalmente se realiza la transferencia al suelo (Pierik, 1990).

Se tomaron los brotes adventicios jóvenes de hortensia y se seleccionaron los segmentos nodales más cercanos al ápice, posteriormente se separaron las hojas dejando una porción de peciolo para proteger a la yema axilar, seguido se realizaron más cortes para dividir la rama en unidades nodales de un tamaño alrededor de 2 a 3 cm (Fig. 2.3). El número de unidades fue de 20 por frasco, con el fin de lograr que los desinfectantes tengan un buen contacto con los explantes en la etapa de desinfección.

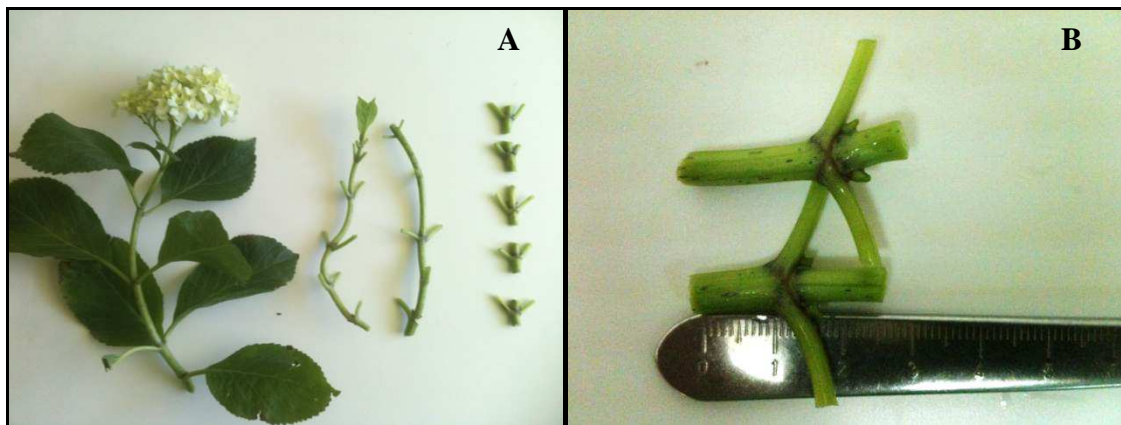


Figura 2.3 A. Selección y corte de los explantes de hortensia B. Segmentos nodales de *Hydrangea macrophylla*, cortados con una dimensión de 2 a 3 cm.

2.3 Fase de laboratorio

2.3.1 Localización geográfica del laboratorio

El Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la EPMOP-Q se encuentra situado dentro de las instalaciones del vivero de Cununyacu, por lo tanto se considera la misma ubicación geográfica. El laboratorio fue adecuado gracias a la gestión y financiamiento de la Embajada del Japón y del Municipio del DMQ. Los objetivos primordiales de su implementación son proveer de plantas ornamentales y agroforestales certificadas para reforestar los espacios públicos de la metrópoli; rescatar especies nativas patrimoniales; crear un banco de semillas y de conservación de germoplasma; capacitar, difundir, transferir conocimiento y tecnología (CIAC, 2008).

2.3.2 Etapa de desinfección de los explantes de *Hydrangea macrophylla*

Ya realizado el tratamiento preliminar de las plantas madre y la respectiva selección y corte de los explantes para su uso, se procedió a iniciar el proceso de desinfección para eliminar todos los patógenos presentes tanto endógena como exógenamente.

Para la desinfección, los explantes fueron colocados en frascos de vidrio de 200 mL, con una cantidad de 20 unidades por cada frasco.

Primero se les sometió a un lavado con agua durante 1 minuto, eliminando las partículas de tierra y otras impurezas de gran tamaño. Después se les sumergió en una combinación de agua potable con detergente y en un agitador orbital (Innova 2100) se los mantuvo durante 20 min, posteriormente se realizó lavados en agua potable para eliminar el detergente suplementado.

A continuación, bajo condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar (Streamline®) y usando instrumentos estériles, se procedió a sumergir a los explantes en etanol al 70% durante un minuto. Luego de eliminar el alcohol se aplicó clorox al 40% (hipoclorito de sodio al 2%) durante 10 min. Por último se lavaron a los explantes 3 veces con agua destilada estéril (fig. 2.4).



Figura 2.4 Material necesario para la desinfección de los segmentos nodales de *Hydrangea macrophylla* (agua estéril, alcohol al 70%, Clorox al 2%, gasa estéril).

Seguidamente y como complemento a la desinfección planteada, para controlar la contaminación endógena reportada en ensayos preliminares, en condiciones estériles se sembraron a los explantes en un medio de cultivo MS (Anexo D), suplementado con diferentes concentraciones de mezclas de antibióticos (kanamicina-estreptomicina) (0.08 mg.L^{-1} , 0.12 mg.L^{-1} , 0.16 mg.L^{-1} , 0.2 mg.L^{-1} , 0.3 mg.L^{-1} , 0.4 mg.L^{-1} , 0.5 mg.L^{-1}). El medio contenía las vitaminas de MS (Phytotechnology), 30 g.L^{-1} de sacarosa y 4 g.L^{-1} de phytigel (Sigma). Con la ayuda de un potenciómetro (Jenway), se ajustó el pH del medio a 5.8 ± 0.02 antes de añadir el gelificante. El medio de cultivo fue esterilizado durante 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ en una autoclave horizontal (Tuttnauer 2540 M).

En el caso de la preparación de los medios para los ensayos de desinfección y establecimiento se tuvo que colocar antibióticos, los cuales son de carácter termolábil, ya que al ser material biológico son susceptibles de desintegración al exponerse a altas temperaturas. Por esta razón no pueden ser autoclaveados y tienen que ser incorporados al medio en una cámara de flujo laminar.

Los antibióticos fueron filtrados bajo condiciones asépticas usando filtros Whatman modelo $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ PES filter Media 25 mm, antes de ser incorporados al medio de cultivo previamente esterilizado y enfriado.

El material vegetal se incubó en una sala cuya temperatura se mantuvo en $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Los resultados obtenidos de las pruebas con los antibióticos fueron evaluados mediante un diseño completamente al azar (DCA), por medio del cual se determinó la concentración de kanamicina y estreptomicina adecuada para el control de microorganismos en el medio. Las variables dependientes evaluadas en esta etapa fueron la contaminación, necrosis y viabilidad de los explantes en el medio de cultivo mientras que la variable independiente correspondió a la concentración de antibióticos que se adicionó.

Los tratamientos que el DCA arrojó fueron 7 correspondientes a las 7 concentraciones de antibióticos ensayados por cada uno (0.08 mg.L^{-1} , 0.12 mg.L^{-1} , 0.16

mg.L⁻¹, 0.2 mg.L⁻¹, 0.3 mg.L⁻¹, 0.4 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹), mostrados en la tabla 2.1. Por cada tratamiento se realizaron diez repeticiones.

Tabla 2.1 Tratamientos planteados para el DCA de la etapa de desinfección del cultivo *in vitro* de *Hydrangea macrophylla*.

TRATAMIENTOS	ANTIBIÓTICOS (mg.L ⁻¹)	
	KANAMICINA	ESTREPTOMICINA
T1	0.08	0.08
T2	0.12	0.12
T3	0.16	0.16
T4	0.2	0.2
T5	0.3	0.3
T6	0.4	0.4
T7	0.5	0.5

Se definió a la unidad experimental para el DCA de la etapa de desinfección como un tubo de ensayo con el explante cultivado en un medio MS adicionado con antibiótico que podía estar en diferentes concentraciones.

Las variables de respuesta para el DCA de la fase de desinfección correspondieron al porcentaje de unidades experimentales contaminadas, necrosadas y viables. El mejor tratamiento fue seleccionado en base al mayor número de explantes viables que pasaron a la siguiente fase. Estas variables fueron evaluadas mediante observación a los 7, 14, 21 y 28 días después de la siembra de los explantes. La tabla que ayudó al registro de los datos se la puede observar en el Anexo F.

$$\% \text{ Contaminación} = \frac{\text{Explantes contaminados} \times 100}{\text{Número total de explantes}}$$

$$\% \text{ Necrosis} = \frac{\text{Explantes necrosados} \times 100}{\text{Número total de explantes}}$$

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Explantes viables} \times 100}{\text{Número total de explantes}}$$

2.3.3 Etapa de establecimiento *in vitro* de los explantes de hortensia

Para la etapa de establecimiento se tuvo que volver a repetir todos los procesos anteriores, aplicando el mejor método de desinfección obtenido gracias al análisis previo. En esta fase los explantes desinfectados fueron sembrados en condiciones estériles en dos tipos de medio de cultivo, un MS convencional y un MS a la mitad de su concentración (MS/2), como se muestra en la figura 2.5 A. En ambos medios se adicionaron el RCV BAP (0 mg.L^{-1} , 0.25 mg.L^{-1} , 0.5 mg.L^{-1} , 0.75 mg.L^{-1} , 1 mg.L^{-1} , 1.25 mg.L^{-1}). Los medios fueron suplementados con vitaminas de MS, 0.12 mg.L^{-1} de kanamicina, 0.12 mg.L^{-1} de estreptomina, 30 g.L^{-1} de sacarosa y 4 g.L^{-1} de phytigel. Con la ayuda de un potenciómetro, se ajustó el pH del medio a 5.8 ± 0.02 antes de añadir el phytigel. El medio de cultivo fue esterilizado durante 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ en una autoclave horizontal. Los antibióticos filtrados fueron añadidos luego de autoclavar el medio de cultivo bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar.

El material vegetal se incubó en una sala cuya temperatura se mantuvo en $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad (figura 2.5 B).

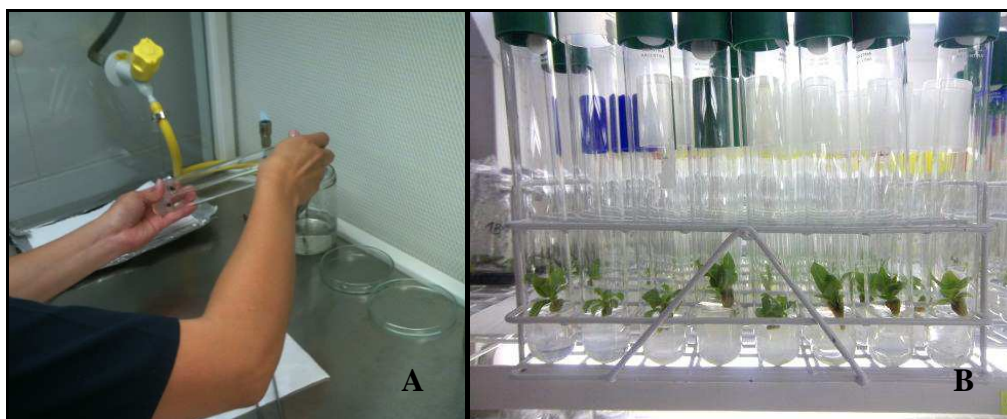


Figura 2.5 A. Proceso de siembra de los segmentos nodales de *Hydrangea macrophylla* en la etapa de establecimiento **B.** Incubación de los explantes.

Las concentraciones planteadas para el RCV BAP fueron propuestas en base al análisis de ensayos anteriores. Se eligió el rango en el cual se observó mejores resultados.

En la fase de introducción es importante analizar los cambios que provoca la adición de citoquininas ya que estas son las que ayudan a que se induzca la brotación de la yema axilar presente en el segmento nodal (Roca & Mroginsky, 1993).

Los datos generados de estos ensayos se analizaron mediante un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), por medio del cual se determinó la concentración de BAP y el medio de cultivo óptimo para el establecimiento de los explantes.

Las variables dependientes correspondieron a la longitud de vástago formado a partir de la yema axilar y a la contaminación y sobrevivencia de los mismos en el medio de cultivo, mientras que la variable independiente correspondió a la concentración de BAP agregado en el medio de cultivo.

Se utilizaron 6 concentraciones de BAP para cada medio de cultivo planteado (0 mg.L^{-1} , 0.25 mg.L^{-1} , 0.5 mg.L^{-1} , 0.75 mg.L^{-1} , 1 mg.L^{-1} , 1.25 mg.L^{-1}), generando un total de 12 tratamientos (Tabla 2.2). Se realizaron 10 repeticiones por cada uno.

Tabla 2.2 Tratamientos planteados para el DBCA en medio MS y MS/2 de la etapa de establecimiento del cultivo in vitro de *Hydrangea macrophylla*.

TRATAMIENTOS		BAP (mg.L^{-1})
MS	MS/2	
T1	T7	0
T2	T8	0.25
T3	T9	0.5
T4	T10	0.75
T5	T11	1
T6	T12	1.25

En la fase de establecimiento se definió a la unidad experimental para el DBCA como un tubo de ensayo con el explante previamente desinfectado cultivado en un medio MS o MS/2 adicionado con el regulador de crecimiento BAP que podía estar en diferentes concentraciones.

Las variables de respuesta para el DBCA fueron la longitud del vástago obtenido de la yema axilar, además del porcentaje de explantes contaminados y viables.

La longitud de los vástagos fue medida con una regla milimetrada, mientras que la contaminación y viabilidad se evaluó mediante observación. Todos los datos fueron recogidos a los 7, 14, 21 y 28 días después de la siembra de los explantes. La tabla que ayudó al registro de los datos se la puede observar en el Anexo G.

2.3.4 Etapa de propagación clonal de *Hydrangea macrophylla*

Con la ayuda del estudio previo de establecimiento, se logró determinar cuál era el medio de cultivo y la concentración de BAP más adecuada, con los que se lograba producir plántulas de mejores características. De esta manera se estableció una cantidad necesaria de explantes, para llevar a cabo el estudio de la siguiente fase, la de propagación.

Los brotes fueron cortados y preparados para su siembra (figura 2.6 A), en un medio de cultivo MS con vitaminas de gamborg a la mitad de su concentración (MSVG/2), suplementado con diferentes cantidades de citoquininas, BAP y KIN (0 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 1.5 mg.L⁻¹, 2 mg.L⁻¹, 3 mg.L⁻¹, 4 mg.L⁻¹, 6 mg.L⁻¹). Los medios fueron enriquecidos con 0.12 mg.L⁻¹ de kanamicina, 0.12 mg.L⁻¹ de estreptomina, 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 4 g.L⁻¹ de phytigel, 1.66 mg.L⁻¹ de AG₃ y 0.2 g.L⁻¹ de carbón activado. Con la ayuda de un potenciómetro, se ajustó el pH del medio a 5.8 ± 0.02 antes de añadir el phytigel. El medio de cultivo fue esterilizado durante 20 min a 121 °C en una autoclave horizontal. Los antibióticos filtrados fueron añadidos luego de autoclavar el medio de cultivo bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar.

El material vegetal se incubó en una sala cuya temperatura se mantuvo en 25 °C con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad (figura 2.6 B)

El medio MSVG/2, los RCV y sus concentraciones utilizadas, se plantearon debido a resultados obtenidos en análisis anteriores, con los cuales se mostró tenían mayor influencia en la propagación de *Hydrangea* y corroborados también en los estudios propuestos por Dahab (2007).



Figura 2.6 A. Preparación de los explantes de *Hydrangea macrophylla* previamente establecidos para su siembra en un medio de cultivo para propagación B. Incubación de los frascos de propagación.

En esta fase, los resultados obtenidos del estudio fueron analizados mediante un DBCA, por medio del cual se determinó la concentración de BAP o KIN óptima para la micropropagación de los explantes. Las variables dependientes correspondieron al número de brotes obtenidos por explante y a la contaminación y sobrevivencia de los mismos en el medio de cultivo, mientras que las variables independientes correspondieron a las concentraciones de BAP o KIN agregados en el medio de cultivo.

Los tratamientos que el DBCA produjo fueron 16, correspondientes a las 8 concentraciones de BAP y a las 8 concentraciones de KIN a ensayar (0 mg.L^{-1} , 0.5 mg.L^{-1} , 1 mg.L^{-1} , 1.5 mg.L^{-1} , 2 mg.L^{-1} , 3 mg.L^{-1} , 4 mg.L^{-1} , 6 mg.L^{-1}), las cuales se indican en la tabla 2.3. Por cada tratamiento se realizaron diez repeticiones.

Tabla 2.3 Tratamientos planteados para el DBCA de la etapa de propagación *in vitro* de *Hydrangea macrophylla*.

MEDIO DE CULTIVO MSVG/2			
TRATAMIENTOS	BAP (mg.L^{-1})	TRATAMIENTOS	KIN (mg.L^{-1})
T1	0	T9	0
T2	0.5	T10	0.5
T3	1	T11	1
T4	1.5	T12	1.5
T5	2	T13	2
T6	3	T14	3
T7	4	T15	4
T8	6	T16	6

En la micropropagación *in vitro*, la unidad experimental para el DBCA se definió como un frasco de 200 mL cultivado con un vástago previamente establecido, en un medio de cultivo MSVG/2 adicionado con la citoquinina BAP o KIN, que podía estar en diferentes concentraciones. Cada frasco contenía 2 repeticiones.

Para evaluar la micropropagación *in vitro*, las variables de respuesta del DBCA utilizadas fueron el número de brotes por unidad experimental y el porcentaje de contaminación y viabilidad. El número de brotes, la contaminación y viabilidad se evaluó mediante observación. Los datos de contaminación y viabilidad, así como los del número de los brotes se registraron a los 42 días después de la siembra en el medio de multiplicación. La tabla que ayudó al registro de los datos se la puede observar en el Anexo H.

2.3.5 Etapa de enraizamiento de los explantes de hortensia

La etapa final del estudio fue el enraizamiento, cada uno de los brotes obtenidos en la propagación representó una nueva plántula, las cuales pasaron a esta fase. Cuando un explante llega a tener raíces adventicias se puede decir que prácticamente se ha logrado obtener una vitroplanta.

Para estimular el enraizamiento de los explantes previamente propagados, a estos se los sembró en condiciones estériles en un medio de cultivo MS y un MS/2 (figura 2.7 A), con 0.2 g.L^{-1} de carbón activado, suplementado con diferentes concentraciones de auxina, AIB (0 mg.L^{-1} , 0.5 mg.L^{-1} , 1 mg.L^{-1} , 1.5 mg.L^{-1} , 2 mg.L^{-1} , 3 mg.L^{-1}). Los medios fueron enriquecidos con vitaminas de MS, 0.12 mg.L^{-1} de kanamicina, 0.12 mg.L^{-1} de estreptomina, 30 g.L^{-1} de sacarosa y 4 g.L^{-1} de phytigel. Con la ayuda de un potenciómetro, se ajustó el pH del medio a 5.8 ± 0.02 antes de añadir el gelificante. El medio de cultivo fue esterilizado durante 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ en una autoclave horizontal. Los antibióticos filtrados fueron añadidos luego de autoclavar el medio de cultivo bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar.

El material vegetal se incubó en una sala cuya temperatura se mantuvo en $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad (figura 2.7 B)



Figura 2.7 A. Siembra de los brotes de *Hydrangea macrophylla* obtenidos del proceso de propagación en un medio de cultivo de enraizamiento **B.** Incubación de los frascos de enraizamiento.

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante un DBCA, por medio del cual se determinó la concentración de AIB y el medio de cultivo óptimo para el enraizamiento de los explantes. Las variables dependientes correspondieron a las categorías planteadas respecto a la cantidad de la presencia de raíces obtenidas por explante, a la contaminación y sobrevivencia de los mismos en el medio de cultivo, mientras que la variable independiente correspondió a la concentración de AIB agregado en el medio de cultivo.

Los tratamientos que el DBCA generó fueron 12, correspondientes a las 6 concentraciones de AIB a ensayar por cada medio de cultivo (0 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 1.5 mg.L⁻¹, 2 mg.L⁻¹, 3 mg.L⁻¹), tal como se muestra en la tabla 2.4. Por cada tratamiento se realizaron diez repeticiones.

Tabla 2.4 Tratamientos planteados para el DBCA en medio MS y MS/2 de la etapa de enraizamiento del cultivo in vitro de *Hydrangea macrophylla*.

TRATAMIENTOS		AIB (mg.L ⁻¹)
MS	MS/2	
T1	T7	0
T2	T8	0.5
T3	T9	1
T4	T10	1.5
T5	T11	2
T6	T12	3

La unidad experimental para el DBCA de la fase de enraizamiento consistió en un frasco de 200 mL, cultivado con un explante previamente propagado en un medio de cultivo MS o MS/2 con carbón activado adicionado con la auxina AIB en diferentes concentraciones. Cada frasco contenía 2 repeticiones.

Para verificar el efecto de la adición de AIB en la fase de enraizamiento, las variables de respuesta fueron el porcentaje de contaminación y viabilidad de los explantes, además de las categorías planteadas para la presencia de raíces (figura 2.8):

1. Nula (cero raíces)
2. Poca (uno a cinco raíces)
3. Abundante (seis a diez raíces)
4. Muy abundante (más de diez raíces)

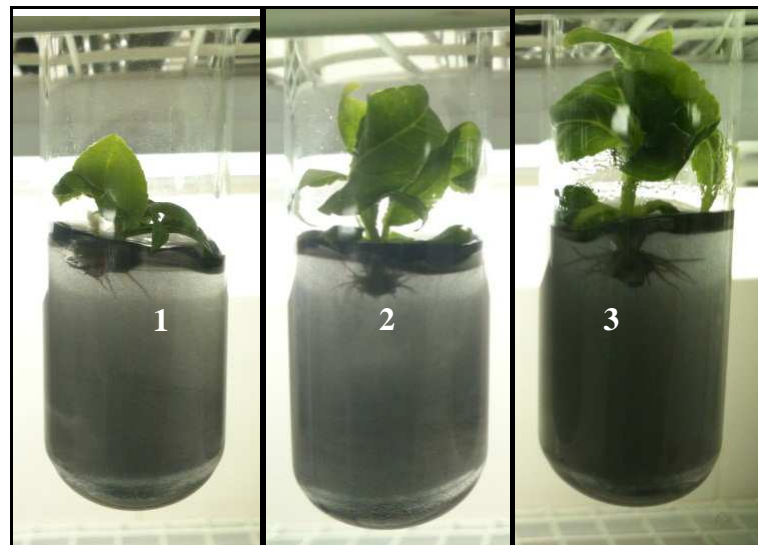


Figura 2.8 Categorías planteadas para la etapa de enraizamiento de *Hydrangea macrophylla* **1.** Poca presencia **2.** Abundante presencia **3.** Muy abundante presencia.

La presencia de raíz, contaminación y viabilidad se evaluó mediante observación y conteo del número de raíces. Los datos fueron evaluados a los 28 días después de la siembra de los explantes en el medio de enraizamiento. La tabla que ayudó al registro de los datos se la puede observar en el Anexo I.

2.4 Análisis de datos

Los análisis estadísticos de cada uno de los diseños experimentales planteados para cada una de las etapas, se evaluaron utilizando el software estadístico Infostat versión 2010 y R. Además también se uso Microsoft Excel correspondiente a Office 2010.

2.5 Periodo de tiempo de investigación

Fecha de inicio: 1 de febrero del 2012

Fecha de término: 1 de diciembre del 2012

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Ensayos preliminares

En la primera prueba de diagnóstico realizada en base a una desinfección muy leve, se pudo constatar que el ensayo presentó un 100% de contaminación, razón por la cual se comenzó a probar con concentraciones de desinfectantes mucho más altas. Se logró la eliminación de los patógenos exógenos sin embargo se presentó una infección de tipo endógena (figura 3.1).

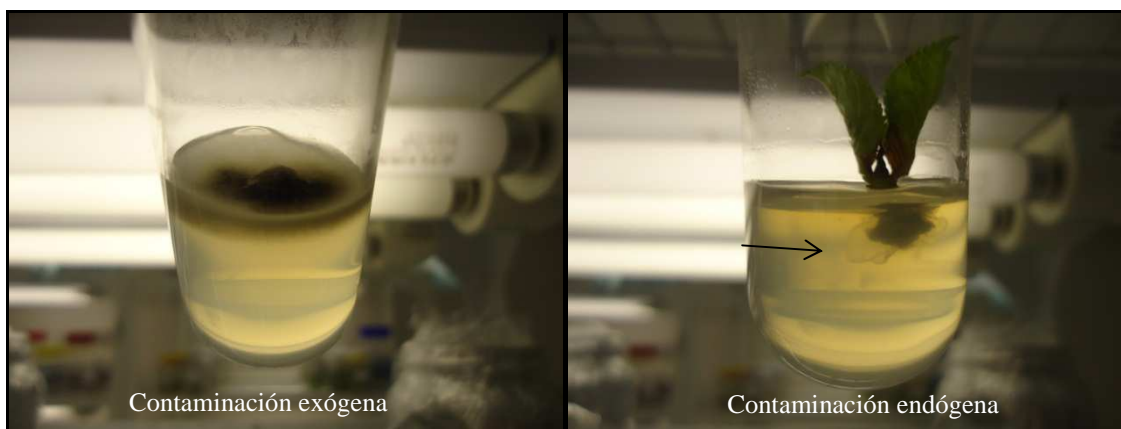
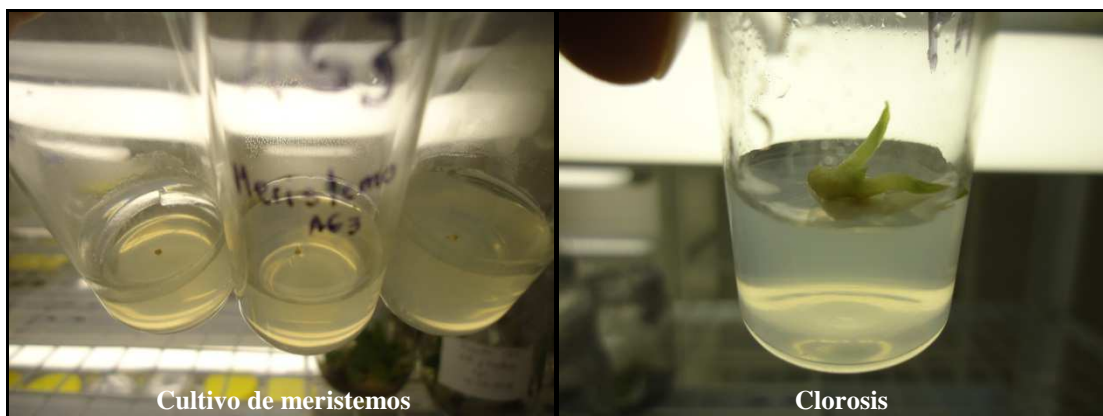


Figura 3.1 Tipos de contaminación observadas en los ensayos preliminares de *Hydrangea macrophylla*.

Debido a la presencia de este fenómeno, se intentó realizar la introducción de esta especie mediante el cultivo de meristemos (figura 3.2) pero de todas maneras se registró una serie de inconvenientes como necrosis, clorosis y contaminación.



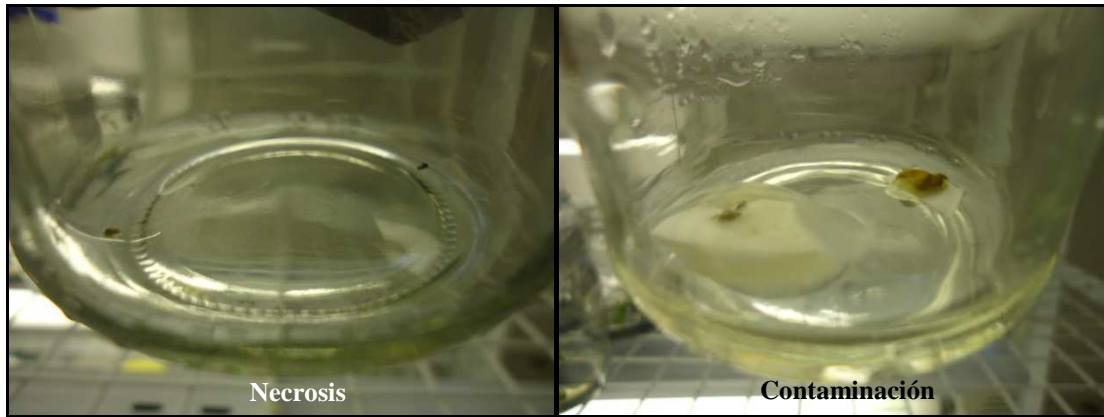


Figura 3.2 Problemas encontrados en el cultivo de meristemos de *Hydrangea macrophylla*.

Debido al lento crecimiento de los meristemos y por las barreras que se presentaron en el establecimiento de este tipo de explante, se decidió continuar la investigación utilizando segmentos nodales, los cuales en ensayos posteriores demostraron tener un alto porcentaje de viabilidad en su introducción.

3.2 Etapa de desinfección de los explantes de *Hydrangea macrophylla*

En este caso, por medio de estudios preliminares se pudo comprobar la presencia de contaminación de los explantes de tipo endógena que no se logró controlar con ninguno de los tratamientos utilizados con desinfectantes comúnmente usados, razón por la cual se procedió a utilizar antibióticos en el medio de cultivo para ayudar con el control de la contaminación.

Los tratamientos planteados en esta fase fueron en total 7, los cuales se detallaron en la parte metodológica del trabajo. Los resultados fueron evaluados mediante observación a los 7, 14, 21 y 28 días después de la siembra de los explantes, por medio de la ayuda de una tabla (Anexo F).

3.2.1 Contaminación, viabilidad y necrosis

Como se puede observar en la tabla 3.1, los porcentajes de viabilidad, contaminación y necrosis fueron muy variables, obteniéndose el mayor porcentaje de viabilidad, del 90%, en el T2 (0.12 mg.L⁻¹), mientras que el menor se logró en el T6 (0.4

mg.L⁻¹) con un 30%. Con respecto a la variable contaminación el T6 (0.4 mg.L⁻¹) reportó el mayor porcentaje (70%), y el T2 (0.12 mg.L⁻¹) por otro lado mostró estar libre de contaminación. Por último, la tabla indicó que no existe un alto índice de prevalencia de la variable necrosis en todos los tratamientos, solo el 2 y el 5 obtuvieron un 10% de necrosis.

Tabla 3.1 Porcentajes de necrosis, contaminación y viabilidad, correspondientes a cada tratamiento con antibióticos en medio MS, de la etapa de desinfección.

Tratamiento			Necrosis (%)	Contaminación (%)	Viabilidad (%)
	Kanamicina (mg.L ⁻¹)	Estreptomicina (mg.L ⁻¹)			
T1	0.08	0.08	0	30	70
T2	0.12	0.12	10	0	90
T3	0.16	0.16	0	30	70
T4	0.2	0.2	0	20	80
T5	0.3	0.3	10	40	50
T6	0.4	0.4	0	70	30
T7	0.5	0.5	0	20	80

Los porcentajes de cada una de las variables se pueden observar de mejor manera en la figura 3.3, que se muestra a continuación:

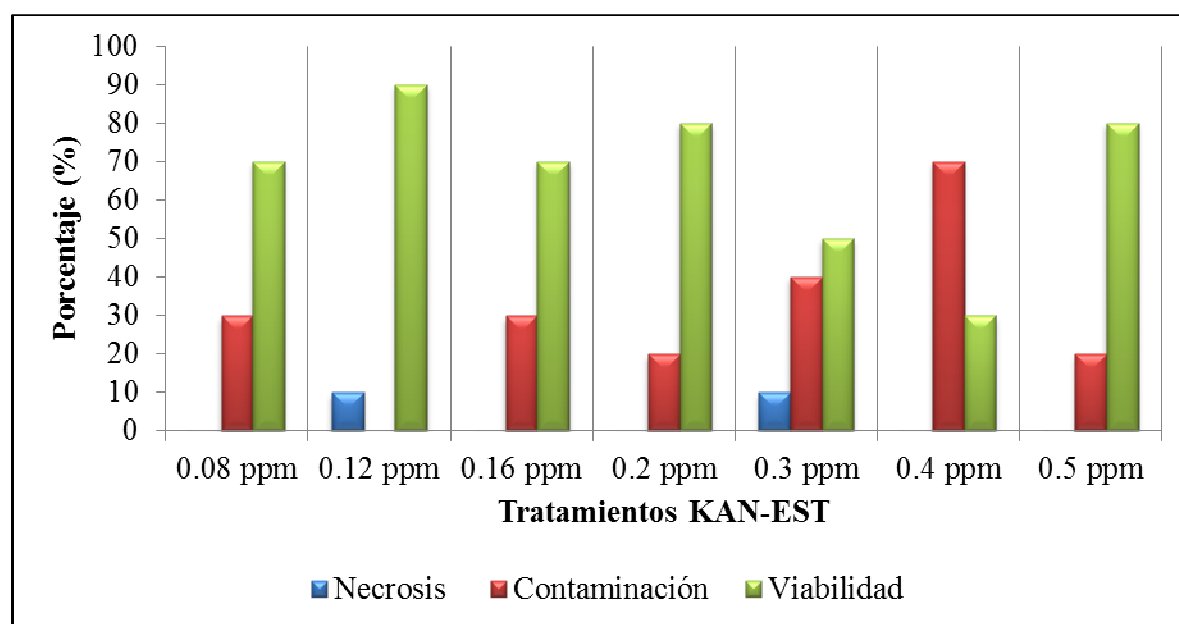


Figura 3.3 Porcentajes de necrosis, contaminación y viabilidad, correspondientes a cada tratamiento con antibióticos en medio MS, de la etapa de desinfección.

Debido a que los datos obtenidos de contaminación, viabilidad y necrosis no se ajustaron a la normalidad, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico mediante el método de Kruskal Wallis (Anexo J), por medio del cual se demostró que existe una diferencia significativa de la variable viabilidad con respecto a cada uno de los tratamientos ($p < 0.0001$), siendo el T2 (0.12 mg.L^{-1}) el de mayor media (0.98) y el T6 (0.4 mg.L^{-1}) el de menor media (0.40).

Respecto a la variable contaminación, el análisis mostró que existe una diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.0001$), siendo el T6 (0.4 mg.L^{-1}) el de mayor media (0.6) y el T2 (0.12 mg.L^{-1}) el de menor media (0.00).

Por último la prueba demostró que no existe una diferencia significativa de la variable necrosis respecto a los tratamientos planteados ($p = 0.5415$).

3.2.2 Porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica

Se realizó un análisis respecto al tipo de contaminación de mayor prevalencia, para esto se determinó los porcentajes de incidencia de contaminación de origen fúngica y de origen bacteriana del total de unidades experimentales perdidas de cada uno de los tratamientos. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Porcentajes de contaminación de tipo fúngica y bacteriana en cada uno de los tratamientos de desinfección.

	Tratamiento		Contaminación	
	Kanamicina (mg.L^{-1})	Estreptomicina (mg.L^{-1})	Hongo (%)	Bacteria (%)
T1	0.08	0.08	66.67	33.33
T2	0.12	0.12	0	0
T3	0.16	0.16	100	0
T4	0.2	0.2	100	0
T5	0.3	0.3	75	25
T6	0.4	0.4	100	0
T7	0.5	0.5	50	50

Como se resume en la tabla, el tipo de contaminación que se presentó en mayor porcentaje fue de tipo fúngica, la cual se encontró en casi todos los tratamientos, con excepción del T2 (0.12 mg.L⁻¹).

Los tratamientos con mayor contaminación por hongos, con el 100% de prevalencia fueron el T3 (0.16 mg.L⁻¹), T4 (0.2 mg.L⁻¹) y T6 (0.4 mg.L⁻¹), seguido por el T5 (0.3 mg.L⁻¹) con el 75% y el T1 (0.08 mg.L⁻¹) con el 66.67%.

El tratamiento que mostró menor contaminación fúngica fue el T7 (0.5 mg.L⁻¹) con el 50% de aparición, junto con el T2 (0.12 mg.L⁻¹) que no tuvo la presencia de hongos.

En el caso de la contaminación bacteriana la incidencia fue muy baja en todos los tratamientos, el T7 (0.5 mg.L⁻¹) mostró un 50%, el T1 (0.08 mg.L⁻¹) un 33.33% y el T5 (0.3 mg.L⁻¹) un 25%. El resumen de los porcentajes del tipo de contaminación se muestra en la figura 3.4.

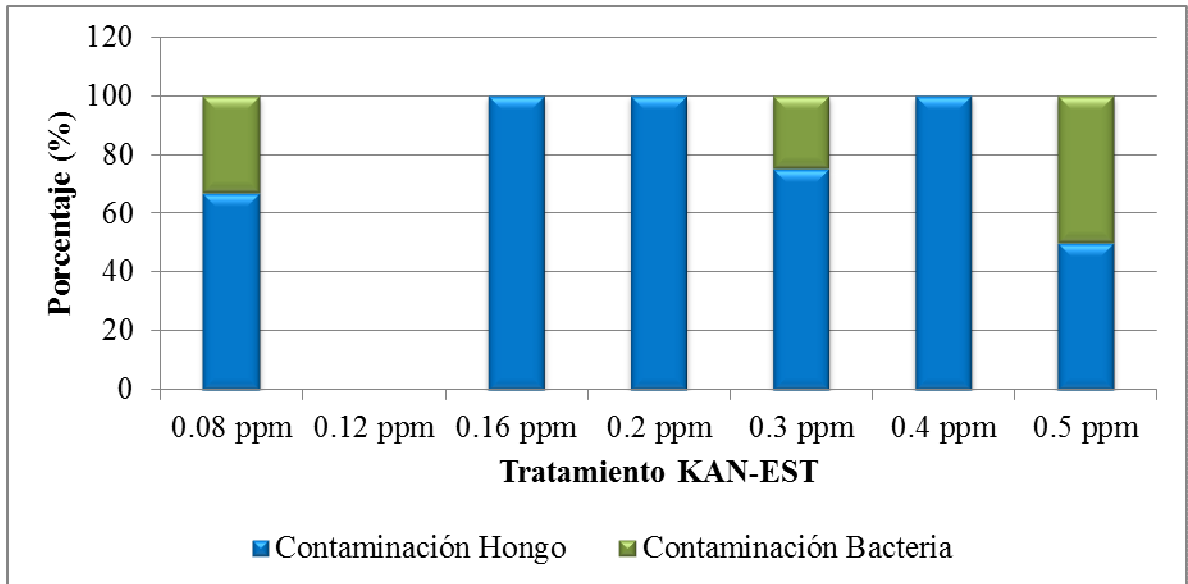


Figura 3.4 Porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica de cada uno de los tratamientos planteados en la fase de desinfección.

Si se realiza un análisis global del total de explantes descartados, ya no por tratamiento, de los tipos de contaminación vamos a corroborar que existe más la

presencia de contaminación de tipo fúngica (85.71%), que de tipo bacteriana (14.28%), como se puede denotar en la tabla 3.3 y la figura 3.5.

Tabla 3.3 Porcentajes globales de contaminación fúngica y bacteriana del total de explantes descartados de la etapa de desinfección.

Descartados	Hongo	Bacteria
100	85.71	14.29

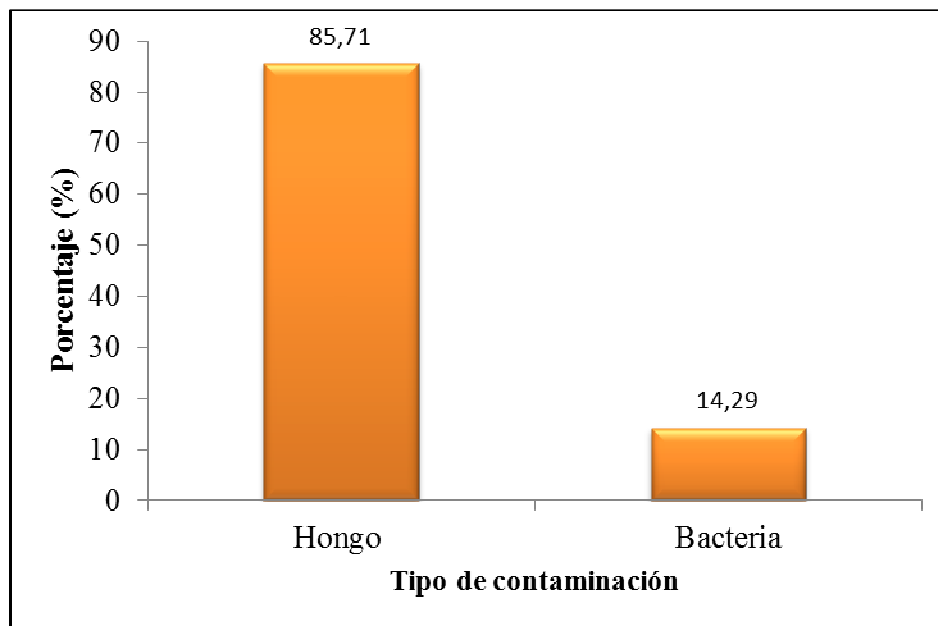


Figura 3.5 Porcentajes globales de contaminación fúngica y bacteriana del total de explantes descartados de la etapa de desinfección.

3.2.3 Longitud de los brotes

El objetivo de este análisis fue determinar si los tratamientos de desinfección con la adición de antibióticos, influían de alguna manera con la longitud de los brotes obtenidos. En este caso los datos alcanzados de longitud no se ajustaron a la normalidad (Figura 3.6), por lo tanto se realizó un ANOVA no paramétrico, mediante el método de Kruskal Wallis, para establecer si existía diferencias entre los tratamientos (Anexo K).

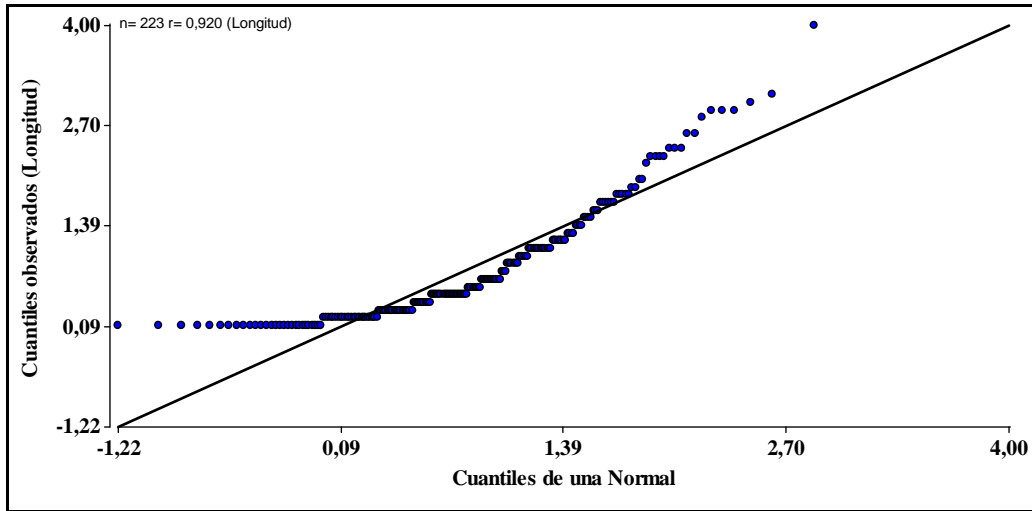


Figura 3.6 Distribución no paramétrica de la variable longitud de la fase de desinfección.

Los resultados del ANOVA mostraron que existía una diferencia significativa de la variable longitud respecto a los tratamientos ($p < 0.0001$), en donde el T7 (0.5 mg.L^{-1}) obtuvo la mayor media de crecimiento (1.56 cm), mientras que el T3 (0.16 mg.L^{-1}) obtuvo la menor (0.23 cm), como se puede observar en la figura 3.7.

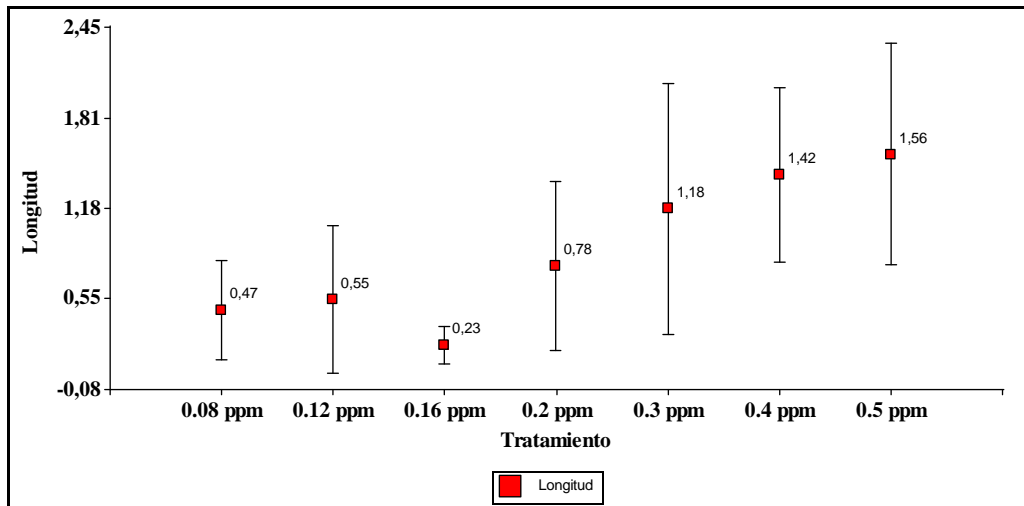


Figura 3.7 Medias y desviaciones estándar de la variable longitud de cada uno de los tratamientos de desinfección al final del ensayo.

3.2.4 Análisis costo-beneficio de la etapa de desinfección

Como se determinó en los análisis anteriores, según el porcentaje de contaminación y necrosis, el T2 (0.12 mg.L^{-1}) fue el que demostró tener un menor

porcentaje de afectación. Sin embargo, con respecto a la variable longitud de los brotes, el T5 (0.50 mg.L^{-1}), fue el que alcanzó la mayor media de crecimiento (1.56 cm). Por lo tanto, para complementar estos resultados se vio necesario realizar un estudio costo-beneficio para elegir el mejor tratamiento en la etapa de desinfección.

El costo de producción en el laboratorio de Micropropagación Vegetal de la UEP-DMQ, se encuentra alrededor de \$4000 por cada 10000 plantas elaboradas, esto quiere decir que por cada vitroplanta se invierte un total de \$0.40.

En este estudio, si se tomara en cuenta el tratamiento de desinfección 2 (0.12 mg.L^{-1}), se tendría una pérdida de una unidad experimental por cada diez y en el caso de que se llegara a producir una cantidad de 10000 plantas se perdería una totalidad de 1000 unidades en el establecimiento.

Por otro lado a pesar de que el T5 (0.5 mg.L^{-1}) generó la mayor media de crecimiento (1.56 cm), reportó la pérdida de 2 explantes por cada 10 repeticiones por necrosis y contaminación; esto quiere decir que si se produciría 10000 plantas se llegaría a perder 2000 unidades en el establecimiento.

Si se traslada las unidades experimentales eliminadas de ambos tratamientos a su equivalencia monetaria, se resumiría que en el T2 (0.12 mg.L^{-1}), se perdería una cantidad de \$400 por cada 10000 plantas producidas y en el caso del T5 (0.5 mg.L^{-1}) se perdería una totalidad de \$800. El resumen de este análisis se muestra en la tabla 3.4 y la figura 3.8.

Tabla 3.4 Análisis de costo-beneficio del T2 y T5 de la etapa de desinfección.

Tratamiento	Perdidas por contaminación y necrosis por cada 10 repeticiones	Media de crecimiento	Costo de producción por explante (\$)	Perdida total de explantes en 10000 unidades producidas	Perdida total monetaria en 10000 unidades producidas (\$)
T2 (0.12 mg.L^{-1})	1	0.55	0.4	1000	400
T5 (0.5 mg.L^{-1})	2	1.56	0.4	2000	800

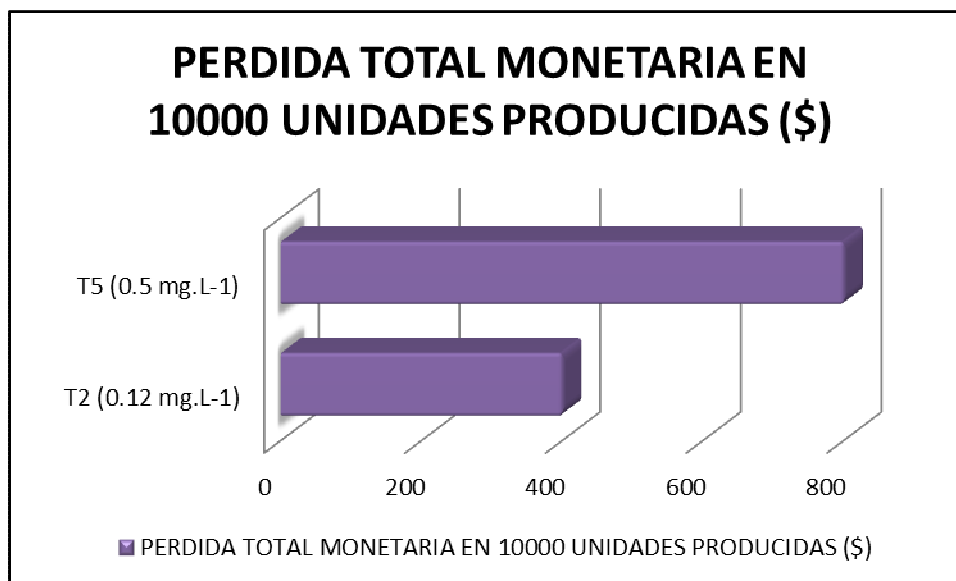


Figura 3.8 Análisis de costo-beneficio del T2 y T5 de la etapa de desinfección.

El T2 (0.12 mg.L⁻¹) a pesar de no ser el que genera mayor crecimiento vegetativo de los brotes, es el que menores costos de producción arroja para el cultivo *in vitro* de *Hydrangea macrophylla*.

3.3 Etapa de establecimiento *in vitro* de los explantes de hortensia

Los explantes previamente desinfectados fueron sembrados en dos tipos de medios, un MS y otro MS/2. En ambas formulaciones se adicionaron el RCV BAP (0 mg.L⁻¹, 0.25 mg.L⁻¹, 0.5 mg.L⁻¹, 0.75 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 1.25 mg.L⁻¹), generando un total de 12 tratamientos, los cuales fueron detallados en la parte metodológica del trabajo. Los datos fueron reportados a los 7, 14, 21 y 28 días después de la siembra de los explantes. La tabla que ayudó al registro de los datos se la puede observar en el Anexo G.

3.3.1 Porcentaje de contaminación y viabilidad

Con el propósito de comprobar la eficiencia del proceso de desinfección complementado con antibióticos, previamente definido, se realizó un análisis de porcentajes de contaminación y viabilidad existentes en esta etapa.

Como se puede observar en la tabla 3.5, la contaminación tuvo la misma incidencia en el experimento en general, tanto en el medio MS como en el MS/2, demostrando que no va a existir diferencias significativas y que el medio no es un factor que influye en el ensayo en esta fase.

De la misma manera, existió una homogeneidad de los porcentajes de contaminación y viabilidad en los tratamientos que tienen las mismas concentraciones de BAP, en medio MS y MS/2.

Tabla 3.5 Porcentajes de contaminación y viabilidad en los diferentes tratamientos, en medio MS y MS/2, en la fase de establecimiento.

Tratamientos		Contaminación (%)	Viabilidad (%)	Tratamientos		Contaminación (%)	Viabilidad (%)
Medio MS				Medio MS/2			
BAP (mg.L ⁻¹)				BAP (mg.L ⁻¹)			
T1	0	20	80	T7	0	20	80
T2	0.25	10	90	T8	0.25	10	90
T3	0.5	0	100	T9	0.5	0	100
T4	0.75	10	90	T10	0.75	10	90
T5	1	0	100	T11	1	0	100
T6	1.25	0	100	T12	1.25	0	100

En ambos medios de cultivo, el porcentaje más alto de contaminación se encontró en el T1 (0 mg.L⁻¹) y en el T7 (0 mg.L⁻¹), respectivamente, reportándose un 20%, seguidos de los tratamientos 2 y 8 (0.25 mg.L⁻¹), 4 y 10 (0.75 mg.L⁻¹) en los cuales se registró un 10% de contaminación. Los tratamientos 3 y 9 (0.5 mg.L⁻¹), 5 y 11 (1 mg.L⁻¹), 6 y 12 (1.25 mg.L⁻¹) no presentaron ningún tipo de contaminación (figura 3.9).

Como se confirma con la figura 3.9, el porcentaje de contaminación fue relativamente muy bajo en todo el ensayo de establecimiento, quedando comprobado que el protocolo de desinfección planteado fue el adecuado y apto para continuar con el proceso.

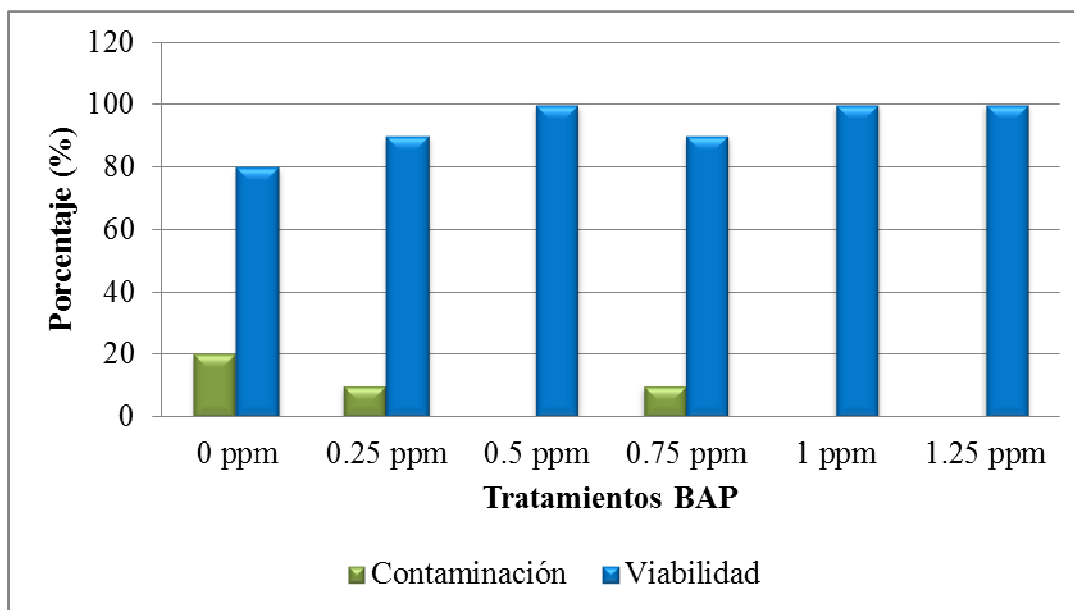


Figura 3.9 Porcentajes de contaminación y viabilidad en los diferentes tratamientos, en el medio MS y MS/2, en la fase de establecimiento.

3.3.2 Longitud de los brotes

En esta etapa la variable de respuesta, longitud de los brotes es muy trascendental ya que el RCV BAP, que es el que genera el diseño planteado, induce la brotación y hace que la yema axilar se desarrolle. Las plántulas que llegaron a tener un mayor crecimiento vegetativo, fueron las que demostraron tener una mejor respuesta a cierta concentración de la fitohormona.

En el caso de los resultados obtenidos en el medio MS, se pudo observar que los datos de longitud conseguidos por cada tratamiento no se ajustaban a la normalidad, como se puede denotar en la figura 3.10, por lo tanto, se procedió a realizar un ANOVA no paramétrico utilizando para ello el método de Kruskal Wallis, para determinar si existía una diferencia significativa de la variable longitud, respecto a los tratamientos propuestos.

El resultado del ANOVA (Anexo L), demostró que existe una diferencia significativa de la variable longitud respecto a los tratamiento plantados ($p < 0.0001$). La mayor media de crecimiento (1.61 cm) se alcanzó en el T3 (0.5 mg.L^{-1}) y la menor media (0.79 cm) se consiguió en el T6 (1.25 mg.L^{-1}).

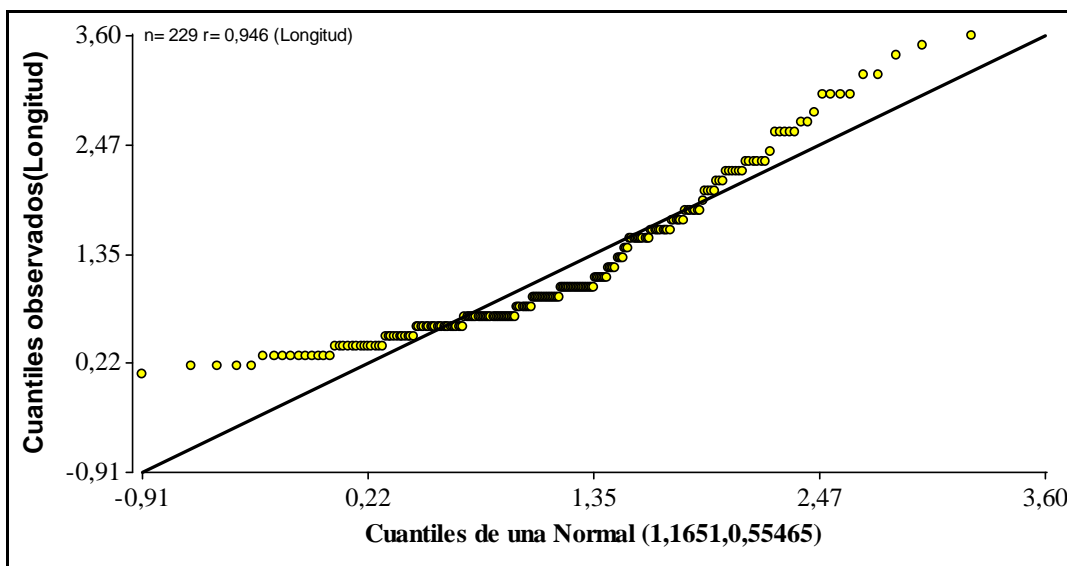


Figura 3.10 Distribución no paramétrica de la variable longitud de los tratamientos propuestos en el medio MS de la fase de establecimiento.

La evolución de las medias de crecimiento por cada semana y la desviación estándar de cada tratamiento se las puede observar en la figura 3.11. Mientras que las medias globales, desviaciones estándar, máximos y outliers de cada tratamiento se las puede observar en la figura 3.12.

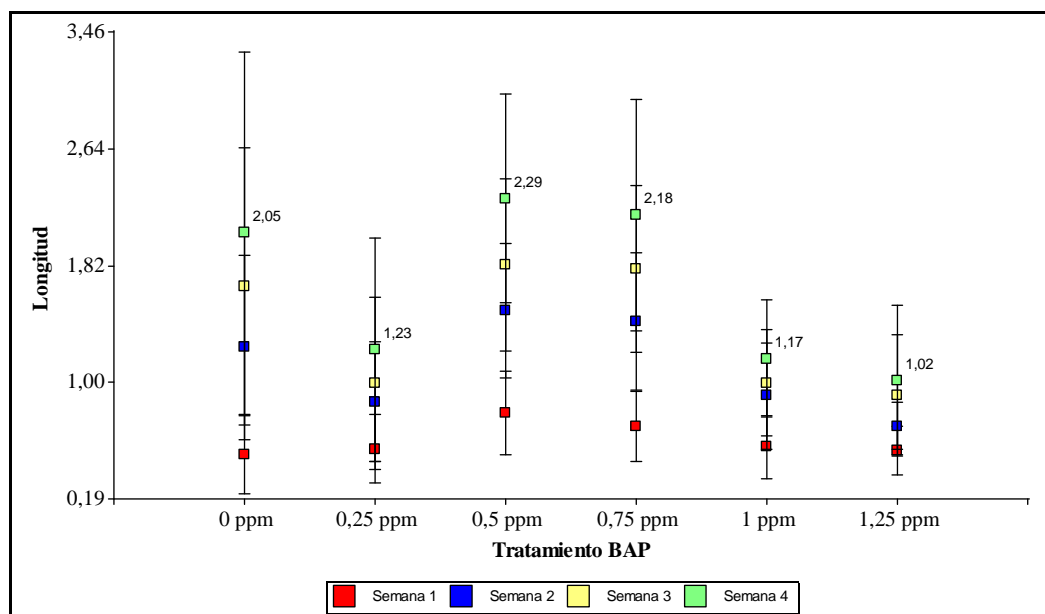


Figura 3.11 Evolución de las medias de crecimiento y desviaciones estándar por cada semana de cada uno de los tratamientos propuestos en el medio MS de la fase de establecimiento.

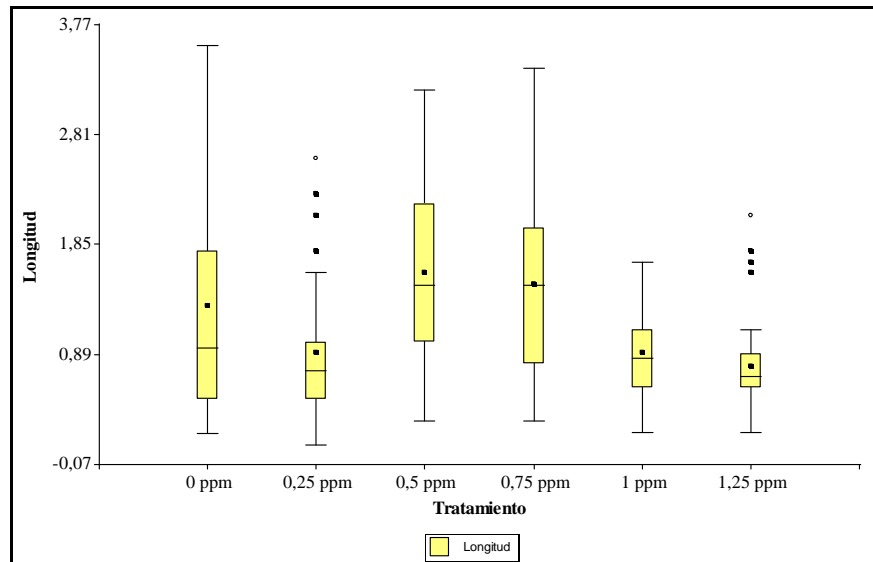


Figura 3.12 Medias globales, desviaciones estándar, máximos, mínimos y outliers de cada tratamiento propuesto en el medio MS de la etapa de establecimiento.

Por otro lado, en los datos obtenidos de longitud de los tratamientos propuestos en medio MS/2, se observó de la misma manera que no cumplían con la normalidad (figura 3.13), entonces también se les aplicó un ANOVA no paramétrico por el método de Kruskal Wallis, por medio del cual se investigó las diferencias significativas de la variable longitud respecto a los tratamientos.

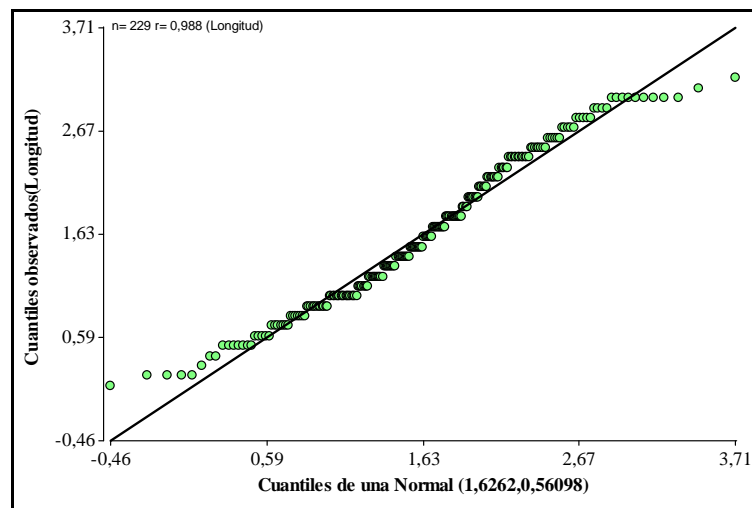


Figura 3.13 Distribución normal de la variable longitud de los tratamientos propuestos en el medio MS/2 de la fase de establecimiento.

Los resultados del ANOVA demostraron que no existía una diferencia significativa de la variable longitud respecto a los tratamientos planteados ($p=0.1113$)

(Anexo M). Para complementar el ANOVA, de la misma manera se recreó la evolución de las medias de crecimiento por semana de cada tratamiento en MS/2 (figura 3.14).

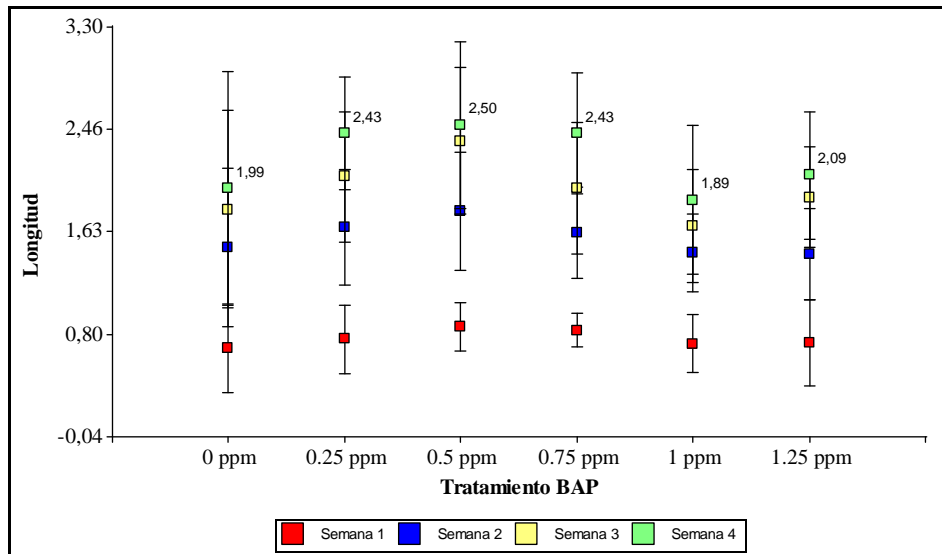


Figura 3.14 Evolución de las medias de crecimiento y desviaciones estándar por cada semana de cada uno de los tratamientos propuestos en el medio MS/2 de la fase de establecimiento.

Las medias globales y las desviaciones estándar de cada tratamiento (figura 3.15) ayudaron a resaltar la no existencia de diferencias significativas.

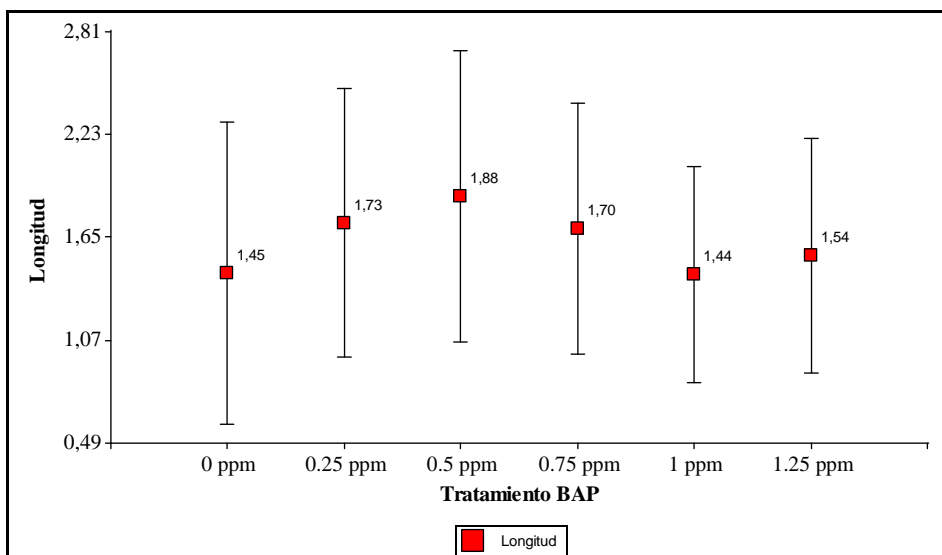


Figura 3.15 Medias de crecimiento globales y desviaciones estándar de cada uno de los tratamientos propuestos en medio MS a la mitad de su concentración de la fase de establecimiento.

El T9 (0.5 mg.L^{-1}) mostró tener la mayor media de crecimiento (1.88 cm), mientras que el T11 (1 mg.L^{-1}) obtuvo la menor media de crecimiento (1.44 cm).

Ya realizado el análisis estadístico para cada uno de los medios planteados en esta fase por separado, se procedió a realizar un estudio para poder determinar si el medio de cultivo usado ya sea MS o MS/2, tenían alguna influencia en la variable longitud (Anexo E parte A). Para esto se realizó un ANOVA no paramétrico por el método de Kruskal Wallis, ya que los datos de longitud como ya se mencionó no se ajustaban a la normalidad.

Los resultados del ANOVA, demostraron que existía una diferencia significativa de la variable longitud respecto al medio de cultivo ($p < 0.0001$), obteniendo una media de crecimiento para el medio MS de 1.17 cm y para el medio MS/2 de 1.63 cm (Anexo N).

En la figura 3.16 se puede visualizar de mejor manera la diferencia significativa existente de la variable longitud respecto al medio de cultivo.

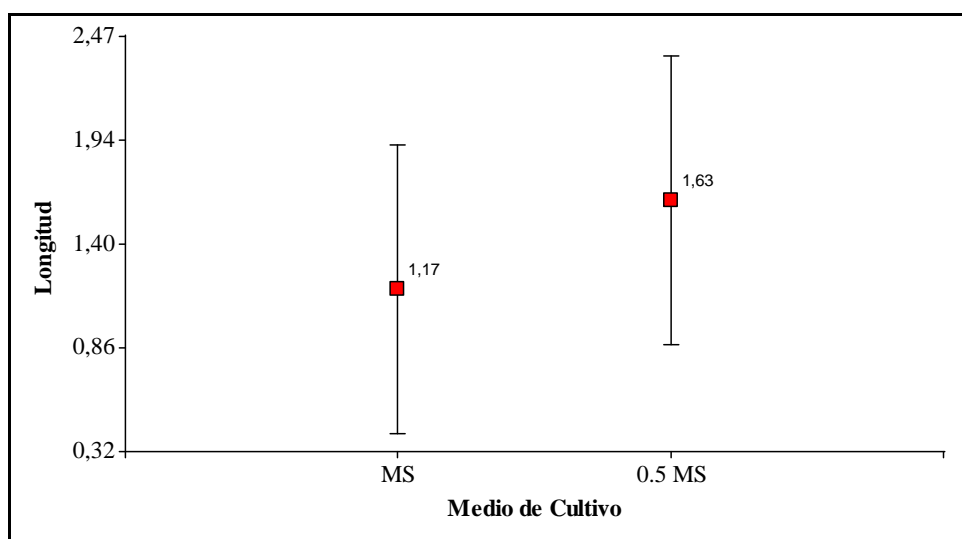


Figura 3.16 Medias de crecimiento globales y desviaciones estándar en el medio de cultivo MS y MS a la mitad de su concentración de la etapa de establecimiento.

Finalmente como complemento a todos los análisis planteados en esta fase, se realizó un modelo lineal general y mixto de todos los datos conseguidos, los cuales fueron examinados mediante pruebas LSD de Fisher. La influencia e interacción de los

factores medio, evaluación y tratamiento respecto a la variable longitud fueron procesados en este modelo (Anexo O).

La prueba LSD para el factor medio de cultivo confirmó lo que el ANOVA anteriormente planteado arrojó, es decir la existencia de diferencia significativa, con la formación de dos grupos (Anexo O, parte A).

Respecto al factor evaluación, la prueba LSD dio como resultado la existencia de 4 grupos estadísticamente diferentes (Anexo O, parte B).

En el caso del estudio del factor tratamiento, se denotó la formación de tres grupos estadísticamente diferentes, en donde el tratamiento de 0.5 mg.L^{-1} en ambos medios fue el que obtuvo la mayor media de crecimiento (1.74 cm) y el tratamiento de 1.25 mg.L^{-1} la menor media de 1.17 cm (Anexo O, parte C).

Mediante la prueba LSD se analizó la interacción del medio de cultivo y la evaluación, obteniendo la conformación de 6 grupos significativamente diferentes, de los cuales la mayor media de crecimiento (2.22 cm) se obtuvo en la cuarta semana de evaluación del medio de cultivo MS/2 (Anexo O, parte D).

Por último y como la interacción más importante se evaluaron los factores medio-tratamiento respecto a la longitud. La LSD realizada resaltó la disposición de 4 grupos significativamente diferentes, en donde la combinación del medio de cultivo MS/2 más 0.5 mg.L^{-1} de BAP mostró tener la mayor media de crecimiento (1.88 cm) y la combinación MS más 1.25 mg.L^{-1} de BAP denotó la menor media de 0.79 cm (Anexo O, parte E).

3.4 Etapa de propagación clonal de *Hydrangea macrophylla*

Como se mencionó en la parte metodológica, en esta etapa se sembraron los explantes previamente establecidos en un medio de cultivo MSVG/2, suplementado con BAP y KIN (0 mg.L^{-1} , 0.5 mg.L^{-1} , 1 mg.L^{-1} , 1.5 mg.L^{-1} , 2 mg.L^{-1} , 3 mg.L^{-1} , 4 mg.L^{-1} , 6 mg.L^{-1}), generando un total de 16 tratamientos. Los resultados fueron reportados por medio de observación a los 42 días después de la siembra.

3.4.1 Porcentaje de contaminación y viabilidad

A pesar de haber constatado el efecto positivo de la desinfección de los explantes antes de su introducción, esto no asegura que el cambio de las unidades experimentales de la fase de establecimiento a la de propagación esté libre de la presencia de infecciones, ya que se pueden cometer errores en la manipulación. Los resultados de contaminación que se reportaron en esta etapa se resumen en la tabla 3.6.

Tabla 3.6 Porcentajes de contaminación y viabilidad en la etapa de propagación *in vitro* de *Hydrangea macrophylla*.

Tratamientos		Contaminación (%)	Viabilidad (%)	Tratamientos		Contaminación (%)	Viabilidad (%)
Medio MSVG/2 BAP (mg.L ⁻¹)				Medio MSVG/2 KIN (mg.L ⁻¹)			
T1	0	10	90	T9	0	20	80
T2	0.5	20	80	T10	0.5	10	90
T3	1	10	90	T11	1	30	70
T4	1.5	20	80	T12	1.5	10	90
T5	2	20	80	T13	2	10	90
T6	3	10	90	T14	3	20	80
T7	4	10	90	T15	4	20	80
T8	6	20	80	T16	6	10	90

Como se puede observar existe una homogeneidad de los porcentajes tanto en los tratamientos con BAP como con KIN, obteniéndose en la mayoría entre un 10% y 20% de contaminación, sin embargo el mayor porcentaje de contaminación se presentó en el T11 (1 mg.L⁻¹ de KIN) con un 30%, mientras que en el resto de tratamientos la presencia de este fenómeno fue relativamente bajo, por lo cual se verificó que el procedimiento y la manipulación de los explantes establecidos que pasaron a esta etapa fueron los adecuados.

En la figura 3.17 se denota que la viabilidad predomina sobre el índice de contaminación.

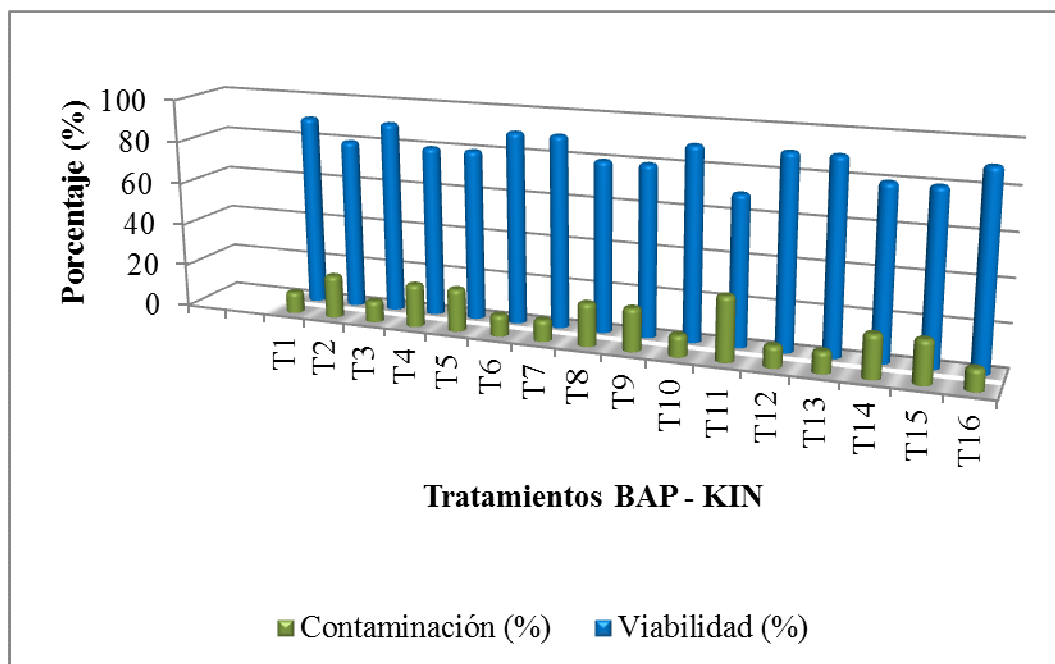


Figura 3.17 Porcentajes de contaminación y viabilidad de los tratamientos planteados en la etapa de propagación de *Hydrangea macrophylla*.

3.4.2 Número de brotes

El objetivo principal de la etapa de propagación es obtener la mayor cantidad de clones por cada explante previamente establecido, es por ello que este indicador es primordial para conocer la eficiencia del proceso. Los resultados de la cantidad de brotes obtenidos en cada tratamiento, se los integró en la tabla 3.7.

Tabla 3.7 Número de brotes obtenidos en la etapa de propagación de *Hydrangea macrophylla*.

Tratamientos		Número de Brotes	Tratamientos		Número de Brotes
Medio MSVG/2			Medio MSVG/2		
BAP (mg.L ⁻¹)			KIN (mg.L ⁻¹)		
T1	0	9	T9	0	8
T2	0.5	14	T10	0.5	9
T3	1	11	T11	1	7
T4	1.5	13	T12	1.5	9
T5	2	8	T13	2	9
T6	3	16	T14	3	8
T7	4	24	T15	4	12
T8	6	11	T16	6	17

Como se puede examinar, el mayor número de brotes se alcanzó en el T7 (24 brotes), demostrando que la cantidad adecuada de BAP es de 4 mg.L^{-1} para la propagación de *Hydrangea macrophylla* (Anexo E parte B). Todo lo contrario se observó en los tratamientos 9 al 13 en los cuales no se dio la inducción de ningún brote, indicando que la KIN no tiene la misma actividad que genera el BAP.

Debido a que los datos no se ajustaron a la normalidad, como complemento se realizó un ANOVA no paramétrico por el método de Kruskal Wallis para la variable número de brotes respecto a los tratamientos planteados (Anexo P), denotando la existencia de diferencias significativas ($p < 0.0001$).

El T7 (4 mg.L^{-1} de BAP) sobresalió al obtener la mayor media de 2.67, seguido por el T16 (6 mg.L^{-1} de KIN) que consiguió una media de 1.89. La mayor cantidad de los tratamientos suplementados con KIN alcanzaron una media de 1, debido a que no existió la formación de brotes.

En la figura 3.18, se muestra la desviación estándar y las medias de cada uno de los tratamientos planteados. Se puede observar claramente la diferencia de la inducción de brotes por la adición de BAP o KIN.

Los tratamientos con una media de 1.0, no tienen una desviación estándar debido a la no existencia de propagación y representan a la planta inicialmente sembrada que entró a esta etapa.

3.4.3 Índice de propagación

El índice de propagación (IP) es la media del número de brotes obtenidos en cada uno de los tratamientos. Este indica la cantidad final de plantas obtenidas por unidad experimental después de cada ciclo de propagación, mientras más alto sea este número, mejor va a ser el rendimiento del proceso.

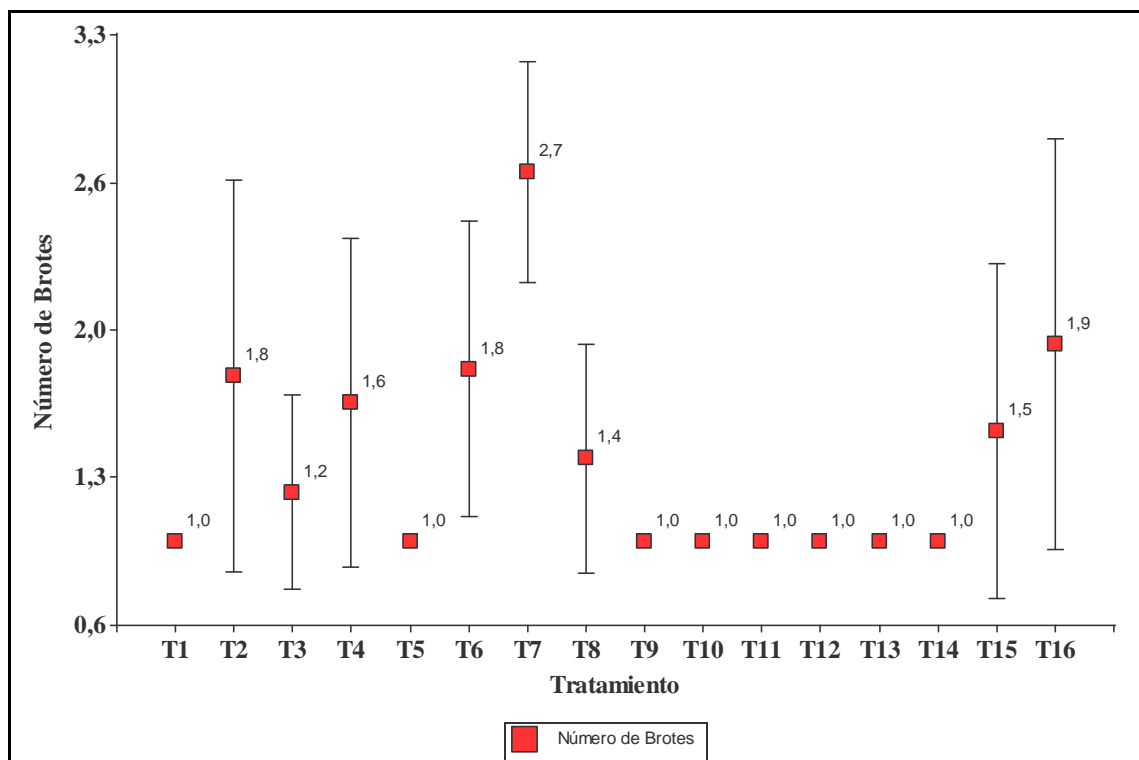


Figura 3.18 Desviación estándar y medias de cada tratamiento planteado en la etapa de propagación de *Hydrangea macrophylla*.

Los resultados obtenidos de este indicador para cada uno de los tratamientos de propagación se sintetizaron en la tabla 3.8.

Tabla 3.8 Índices de propagación de cada uno de los tratamientos planteados en la etapa de propagación de *Hydrangea macrophylla*.

Tratamientos		Índice de propagación	Tratamientos		Índice de propagación
Medio MSVG/2			Medio MSVG/2		
BAP (mg.L ⁻¹)			KIN (mg.L ⁻¹)		
T1	0	1.00	T9	0	1.00
T2	0.5	1.75	T10	0.5	1.00
T3	1	1.22	T11	1	1.00
T4	1.5	1.63	T12	1.5	1.00
T5	2	1.00	T13	2	1.00
T6	3	1.78	T14	3	1.00
T7	4	2.67	T15	4	1.50
T8	6	1.38	T16	6	1.89

En la figura 3.18 mostrada previamente se encuentran graficadas las medias de cada tratamiento, que en este caso representarían los IP. Cuando se usó la KIN, solo el T15 (4mg.L⁻¹) presentó un IP de 1.50 y el T16 (6mg.L⁻¹) uno de 1.89.

3.4.4 Porcentaje de inducción de brotes múltiples

El porcentaje de inducción de brotes múltiples representa la cantidad de unidades experimentales por cada tratamiento que lograron propagarse.

Los resultados obtenidos para la inducción de brotes se los resumió en la tabla 3.9, que se presenta a continuación:

Tabla 3.9 Porcentaje de inducción de brotes múltiples de cada uno de los tratamientos planteados en la etapa de propagación de *Hydrangea macrophylla*.

Tratamientos		% de inducción de brotes múltiples	Tratamientos		% de inducción de brotes múltiples
Medio MSVG/2			Medio MSVG/2		
BAP (mg.L ⁻¹)			KIN (mg.L ⁻¹)		
T1	0	0	T9	0	0
T2	0.5	30	T10	0.5	0
T3	1	20	T11	1	0
T4	1.5	40	T12	1.5	0
T5	2	0	T13	2	0
T6	3	60	T14	3	0
T7	4	80	T15	4	30
T8	6	30	T16	6	50

Como se puede observar el mayor porcentaje de inducción de brotes en los medios con BAP, se encontró en el T7 (4 mg.L⁻¹) con un 80%, contrastando con el resultado del número de brotes en donde el mismo tratamiento obtuvo la mayor cantidad; por otro lado la menor inducción se reportó en T5 (2 mg.L⁻¹) y en el T1 (0 mg.L⁻¹) con un 0%.

Al verificar los tratamientos con KIN, se denotó que del T9 al T14 la inducción de brotes fue nula (0%), simplemente el T15 (4 mg.L⁻¹) y el T16 (6 mg.L⁻¹), alcanzaron un 30% y 50% respectivamente.

3.5 Etapa de enraizamiento de los explantes de hortensia

3.5.1 Porcentaje de contaminación y viabilidad

De la misma manera que en la etapa de propagación, el cambio a la fase de enraizamiento no esta libre de cualquier error en la metodología y manipulación, por lo tanto va a existir un riesgo de posible contaminación en cada uno de los tratamientos planteados.

Después de los 28 días de incubación, se observó que en los tratamientos se presentó este fenómeno; los resultados se reportaron en la tabla 3.10.

Tabla 3.10 Porcentajes de contaminación y viabilidad en la etapa de enraizamiento *in vitro* de *Hydrangea macrophylla*.

Tratamientos		Contaminación (%)	Viabilidad (%)	Tratamientos		Contaminación (%)	Viabilidad (%)
Medio MS				Medio MS/2			
AIB (mg.L ⁻¹)				AIB (mg.L ⁻¹)			
T1	0	10	90	T7	0	20	80
T2	0.5	10	90	T8	0.5	20	80
T3	1	20	80	T9	1	10	90
T4	1.5	20	80	T10	1.5	30	70
T5	2	10	90	T11	2	20	80
T6	3	10	90	T12	3	10	90

El mayor porcentaje de contaminación en el medio MS se presentó en el T3 (1 mg.L⁻¹) y en el T4 (1.5 mg.L⁻¹) con un 20%; mientras que en el medio MS/2 el porcentaje más elevado fue en el T10 (1.5 mg.L⁻¹) el cual reportó un 30%.

Como se puede diferenciar en la figura 3.19, el porcentaje de contaminación fue relativamente muy bajo, concluyendo que la manipulación y las técnicas utilizadas para esta fase fueron las correctas.

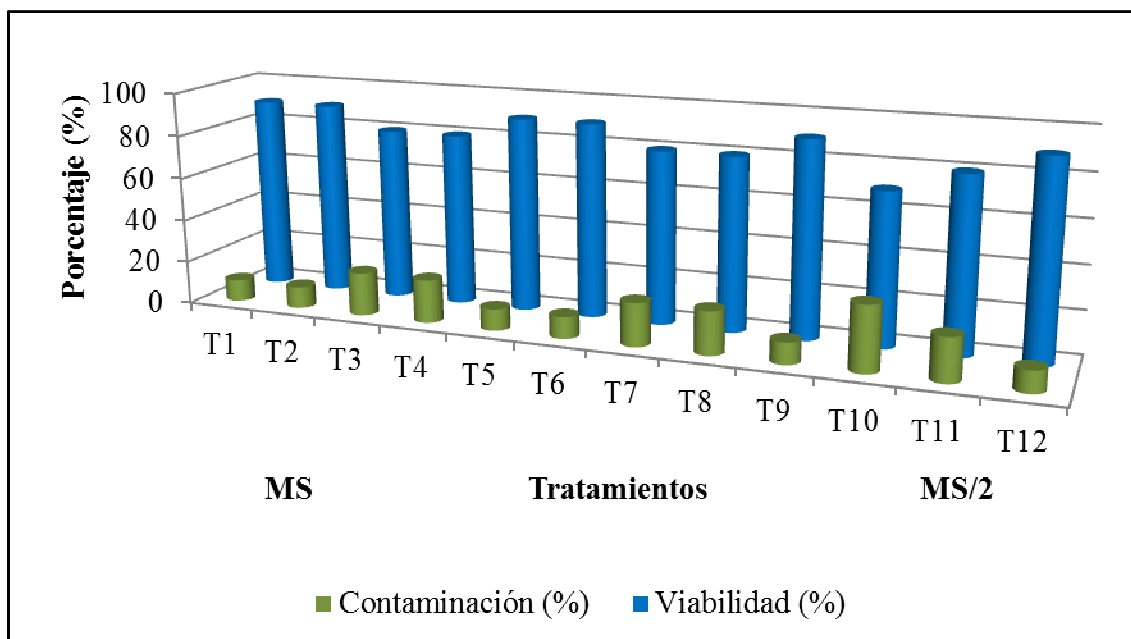


Figura 3.19 Porcentajes de contaminación y viabilidad de los tratamientos planteados en la etapa de enraizamiento de *Hydrangea macrophylla*.

3.5.2 Masa radicular

Para medir la cantidad de raíces obtenidas después de la incubación en la etapa de enraizamiento, se planteó cuatro categorías: 1 nula, 2 poca, 3 abundante y 4 muy abundante.

Primero se analizó los resultados obtenidos para los tratamientos propuestos en el medio MS. Los datos no se ajustaron a la normalidad, por lo tanto se procedió a realizar un ANOVA no paramétrica mediante el método de Kruskal Wallis, que arrojó la existencia de diferencias significativas ($p=0.0057$), en donde el T1 (0 mg.L^{-1}) reportó la mayor media (3.00), mientras que el T6 (3 mg.L^{-1}) obtuvo la menor de 1.22 (Anexo Q).

Posteriormente se examinó los datos obtenidos de los tratamientos ensayados en el medio MS/2; de la misma forma no se ajustaron a la normalidad y se realizó un ANOVA no paramétrica por el método de Kruskal Wallis. Se reportó la existencia de diferencias significativas ($p=0.0025$), donde el T7 (0 mg.L^{-1}) logró la mayor media (3.25) y el T12 (3 mg.L^{-1}) alcanzó la menor de 1.11 (Anexo R).

Además se realizó un estudio del grupo de datos en conjunto, tanto los de MS como MS/2 (figura 3.20). Un ANOVA no paramétrica demostró la existencia de diferencias significativas de los tratamientos ($p=0.0002$), en el cual el T7 (0 mg.L^{-1}) obtuvo la mayor media con 3.25 (Anexo S).

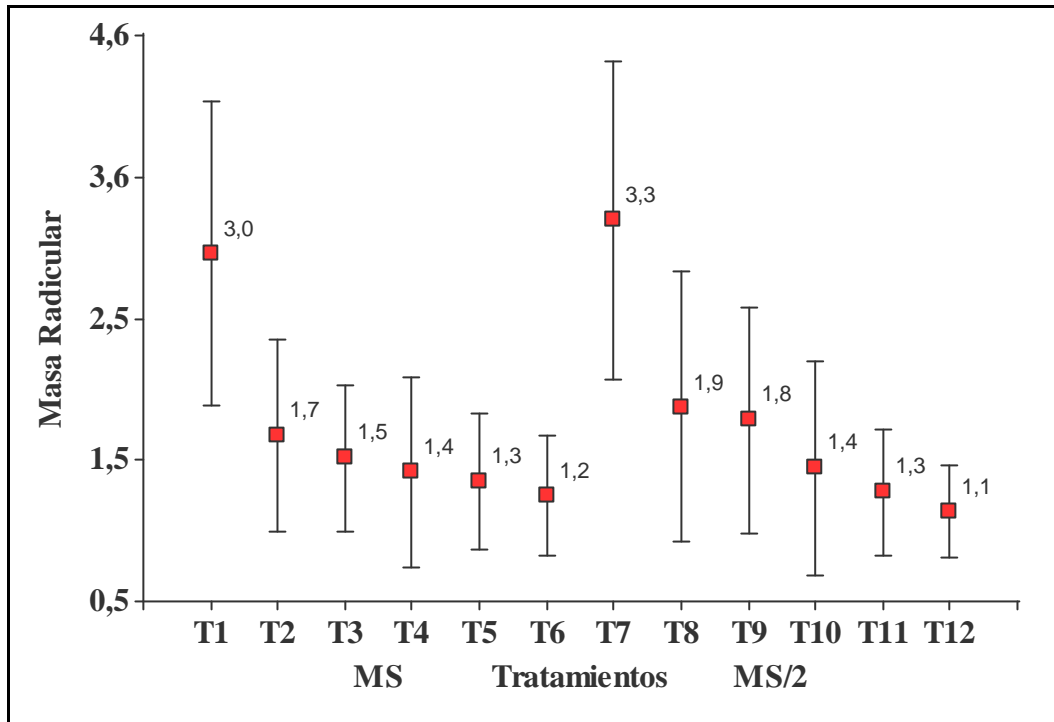


Figura 3.20 Medias y desviaciones estándar de cada uno de los tratamientos planteados en el medio MS y MS/2 respecto a la masa radicular, de la etapa de enraizamiento de *Hydrangea macrophylla*.

Finalmente se investigó el efecto de los medios de cultivo en la estimulación de la formación de raíces de hortensia. Se planteó un ANOVA no paramétrica por el método de Kruskal Wallis (Anexo T), donde se concluyó que no existía diferencias significativas ($p=0.9970$), es decir, el medio de cultivo no fue un factor que influyó en la inducción de raíces (Anexo E parte C). La media obtenida en el medio MS fue de 1.71 y en el MS/2 fue de 1.78 (figura 3.21).

El T7 (0 mg.L^{-1}) en el medio de cultivo MS/2 fue el escogido en esta etapa para realizar el proceso de enraizamiento.

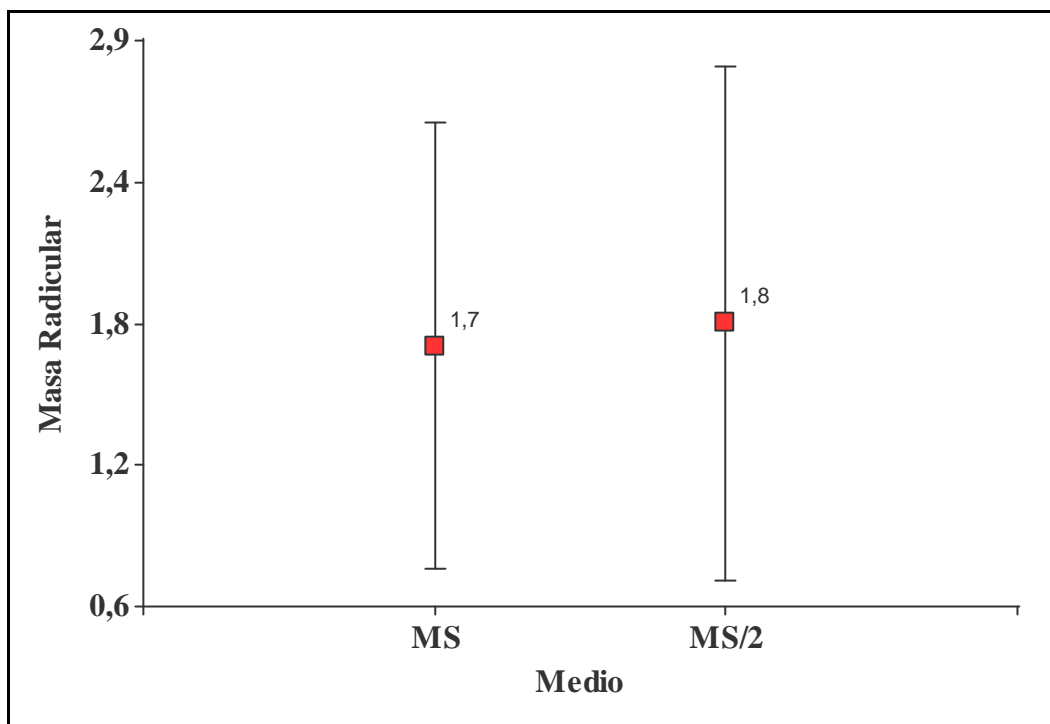


Figura 3.21 Medias y desviaciones estándar del medio MS y MS/2 respecto a la masa radicular, de la etapa de enraizamiento de *Hydrangea macrophylla*.

3.5.3 Porcentaje de plántulas enraizadas

El porcentaje de plántulas enraizadas indica el número de unidades experimentales que lograron formar sus raíces gracias al estímulo de las auxinas agregadas al medio de cultivo. Los resultados obtenidos fueron favorables y se muestran a continuación en la tabla 3.11.

Tabla 3.11 Porcentaje de plántulas enraizadas de cada uno de los tratamientos planteados en la etapa de enraizamiento de *Hydrangea macrophylla*.

Tratamientos		% de plántulas enraizadas	Tratamientos		% de plántulas enraizadas
Medio MS			Medio MS/2		
AIB (mg.L ⁻¹)			AIB (mg.L ⁻¹)		
T1	0	88.8	T7	0	87.5
T2	0.5	55.5	T8	0.5	62.5
T3	1	50	T9	1	55.5
T4	1.5	37.5	T10	1.5	28.6
T5	2	33.3	T11	2	25
T6	3	22.2	T12	3	11.1

Al analizar los tratamientos planteados en el medio MS, se pudo observar que la mejor respuesta a la inducción de raíces se logró con el T1 (0 mg.L⁻¹) con 88.8%, mientras que con el T5 (2 mg.L⁻¹) y el T6 (3 mg.L⁻¹), solo se llegó a obtener un 33.3% y 22.2% respectivamente.

Por otro lado, en el medio MS/2, se destacó el T7 (0 mg.L⁻¹) con un 87.5% de plántulas enraizadas, seguido por el T8 (0.5 mg.L⁻¹) con un 62.5%. El porcentaje más bajo con 11.1% se reportó en el T12 (3 mg.L⁻¹).

En ambos medios de cultivo el proceso de enraizamiento se llevó a cabo en los tratamientos controles, en los que no se adicionó ningún tipo de regulador de crecimiento, en este caso el AIB.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Etapa de desinfección de los explantes de *Hydrangea macrophylla*

En ensayos preliminares se observó que al realizar el cultivo *in vitro* de *Hydrangea macrophylla* surgió la presencia de contaminación tanto exógena originaria de la superficie de los explantes como endógena procedente del interior de los tejidos de la planta.

El éxito de las técnicas en cultivo de tejidos se basa en gran medida en el control y la prevención de la contaminación. Los contaminantes más frecuentes son los hongos filamentosos, las bacterias y las levaduras; muchos de ellos no provocan daños a las plantas en campo y sin embargo se convierten en patógenos *in vitro*. El mayor problema es que compiten con las vitroplantas por los nutrientes del medio y les inducen daños directos o indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de cultivo de metabolitos tóxicos (Pérez, 1998).

Para prevenir o eliminar la contaminación se han propuesto una serie de alternativas diferentes que comprenden desde el incremento de las medidas de asepsia, tratamiento de las plantas donantes, hasta la siembra de las plántulas en un medio de cultivo adicionado con productos antimicrobianos de origen sintético o natural (Pérez, 1998).

La contaminación superficial se la eliminó gracias al uso de desinfectantes usualmente utilizados para el cultivo de tejidos, sustancias que a la vez no pudieron actuar en contra de la infección endógena, razón por la cual en esta fase el diseño experimental se basó en encontrar una concentración de kanamicina y estreptomycinina necesarias para alcanzar el establecimiento *in vitro* de esta especie.

4.1.1 Contaminación, viabilidad y necrosis

La contaminación que se encontró en un análisis diagnóstico realizado al inicio de este trabajo abarcó todo el ensayo con un 100% de incidencia, contrastando con otros

estudios realizados como es el caso del propuesto por Cassells y Tahmatsidou (1996), en el cual se expresó un alto porcentaje de infección bacteriana (69%).

La eliminación de los patógenos superficiales de los explantes de hortensia se realizó mediante la aplicación de un protocolo de desinfección planteado en base a datos bibliográficos y estudios preliminares, donde se determinó que la inmersión de los explantes en detergente por 20 min, seguido a una exposición a etanol durante un minuto, clorox al 40% (hipoclorito de sodio al 2%) por diez min y tres lavados con agua destilada estéril, eliminaban en un 90% la contaminación exógena, coincidiendo con el trabajo propuesto por Dahab (2007) que logró obtener segmentos nodales 100% libres de contaminación utilizando clorox al 40% (hipoclorito de sodio al 2%) suplementado con cloruro de mercurio al 0.4%. En el caso de no cumplir estrictamente con los tiempos instaurados se notaba, después de la siembra de los explantes, que si el tiempo era menor aparecían infecciones en más unidades experimentales, mientras que si el tiempo se incrementaba se encontraban una cierta cantidad de explantes necrosados.

Algunos de los desinfectantes aplicados tienen la característica de ser más abrasivos que otros, por lo que al aumentar el tiempo de exposición a los tejidos tienden a causar mucho más daño, quemándolos y posteriormente provocando el fenómeno de necrosis (Chawla, 2004).

Por otro lado a pesar de haber eliminado la contaminación superficial, se notó que el avance de la brotación de las yemas axilares era muy pobre, por lo cual se concluyó que otro factor estaba impidiendo el desarrollo. Se observó que en la base de los brotes cultivados se formaba un halo, que después de un tiempo contaminó todo el medio de cultivo. La existencia de patógenos endógenos fue evidente.

La expresión de contaminantes endógenos se da comúnmente en cultivos que se realizan a partir de explantes tomados de árboles adultos crecidos en campo y propagados vegetativamente. Por lo general el desarrollo bacteriano tiene su origen desde la parte inferior de la base de los brotes. El efecto que causa su presencia es la disminución del crecimiento y reducción de la capacidad organogénica en la formación de nuevas raíces y brotes adventicios; la utilización de antibióticos es uno de los

métodos más utilizados para controlar y en algunos casos eliminar este fenómeno (Marin *et al.*, 2010).

Cuando el diagnóstico indica contaminación endógena se hace en general referencia a bacterias patógenas o no. Se han aislado bacterias pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, entre otros (Pérez, 1998).

En *Hydrangeas* se ha encontrado un alto porcentaje de contaminación por el género *Enterobacter* (Marin *et al.*, 2010).

La aplicación de ciertas dosis de estreptomicina y kanamicina en el medio de cultivo se probaron con el fin de controlar o eliminar la contaminación endógena. Al aplicar el T2 (0.12 mg.L^{-1}) se observó el mayor porcentaje de viabilidad (90%), mientras que el menor se obtuvo en el T6 (0.4 mg.L^{-1}) con un 30%.

Ciertos autores coinciden en que el empleo de antibióticos debe ser en casos excepcionales, ya que pueden llegar a modificar la composición de los medios de cultivo y ser metabolizados por los explantes, siendo en ciertas concentraciones fitotóxicos para las plantas (Roca & Mroginsky, 1993).

Existe una concentración de antibiótico adecuada en la que actúan con mayor eficiencia sobre las bacterias, en el caso de este estudio bastó con una cantidad de 0.12 mg.L^{-1} de estreptomicina y kanamicina para controlar la contaminación.

Para hacer más específico el uso de antibióticos, se puede comprobar mediante pruebas bioquímicas o moleculares la bacteria o grupo de bacterias que son las causantes de la infección y posteriormente aplicarles pruebas de sensibilidad mediante antibiogramas por la técnica de difusión en agar y la determinación de la mínima concentración inhibitoria (MCI) de los antibióticos por dilución en agar o en caldo (Pérez, 1998).

En el tratamiento 2 y en el 5 se reportó un 10% de presencia de necrosis, una incidencia muy baja, demostrando que los desinfectantes, tiempos de exposición y sus concentraciones utilizadas en el protocolo de desinfección empleado fueron los adecuados.

4.1.2 Porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica

De acuerdo a los resultados globales obtenidos en la fase de desinfección, la contaminación fúngica tuvo una mayor incidencia con un 85.71% en comparación con la bacteriana que simplemente llegó al 14.29%.

La primera forma de controlar la posible contaminación *in vitro* es por medio de la fase preparativa de las plantas madre, donde se le aspergea continuamente una serie de bactericidas y fungicidas. Es en este paso donde se puede tomar en cuenta una mayor aplicación de tratamientos en contra de los hongos, o tratar con otro tipo de químicos que tengan ingredientes activos más fuertes y de mayor concentración en su formulación.

Este comportamiento también puede deberse a que la adición de antibióticos está orientada para eliminar únicamente bacterias por lo que pueden ser controladas de mejor manera, en cambio estas sustancias químicas no ejercen acción sobre los hongos.

Además de lo mencionado, los hongos pueden sobrevivir y adaptarse a ambientes demasiado hostiles, toleran variaciones de pH en especial ácidas en donde no pueden crecer la mayoría de las bacterias, resisten mayor presión osmótica por lo tanto pueden desarrollarse en concentraciones relativamente elevadas de azúcares o sales, soportan medios con un contenido muy bajo de humedad, requieren menores cantidades de nitrógeno y además pueden a menudo metabolizar ciertos hidratos de carbono complejos como la lignina. Tienen la capacidad de reproducirse por medio de esporas sexuales o asexuales que son muy resistentes y que además pueden estar latentes en el ambiente *in vitro* y manifestarse después de una o dos semanas después de la siembra de los explantes. Todos estos factores contribuyen a la mayor incidencia de este tipo de contaminación (Tortora, Funke, & Case, 2007).

4.1.3 Longitud de los brotes

Este análisis se lo realizó para determinar si la adición de los antibióticos en el medio de cultivo incidía de alguna manera en el crecimiento de los explantes. De acuerdo al ANOVA planteado por medio del método de Kruskal Wallis para la variable longitud se demostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.0001$) en donde el T7 (0.5 mg.L^{-1}) obtuvo la mayor media de crecimiento (1.56 cm), mientras que el T3 (0.16 mg.L^{-1}) alcanzó la menor (0.23 cm).

Como se puede observar en la figura 3.5, a medida que la concentración de antibiótico aumentó la media de crecimiento de los explantes también, con excepción del T3 (0.16 mg.L^{-1}) que mostró un comportamiento diferente.

Tomando en cuenta el resultado respecto al porcentaje de viabilidad, el T2 (0.12 mg.L^{-1}) con el 90% fue el mejor sin embargo si se escoge debido al crecimiento de los brotes el T7 (0.5 mg.L^{-1}) con una media de crecimiento de 1.56 cm fue el que sobresalió. Debido a este planteamiento para determinar el mejor tratamiento se realizó un análisis de costo-beneficio.

4.1.4 Análisis costo-beneficio de la etapa de desinfección

A pesar de que el T7 (0.5 mg.L^{-1}) alcanzó una media de crecimiento de 1.56 cm, generó una pérdida de dos unidades experimentales debido a contaminación y necrosis de diez analizadas, al contrario el T2 (0.12 mg.L^{-1}) perdió por necrosis una unidad experimental de diez evaluadas. Como se mencionó en los resultados el costo de una planta *in vitro* se sitúa alrededor de \$0.40, que trasladando a una producción de 10000 plantas, en el caso del T7 (0.5 mg.L^{-1}) se perdería una inversión de \$800 y en el T2 (0.12 mg.L^{-1}) un monto de \$400.

Por lo anteriormente analizado, en esta fase se escogió el T2 (0.12 mg.L^{-1}) como el mejor de todos los planteados; sin embargo a pesar de no tener la mejor media de crecimiento, este problema fue solventado en la fase de establecimiento al agregar reguladores de crecimiento al medio de cultivo.

4.2 Etapa de establecimiento *in vitro* de los explantes de hortensia

Las citoquininas son los reguladores de crecimiento utilizados en esta etapa debido a que estimulan el crecimiento y el desarrollo, aumentando la división celular e induciendo la formación de vástagos adventicios y axilares; por otro lado disminuyen la dominancia apical e inhiben la formación de raíces (Pierik, 1990).

En esta fase se evaluó el crecimiento de los brotes obtenidos de los explantes sembrados en medios MS y MS/2 con diferentes dosis de BAP (0 mg.L^{-1} , 0.25 mg.L^{-1} , 0.5 mg.L^{-1} , 0.75 mg.L^{-1} , 1 mg.L^{-1} , 1.25 mg.L^{-1}), lo cual generó una cantidad de 12 tratamientos.

4.2.1 Porcentaje de contaminación y viabilidad

La contaminación se analizó en esta etapa para determinar si el protocolo de desinfección previamente establecido fue el adecuado. Los resultados obtenidos corroboraron la funcionalidad del mismo ya que se encontraron porcentajes muy bajos de contaminación en todo el ensayo. En la mitad de los tratamientos no se halló la influencia de ningún tipo de infección; el porcentaje más alto se reportó en el T1 y T7 (0 mg.L^{-1}) con un 20%.

Como se observa en la tabla 3.5, la contaminación tuvo el mismo efecto en cada uno de los tratamientos recíprocos en los dos medios de cultivo, por lo tanto no fue requerido el planteamiento de un ANOVA para encontrar diferencias significativas por lo que obviamente no iban a existir; dado este comportamiento se pudo conocer que el medio de cultivo MS o MS/2 no fueron un factor que influyó sobre la variable contaminación.

4.2.2 Longitud de los brotes

El resultado del ANOVA con el método de Kruskal Wallis para la variable longitud en el medio de cultivo MS indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.0001$). La concentración de BAP que metabolizaron los explantes de mejor manera

fue la del T3 (0.5 mg.L^{-1}) que obtuvo una media de crecimiento de 1.61 cm, mientras que la cantidad del T7 (1.25 mg.L^{-1}) no fue favorable obteniendo una media de 0.79 cm.

Se puede notar en la figura 3.9, que en todos los tratamientos existe un crecimiento significativo de la primera a la segunda semana de evaluación, por lo tanto el BAP es asimilado de mejor manera en este lapso. Si se observa el T3 (0.5 mg.L^{-1}) en la cuarta semana llegó a tener una media de crecimiento de 2.29 cm.

En la figura 3.10, se puede observar la presencia de outliers en el T2 (0.25 mg.L^{-1}) y en el T6 (1.25 mg.L^{-1}), que a pesar de su influencia sobre la media de crecimiento, no llegan a ser los mejores ensayados.

Los outliers son parte de las graficas de cajas y bigotes y representan valores atípicos o extremadamente atípicos que no siguen la regla general de una distribución de datos (Armitage & Berry, 1997).

En el caso de que se quisiera realizar un estudio de mejoramiento vegetal de hortensia, se podrían escoger los individuos que muestren mejores características que el resto de la población (outliers) respecto al crecimiento e investigar las razones genéticas que los hace diferentes.

El resultado del ANOVA por el método de Kruskal Wallis para la variable longitud en el medio de cultivo MS/2 demostró que no existía diferencias significativas en los tratamientos ($p=0.1113$). La influencia de las concentraciones de BAP fue la misma, sin embargo el T9 (0.5 mg.L^{-1}) fue el que obtuvo la mayor media de crecimiento con 1.88 cm. Al igual que en el medio MS, el crecimiento fue mayor de la primera a la segunda semana de evaluación como se muestra en la figura 3.12. La media que se reportó para el T9 (0.5 mg.L^{-1}) en la cuarta semana fue de 2.5 cm.

De la misma forma la media más baja se obtuvo en el T11 (1 mg.L^{-1}) con 1.44 cm, contrastando con el medio MS en el cual también se observó un menor crecimiento cuando se aplicó mayores concentraciones de BAP.

Se logró también determinar la existencia de una influencia directa del medio de cultivo en la variable longitud a través de un ANOVA por el método de Kruskal Wallis ($p < 0.0001$), donde el medio MS/2 reportó una media de crecimiento de 1.63 cm superando completamente al medio MS que solo logró una media de 1.17 cm.

La utilización del medio MS/2, además de dar lugar a un mejor desarrollo de los explantes, también ayudó a reducir los costos de producción.

4.3 Etapa de propagación clonal de *Hydrangea macrophylla*

Los reguladores de crecimiento vegetal encargados de promover la inducción a la brotación son las citoquininas, entre las más utilizadas el BAP y la KIN, que fueron objeto de estudio en el cultivo *in vitro* de *Hydrangea macrophylla*.

El medio de cultivo MSVG/2 fue escogido en esta etapa debido a que presentó mejores resultados en pruebas preliminares, además de ser ampliamente utilizado en otros trabajos como el de Liu (2011) y Dahab (2007).

En esta etapa se incluyó al carbón activado en la preparación del medio de cultivo ya que al estar presente se notó un incremento en la vitalidad de la planta. El carbón ayuda a retener en su estructura ciertos compuestos tóxicos de la micro atmósfera gaseosa y también favorece cuando existe un exceso de RCV en el medio de cultivo (Levitus *et al.*, 2010).

Respecto a la contaminación, se ha comprobado que casi nunca va a existir un 100% de plantas libres de infecciones; la adición de los antibióticos en el medio de cultivo causará un efecto bacteriostático más que uno bactericida.

La contaminación reportada en esta fase incluyó al T11 (1 mg.L⁻¹ de KIN) con un 30% como el valor más elevado, mientras que en el resto de tratamientos no tuvo un notorio incremento. Ningún tratamiento estuvo libre de contaminación, al menos una unidad experimental estuvo infectada, a pesar de esto, se puede aseverar que las técnicas utilizadas y la manipulación fueron las adecuadas.

En la etapa de propagación *in vitro* de *Hydrangea macrophylla* se observó el efecto producido por las citoquininas BAP y KIN, para producir diferente número de brotes dependiendo del tratamiento que se llevó a cabo.

A medida que la concentración de BAP aumentó, los tratamientos mostraron tener mejores resultados que en los que se incluyó a la KIN. El mayor número de brotes se alcanzó en el T7 (24 brotes), demostrando que la cantidad adecuada de BAP fue de 4 mg.L⁻¹ para la propagación *in vitro* de *Hydrangea macrophylla*. A pesar de utilizar concentraciones bajas de este regulador, se observó la inducción de brotes como en el T2 (0.5 mg.L⁻¹) con una media de 1.75.

Se observó, además, que el efecto producido por la KIN fue negativo para bajas concentraciones, sin embargo, cuando esta aumentó, se pudo observar que se dio la formación de algunos brotes en los tratamientos T15 (4 mg.L⁻¹) y T16 (6 mg.L⁻¹), alcanzando unas medias de 1.50 y 1.89 respectivamente.

Del grupo de las citoquininas, el BAP tiene mayor actividad hormonal respecto a la KIN, por lo que esto podría ser una de las razones para que con la primera se estimule de mejor manera la brotación. En el caso de manejar la KIN se tendría que utilizar mayores cantidades y a la vez esto generaría un incremento en los costos de producción, por lo tanto se determinó que este RCV queda fuera de expectativas para la propagación de esta especie, ya que con menores cantidades de BAP se puede provocar el mismo efecto y con menor gasto.

Por otro lado, se observó que en los tratamientos controles, es decir, aquellos que no contenían ningún RCV, tanto para la KIN como para el BAP, se dio el desarrollo de raíces adventicias; por lo cual se infirió que la cantidad de carbón activado a una concentración de 0.2 g.L⁻¹ utilizada en la etapa de propagación, causaba un efecto positivo para ser tomado en cuenta en la fase de enraizamiento.

El mayor índice de propagación logrado (2.67), indicó que fue posible obtener hasta tres brotes por cada explante de hortensia con el mejor tratamiento. En el estudio realizado por Dahab (2007), se reportó un IP de 1.80 para el primer ciclo de propagación y en el segundo obtuvo un índice de 3.40, por lo tanto se demuestra que el

IP alcanzado en el presente estudio es el adecuado. Es posible optimizar este número a medida que avanzan los subcultivos, no obstante, es importante tomar en cuenta las variaciones somaclonales que se pueden presentar debido al número excesivo de los mismos.

El porcentaje de inducción de brotes múltiples mostró que se pudo propagar en el T7 (4 mg.L^{-1} de BAP) el 80% de las unidades experimentales, representando un alto rendimiento del medio de cultivo probado. Esta frecuencia y el valor del IP son importantes ya que con ellos se puede realizar una estimación del número de hortensias que se pueden producir a escala masiva.

4.4 Etapa de enraizamiento de los explantes de hortensia

Las auxinas son el grupo de reguladores de crecimiento que actúan de mejor manera en esta etapa ya que provocan una elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias; además inhiben la formación de vástagos axilares (Pierik, 1990).

Cuando se usan bajas concentraciones de auxinas se induce la producción de raíces adventicias, mientras que con altas, por el contrario, da lugar a la formación de callo (Pierik, 1990).

En esta fase se estimuló la formación de raíces en los explantes propagados mediante el uso de un medio de cultivo MS y MS/2 suplementados con 0.2 g.L^{-1} de carbón activado y con diferentes concentraciones de auxina, AIB (0 mg.L^{-1} , 0.5 mg.L^{-1} , 1 mg.L^{-1} , 1.5 mg.L^{-1} , 2 mg.L^{-1} , 3 mg.L^{-1}), se realizaron en total 12 tratamientos.

La contaminación al igual que en la etapa de propagación también se presentó en esta fase, debido a las posibles causas antes ya mencionadas. En la mayoría de tratamientos se reportó porcentajes bajos de entre un 10% y 20%, sin embargo la excepción fue en el T10 (1.5 mg.L^{-1}) que mostró un 30% de contaminación. Se comprobó que la manipulación y las técnicas utilizadas fueron las adecuadas a pesar de las infecciones presentadas.

Las raíces adventicias que se presentaron *in vitro* de *Hydrangea macrophylla* tendieron a ser demasiado finas y además con muchas ramificaciones pequeñas, lo que no facilitó el conteo y medida de las mismas, por esta razón se plantearon categorías para poder reflejar la cantidad de raíces obtenidas, 1 nula, 2 poca, 3 abundante y 4 muy abundante.

Con los datos obtenidos del estudio de masa radicular se realizó un ANOVA no paramétrica por el método de Kruskal Wallis debido a que los resultados no se ajustaron a la normalidad, para los tratamientos planteados en el medio de cultivo MS, la cual indicó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.0057$). Se destacó el T1 (0 mg.L⁻¹) con una media de 3.00.

Además se efectuó un ANOVA no paramétrica para los tratamientos propuestos en el medio de cultivo MS/2, la cual reportó la existencia de diferencias significativas ($p = 0.0025$), el T7 (0 mg.L⁻¹) fue el que obtuvo la mayor media 3.25.

Finalmente se determinó el efecto de los medios de cultivo en la inducción de raíces, por medio de un ANOVA no paramétrica, la cual indicó la no existencia de diferencias significativas ($p = 0.9970$); el uso de MS o MS/2 no fue un factor determinante en la producción de raíces.

El tiempo en el que se dio lugar al enraizamiento varió entre 21 y 28 días después de la siembra, demostrando que las cuatro semanas implementadas para este ensayo fueron las adecuadas para promover el enraizamiento.

Tanto en el medio MS como MS/2 se verificó que este fenómeno se llevó a cabo en el medio control, es decir, sin la presencia del regulador de crecimiento AIB, confirmando que en el caso de esta especie, la cantidad de auxina endógena fue suficiente para promover el enraizamiento sin la necesidad del suplemento exógeno, simplemente bastó la cantidad de carbón activado agregado a una razón de 0.2 g.L⁻¹.

Respecto al porcentaje de plántulas enraizadas, de igual manera los controles tanto en el medio MS como MS/2 fueron los mejores, presentaron un 88.8% y 87.5%, respectivamente, coincidiendo con los resultados obtenidos en la cantidad de raíces. Se

puede notar claramente que a medida que el AIB aumenta su concentración, la cantidad de plántulas enraizadas disminuyen.

El medio de cultivo elegido para esta etapa fue el MS/2 ya que no difirió en rendimiento respecto al MS, además su implementación generará un ahorro en el costo de producción. Lo mismo sucedió con la adición de AIB, al no ser necesario su uso, contribuirá también a abaratar el proceso.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. En la fase de desinfección, el mayor porcentaje de viabilidad fue observado en el T2, en el que se utilizó 0.12 mg.L^{-1} de kanamicina y estreptomicina, alcanzando un 90% de sobrevivencia y con respecto a la variable contaminación demostró no tener incidencia, efectuando un control adecuado.
2. No existió un alto índice de la variable necrosis en todos los tratamientos ensayados en la etapa de desinfección.
3. La contaminación que se presentó en mayor proporción fue de tipo fúngica, obteniendo un porcentaje global de 85.71%.
4. En la etapa de establecimiento, la combinación del medio de cultivo MS/2 más 0.5 mg.L^{-1} de BAP demostró tener la mayor eficiencia, reportando una media de crecimiento de los explantes de 1.88 cm.
5. En la fase de multiplicación, el medio de cultivo MSVG/2 adicionado con 4 mg.L^{-1} de BAP generó la mayor cantidad de número de brotes (24 brotes), además reportó un índice de propagación de 2.67 propágulos por explante y un porcentaje de inducción del 80%.
6. La KIN en la etapa de propagación indujo la brotación a concentraciones altas, mientras que el BAP actuó a concentraciones más bajas, por lo tanto, el uso de l KIN para multiplicar esta especie no fue apropiado y generaría altos costos de producción.
7. El tratamiento que indujo la formación de raíces en mayor proporción fue en el que se utilizó el medio de cultivo MS/2 sin el suplemento de auxina AIB (0 mg.L^{-1}), únicamente bastó la adición de 0.2 g.L^{-1} de carbón activado. Se logró obtener un porcentaje de plántulas enraizadas de 87.5%.

8. Los costos de la etapa de enraizamiento fueron mucho menores, debido a que no se uso ningún tipo de regulador de crecimiento, lo que benefició en general a todo el proceso de micropropagación.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Las plantas madre utilizadas tienen que ser de muy buena calidad, jóvenes y libres de enfermedades, para obtener buenos resultados, si es posible se debe manejar plantas donadoras cultivadas previamente *in vitro*.
- Es muy importante que las plantas madre pasen por la fase preparativa, no se puede obviar este paso, porque en estudios preliminares se demostró que la incidencia de contaminación se reduce drásticamente, además que el estado fisiológico de las plantas tienden a homogenizarse, al mantenerlas en las mismas condiciones ambientales.
- En el momento de seleccionar y cortar los segmentos nodales de las plantas donadoras de hortensia, se debe obtener los más cercanos al ápice, ya que se observó que estos explantes tenían mayor actividad fisiológica, dando mejores resultados.
- Llevar a cabo un estudio detallado de los microorganismos endógenos presentes en los tejidos de *Hydrangea macrophylla*; realizar un aislamiento de los mismos e identificarlos con pruebas bioquímicas o moleculares, con el fin de aplicar antibiogramas para determinar si se puede utilizar algún antibiótico específico que cause un mayor efecto en el control de la contaminación y que además ayude a reducir costos de producción.
- Realizar un estudio de micropropagación de hortensia, utilizando la técnica de cultivo de meristemas, como método de eliminación de los microorganismos endógenos presentes.
- Se recomienda no utilizar el regulador de crecimiento kinetina, para la propagación de *Hydrangea macrophylla*.
- Para aumentar la multiplicación *in vitro* de hortensia es importante el uso del ácido giberélico (AG₃), ya que ayuda a elongar el tallo de la plántula.

- Determinar el número de ciclos de propagación que se pueden llevar a cabo en el cultivo de *Hydrangea macrophylla*, antes de la aparición de variantes somaclonales.
- Realizar un estudio de aclimatización de los explantes enraizados de hortensia. Determinar la posibilidad de traspasar los explantes que salen de la etapa de multiplicación directamente a la fase de aclimatización, obviando el enraizamiento *in vitro*.
- Para estudios de variabilidad genética y mejoramiento vegetal de hortensia, se sugiere tratar de utilizar la mayor cantidad de fuentes posibles de plantas madre, identificar outliers como indicadores de mejores características y complementar los análisis con aplicaciones moleculares.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Alvarez, R., Cabrera, M., & Sosa, N. (2009). *Manchas foliares de la hortensia (Hydrangea Sp.) en el nordeste de la Argentina*. Recuperado el 2012, de <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/agrarias/a-042.pdf>

Anderson, N., Weiland, J., Pharis, J., Gagné, W., Janiga, E., & Rosenow, M. (2009). Comparative forcing of *Hydrangea macrophylla* 'Bailer' as a florist's hydrangea. *Scientia Horticulturae*, 122, 221-226.

Armitage, P., & Berry, G. (1997). *Estadística para la investigación biomédica*. Madrid: Harcourt Brace.

Burbano, D., & Herdoíza, N. (2009). *La biodiversidad del Distrito Metropolitano de Quito, un tesoro por explorar*. Recuperado el 2012, de <http://www.quitoambiente.com/downloads.pdf>

Cabrera, M., Alvarez, R., Cundom, M., & Gutiérrez, S. (2009). *Enfermedades que afectan a Hydrangea macrophylla en Corrientes, Argentina*. Corrientes: UNNE.

Carvalho, A. (2010). *Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho: un estudio etnobotánico en Portugal*. Madrid: CSIC.

Cassells, A., & Tahmatsidou, V. (1996). The influence of local plant growth conditions on non-fastidious bacterial contamination of meristem-tips of *Hydrangea* cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47, 15-26.

Cerbah, M., Mortreau, E., Brown, S., Siljak, S., Bertrand, H., & Lambert, C. (2001). Genome size variation and species relationships in the genus *Hydrangea*. *Theor Appl Genet*, *103*, 45–51.

Chawla, H. (2004). *Introduction to Plant Biotechnology*. Enfield: Science Publishers.

CIAC. (2008). *Proyecto CIAC*. Quito: Gerencia de Parques y Jardines.

CIAC. (2010). *Centro de investigación ambiental de Cununyacú*. Recuperado el 2012, de http://ciac2ecuador.blogspot.com/2010/propagacion-vegetal_06.html

Codarin, S., Galopin, G., & Chasseriaux, G. (2006). Effect of air humidity on the growth and morphology of *Hydrangea macrophylla* L. *Scientia Horticulturae*, *108*, 303–309.

Dahab, T. (2007). In vitro propagation of *Hydrangea macrophylla* Thunb. *Arab J. Biotech*, *10*, 161-178.

Denuncias verdes. (2008). *La importancia de los árboles*. Recuperado el 2012, de <http://masespaciosverdes.blogspot.com>

Diario La Hora. (2008). *Quito tendrá un millón de plantas de laboratorio*. Recuperado el 2012, de <http://www.lahora.com.ec/index.php/noticias/show.html>

Diario La Hora. (2011). *Quito pierde espacio verde*. Recuperado el 2012, de <http://www.lahora.com.ec/index.php/noticias/show/11012178.html>

Durán, C. (1999). *Flora de Veracruz. Hydrangeaceae*. Veracruz: Instituto de ecología, A. C. Universidad de California.

El Comercio. (2009). *25 plantas nativas se estudian en Quito*. Recuperado el 2012, de http://www.elcomercio.com/noticias/plantas-nativas-estudian-Quito_0_80392186.html

El Universo. (2011). *Déficit de áreas verdes persiste, pese a que se suman proyectos*. Recuperado el 2012, de <http://www.eluniverso.com/2011/07/09/1/1445/deficit-areas-verdes-persiste-pese-suman-proyectos.html>

Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas. (2011). *Empresarios y municipio se unen por un Quito verde*. Recuperado el 2012, de <http://www.noticiasquito.gob.ec/Noticias/news>

Esquivel, A., & Escalant, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Turriaiba: CATIE.

Estévez, E. (2010). *Población y proyección del Distrito Metropolitano de Quito*. Recuperado el 2012, de <http://sthv.quito.gob.ec/images/indicadores/2010.pdf>

Fernández, M. (1996). *Degradación ambiental, riesgos urbanos y desastres*. Recuperado el 2012, de <http://www.desenredando.org/public/libros/1996>

Galopin, G., Codarin, S., Viemont, J., & Morel, P. (2008). Architectural development of inflorescence in *Hydrangea macrophylla* cv. Hermann Dienemann. *HortScience*, *43*, 361–365.

Gilman, E. (1999). *Hydrangea macrophylla*. Institute of food and agricultural sciences-University of Florida, 1-3.

Gómez, F. (2005). *Las zonas verdes como calidad de vida en las ciudades*. Recuperado el 2012, de <http://burgosciudad21.org/adftp/zonasverdes.pdf>

Hagan, A., & Mullen, J. (2001). *Diseases of Hydrangea*. Recuperado el 2012, de <http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-1212/ANR-1212.pdf>

Harling, G., & Andersson, L. (1992). *Flora of Ecuador*. Sweden: University of Goteborg.

ITIS, I. T. (2012). *Catalogue of life*. Recuperado el 2012, de <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/7055669>

Jha, T., & Ghosh, B. (2005). *Plant tissue culture. Basic and applied*. Hyderabad: Universities Press.

Jørgensen, P., Neil, D., & León, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. San Luis: Missouri Botanical Garden Press.

Kesumawati, E., Kimata, T., Uemachi, T., Hosokawa, M., & Yazawa, S. (2006). Correlation of phytoplasma concentration in *Hydrangea macrophylla* with green-flowering stability. *Scientia Horticulturae*, 108, 74-48.

Kitamura, Y., Hosokawa, M., Uemachi, T., & Yazawa, S. (2009). Selection of ABC genes for candidate genes of morphological changes in hydrangea floral organs induced by phytoplasma infection. *Scientia Horticulturae*, *122*, 603–609.

León, X., & Naranjo, A. (2005). *¿Es el espacio público cada vez más privado?* Recuperado el 2012, de <http://bibliotecavirtual.clacso.org.ar/ar/libros/ecuador.pdf>

Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. Buenos Aires: INTA.

Liu, F., Huang, L., Li, L., Reinhoud, P., Jongsma, M., & Wang, C. (2011). Shoot organogenesis in leaf explants of *Hydrangea macrophylla* 'Hyd1' and assessing genetic stability of regenerants using ISSR markers. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, *104*, 111–117.

Marin, A., Boudabous, M., Lorente, P., García, E., Andreu, P., & Arbeloa, A. (2010). Saneamiento in vitro de 'Douce de Djerba', una variedad de manzano micropropagada. *IITEA-Información Técnica Económica Agraria*, *106*, 303-307.

Mmbaga, M., Kim, M., Mackasmiel, L., & Li, Y. (2012). Evaluation of *Hydrangea macrophylla* for resistance to leaf-spot diseases. *Journal of phytopathology*, *160*, 88–97.

Nordlia, E., Strømb, M., & Torrea, S. (2011). Temperature and photoperiod control of morphology and flowering time in two greenhouse grown *Hydrangea macrophylla* cultivars. *Scientia Horticulturae*, *127*, 372–377.

Ochoa, J. (1999). La vegetación como instrumento para el control microclimático. Barcelona: UPC.

Pérez, J. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba: Instituto de biotecnología de las plantas.

Pierik, R. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa.

Ramos, J. (1996). *El papel del sistema de espacios verdes en la multifuncionalidad del paisaje urbano. Aplicación al área metropolitana de Sevilla*. Recuperado el 2012, de http://www.apgeo.pt/files/docs/CD_X_Coloquio_Iberico_Geografia/pdfs/029.pdf

Razdan, N. (2003). Introduction to plant tissue culture. Enfield: Science Publishers.

Rinehart, T., Scheffler, B., & Reed, S. (2006). Genetic diversity estimates for the genus *Hydrangea* and development of a molecular key based on SSR. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 131, 787–797.

Roca, W., & Mroginsky, L. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT.

Ros, S. (2006). La empresa de jardinería y paisajismo. Madrid: Mundi Prensa.

Sagar, A., Joshi, M., & Srivastava, B. (2011). Study of antifungal activity of *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser and *Allium cepa* Linn. against some pathogenic fungi. Plant Archives, 11, 37-41.

Salvador, P. (2009). La planificación verde en las ciudades. *Arquitectura del paisaje*, 123, 12-20.

Schreiber, H., Jones, A., Lariviere, C., Mayhew, K., & Cain, J. (2011). Role of aluminum in red-to-blue color changes in *Hydrangea macrophylla* sepals. *Biometals*, 24, 1005–1015.

Smith, K., Chenault, J., & Tilt, K. (2010). *Hydrangeas*. Recuperado el 2012, de www.aces.com

Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires: Médica Panamericana.