

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INDUCCIÓN AL PROCESO DE CALLOGÉNESIS *in vitro* A  
PARTIR DE COTILEDONES Y EJES EMBRIOGÉNICOS DE  
SEMILLAS MADURAS DE GUARANGO (*Caesalpinia spinosa*)  
COMO COADYUVANTE PARA SU PRESERVACIÓN EN EL  
DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

GABRIELA MARÍA ORTEGA ORDÓÑEZ

SANGOLQUÍ, 28 de enero de 2013

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

Gabriela María Ortega Ordóñez

**DIRECTORA DE LA CARRERA**

---

Ing. Grace Páez

**SECRETARIO ACADÉMICO**

---

Abg. Carlos Orozco Bravo, MSc.

Sangolquí, 28 de enero de 2013

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. GABRIELA MARÍA ORTEGA ORDÓÑEZ como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 28 de enero de 2013

---

Ing. Norman Soria I.  
**DIRECTOR**

---

Ing. Marco Taipe B.  
**CODIRECTOR**

## CERTIFICACIÓN

Los suscritos certifican:

Que el trabajo titulado “**Inducción al proceso de Callogénesis *in vitro* a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de Guarango (*Caesalpinia spinosa*) como coadyuvante para su preservación en el Distrito Metropolitano de Quito**”, realizado por la Srta. Gabriela María Ortega Ordóñez, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Centro de Investigación Ambiental de Cununyacu (CIAC) y financiado por la Empresa Pública de Movilidad y Obras Públicas (EPMMOP), se deja en libertad del autor y del CIAC, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Se autoriza a Gabriela María Ortega Ordóñez para que lo entregue a la Ing. Tatiana Páez, en su calidad de Directora de la Carrera.

Sangolquí, 28 de enero de 2013

---

Ing. Norman Soria I.  
**DIRECTOR**

---

Ing. Marco Taipe B.  
**CODIRECTOR**

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Gabriela María Ortega Ordóñez

### Declaro que:

El proyecto de grado “**Inducción al proceso de Callogénesis *in vitro* a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de Guarango (*Caesalpinia spinosa*) como coadyuvante para su preservación en el Distrito Metropolitano de Quito**”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

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

Sangolquí, 28 de enero de 2013

---

**Gabriela María Ortega Ordóñez**

## AUTORIZACIÓN

Yo, Gabriela María Ortega Ordóñez

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“Inducción al proceso de Callogénesis *in vitro* a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de Guarango (*Caesalpinia spinosa*) como coadyuvante para su preservación en el Distrito Metropolitano de Quito”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 28 de enero de 2013

---

**Gabriela María Ortega Ordóñez**

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar mi tesis a Flora y Nazario mis padres, mis primeros maestros, por apoyarme y creer siempre en mí y a Patty mi hermana por su ejemplo y por ser mi cómplice en cada aventura de mi vida. Los amo con mi vida.

**Gabriela María Ortega Ordóñez**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al subir este nuevo peldaño en mi vida profesional, mis agradecimientos van dirigidos a Dios por acompañarme en cada paso que doy.

A la fuerza de mi vida, mi madre, le agradezco por brindarme su amor, por ser mi ejemplo de mujer y sobre todo por ser el impulso de mi vida.

Gracias le doy al pilar de mi vida, mi padre, por guiarme en la vida, por cada consejo y por su confianza en mí.

A la sonrisa de mi vida, mi hermana, gracias por ser quien siempre tienes la palabra precisa para mí, porque eres de quien aprendí a luchar.

A mis maestros, el ing. Norman Soria y el ing. Marco Taipe mis agradecimientos por brindarme su tiempo, compartir su conocimiento y tener la mejor predisposición para el desarrollo de esta tesis.

Gracias Juan Carlos, por tu apoyo infalible, por tu mano sincera y sobre todo por estar presente en cada momento de mi vida con tu incondicional amistad.

A mi querida Anita, gracias por compartir aquel tiempo de tesis y formar un excelente equipo de trabajo.

**Gabriela María Ortega Ordóñez**

## NOMENCLATURA

EPMMOP-Q	Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas – Quito
DMQ	Distrito Metropolitano de Quito
CIAC	Centro de Investigación Ambiental de Cununyacu
m.s.n.m	Metro sobre el nivel del mar
pH	Potencial de hidrógeno
NaOH	Hidróxido de sodio
HCl	Ácido clorhídrico
NaClO	Hipoclorito de sodio
2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
BAP	6-Bencilaminopurina
KIN	Kinetina
AIA	Ácido indolacético
ANA	Ácido naftalenacético
IBA	Ácido indol-3-butírico
TDZ	Thidiazurón
MS	medio basal Murashike y Skoog
B5	medio basal Gamborg B5
M	Concentración expresada en Molaridad ( $\text{mol.L}^{-1}$ )
cm	Centímetro
m	Metro
°C	Grados Centígrados
$\text{mg.L}^{-1}$	Miligramo por litro
$\text{g.L}^{-1}$	Gramo por litro
$\text{kg.cm}^{-2}$	Kilogramo por centímetro cuadrado
mm	Milímetros
p/v	Peso/volumen
v/v	Volumen /volumen
No emb	Embriogénico
emb	No embriogénico

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Formulación del problema .....	1
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos de la investigación .....	5
1.3.1 Objetivo General.....	5
1.3.2 Objetivos Específicos .....	5
1.4 Marco Teórico .....	6
1.4.1 Guarango ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ) .....	6
1.4.2 Descripción botánica .....	7
1.4.3 Identificación de la especie .....	9
1.4.4 Distribución geográfica.....	10
1.4.5 Enfermedades .....	11
1.4.6 Silvicultura y manejo de las semillas .....	12
1.4.6.1 Métodos de escarificación .....	13
1.4.7 Propiedades y usos .....	15
1.4.8 Demanda y producción.....	17
1.4.9 Conservación de especies forestales .....	18
1.4.10 Biotecnología Vegetal en especies forestales .....	19
1.4.11 Callogénesis.....	22
1.4.12 Embriogénesis somática en especies forestales .....	23
1.4.13 Factores que intervienen en la callogénesis y en la ES .....	25
1.4.13.1 Tipo de explante .....	25
1.4.13.2 Asepsia.....	26
1.4.13.3 Medio de cultivo.....	27
1.4.13.4 Factores físicos.....	30
1.4.13.5 Histogénesis .....	31
1.4.13.6 Aplicaciones de la embriogénesis somática .....	31
1.5 Hipótesis .....	32
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	33

2.1 Participantes .....	33
2.2 Zona de Estudio.....	34
2.2.1 Localización geográfica .....	34
2.3 Período de tiempo de investigación .....	34
2.4 Diseño estadístico.....	34
2.4.1 Etapa de desinfección .....	34
2.4.2 Etapa preliminar de inducción a callo embriogénico.....	35
2.4.3 Etapa final de inducción a callo embriogénico .....	35
2.4.4 Etapa de Identificación .....	35
2.5 Procedimientos .....	36
2.5.1 Selección y preparación del material vegetal .....	36
2.5.2 Desinfección .....	38
2.5.2.1 Desinfección de los explantes .....	38
2.5.2.2 Medio de cultivo para la etapa de desinfección .....	39
2.5.2.3 Siembra de los explantes .....	39
2.5.2.4 Análisis de datos.....	41
2.5.3 Inducción a callo embriogénico .....	42
2.5.3.1 Medios de cultivo para la etapa de inducción a callo embriogénico.....	43
2.5.3.2 Análisis de datos, ensayo preliminar de inducción a callo ..	44
2.5.3.3 Análisis de datos del ensayo final de inducción a callo .....	47
2.5.4 Identificación de callo embriogénico .....	47
2.5.4.1 Análisis Histológico.....	48
CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....	50
3.1 Fase 1: Desinfección de los explantes.....	50
3.1.1 Explantes vivos en cotiledones y ejes embriogénicos .....	50
3.1.2 Contaminación bacteriana, fúngica y necrosis .....	53
3.1.2.1 Cotiledones.....	53
3.1.2.2 Ejes embriogénicos .....	57
3.2 Fase 2: Ensayo preliminar para la inducción a callo.....	61
3.2.1 Cotiledones.....	61

3.2.1.1	Formación de callo .....	61
3.2.1.2	Tiempo de formación de callo.....	63
3.2.1.3	Morfología de los callos .....	65
3.2.2	Ejes embriogénicos .....	71
3.2.2.1	Formación de callo .....	71
3.2.2.2	Tiempo de formación de callo.....	73
3.2.2.3	Morfología de los callos .....	75
3.3	Fase 3: Ensayo final para la inducción a callo .....	80
3.3.1	Formación de callo en cotiledones .....	80
3.3.2	Tiempo de formación de callo.....	82
3.3.3	Morfología de los callos .....	84
3.4	Fase 4: Análisis histológico de los callos embriogénicos .....	92
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....		94
4.1	Fase 1: Desinfección de los explantes.....	94
4.1.1	Explantos vivos en cotiledones y ejes embriogénicos .....	94
4.1.2	Contaminación bacteriana, fúngica y necrosis .....	95
4.2	Fase 2: Ensayo preliminar para la inducción a callo .....	97
4.2.1	Formación de callo .....	97
4.2.2	Tiempo de formación de callo.....	98
4.2.3	Morfología de los callos .....	99
4.2.3.1	Cotiledones.....	99
4.2.3.2	Ejes embriogénicos .....	100
4.3	Fase 3: Ensayo final para la inducción a callo en cotiledones .....	101
4.3.1	Formación de callo .....	101
4.3.2	Tiempo de formación de callo.....	103
4.3.3	Morfología de los callos .....	103
4.4	Fase 4: Análisis histológico de los callos embriogénicos .....	106
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....		107
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES .....		109
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA .....		110
CAPÍTULO 8: ANEXOS .....		<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> detalle de la identificación del guarango según Fonsefor .....	9
<b>Tabla 1.2</b> Clasificación taxonómica según el Departamento de Agricultura .....	10
<b>Tabla 2.1</b> Tratamientos de desinfección para semillas maduras de árboles de <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	38
<b>Tabla 2.2</b> Dosificación de bioreguladores en medio de cultivo MS y B5 para los ensayos preliminares de inducción a callo a partir de cotiledones y de ejes embriogénicos de árboles de <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	44
<b>Tabla 2.3</b> Dosificación de las concentraciones y combinaciones de bioreguladores para los ensayos concluyentes de inducción a callo a partir de cotiledones y de ejes embriogénicos de árboles de <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	46
<b>Tabla 3.1</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de cotiledones y ejes embriogénicos vivos y descartados, evaluados a los 25 días de haber sido establecidos .....	51
<b>Tabla 3.2</b> Tabla de contingencia de frecuencia y porcentaje de los factores de descarte en los cotiledones de la semilla de guarango .....	53
<b>Tabla 3.3</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes del efecto del tiempo y la concentración de NaClO sobre los factores de descarte en los cotiledones .....	54
<b>Tabla 3.4</b> Tabla de contingencia de frecuencia y porcentaje de los factores de descarte en ejes embriogénicos de la semilla de guarango .....	57
<b>Tabla 3.5</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes del efecto del tiempo y la concentración de NaClO sobre los factores de descarte en los ejes embriogénicos .....	58
<b>Tabla 3.6</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de la formación y ausencia de callo en cotiledones, evaluados a los 60 días .....	62
<b>Tabla 3.7</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de formación de callo en cotiledones, evaluados a los 15, 30, 45 y 60 días .....	64
<b>Tabla 3.8</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de las características macro-morfológicas de los callos formados en cotiledones .....	66
<b>Tabla 3.9</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de callos formados, callos embriogénicos y callos no embriogénicos en cotiledones, evaluados a los 60 días .....	69

<b>Tabla 3.10</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de la formación y ausencia de callo en ejes embriogénicos, evaluados a los 60 días .....	72
<b>Tabla 3.11</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de formación de callo en ejes embriogénicos, evaluados a los 15, 30, 45 y 60 días.....	73
<b>Tabla 3.12</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de las características macromorfológicas de los callos formados en ejes embriogénicos .	75
<b>Tabla 3.13</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de callos formados, callos embriogénicos y no embriogénicos en cotiledones, evaluados a los 60 días.....	78
<b>Tabla 3.14</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de formación de callo en cotiledones, evaluados a los 15, 30, 45 y 60 días .....	81
<b>Tabla 3.15</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes del color y textura de los callos formados en cotiledones .....	83
<b>Tabla 3.16</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes del color de los callos embriogénicos y no embriogénicos formados en cotiledones.....	85
<b>Tabla 3.17</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de la textura de los callos embriogénicos y no embriogénicos formados en cotiledones.....	86
<b>Tabla 3.18</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de callos formados, callos embriogénicos y no embriogénicos en cotiledones, evaluados a los 60 días.....	87
<b>Tabla 3.19</b> Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de callos formados, callos embriogénicos y no embriogénicos en cotiledones, evaluados a los 60 días.....	90

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> árbol de guarango ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ).....	8
<b>Figura 1.2:</b> partes de la semilla maduras de guarango ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ).....	13
<b>Figura 1.3:</b> Esquema general de las potenciales vías de generación masiva de plantas mediante inducción a callo .....	22
<b>Figura 2.1:</b> <b>A)</b> Vainas maduras del árbol de <i>Caesalpinia spinosa</i> <b>B)</b> Semillas maduras de guarango en estado de letargo, conservadas en el Banco de germoplasma del CIAC. <b>C)</b> Semillas escarificadas y reactivadas <b>D)</b> Cotiledones y ejes embriogénicos de guarango, fuera del periodo de latencia .....	37
<b>Figura 2.2:</b> <b>A)</b> Semillas de guarango sin testa. <b>B) y C)</b> Separación de los cotiledones y ejes embriogénicos .....	40
<b>Figura 2.3:</b> <b>A)</b> Eje embriogénico sembrado horizontalmente. <b>B)</b> Cotiledón sembrado con el lado abaxial en contacto con el medio de cultivo.....	41
<b>Figura 2.4:</b> <b>A)</b> Callo obtenido en la etapa de inducción. <b>B)</b> Callo observado al estereoscopio.....	48
<b>Figura 3.1:</b> Porcentajes de cotiledones y ejes embriogénicos vivos y descartados, evaluados a los 25 días de haber sido establecidos .....	52
<b>Figura 3.2:</b> Factores de descarte en cotiledones durante la fase de desinfección <b>A)</b> contaminación bacteriana <b>B)</b> contaminación fúngica <b>C)</b> necrosis del explante .	55
<b>Figura 3.3:</b> Diagrama de dispersión del análisis de componentes (tiempo de exposición de los cotiledones al hipoclorito vs la concentración de NaClO) de los tratamiento de desinfección para cada una de las condiciones de descarte .....	56
<b>Figura 3.4:</b> Factores de descarte en ejes embriogénicos durante la fase de desinfección <b>A)</b> contaminación bacteriana <b>B)</b> contaminación fúngica y <b>C)</b> necrosis del explante.....	59
<b>Figura 3.5:</b> Diagrama de dispersión del análisis de componentes (tiempo de exposición vs concentración de NaClO) de los tratamiento de desinfección para cada una de las condiciones de descarte en ejes embriogénicos.....	60
<b>Figura 3.6:</b> Porcentajes de callo formados en cotiledones a los 15, 30, 45 y 60 días en los tratamientos de inducción a callo.....	65
<b>Figura 3.7:</b> Fotografías de los callos formados en cotiledones: <b>A)</b> callo friable - translúcido del tratamiento T1, <b>B)</b> callo friable - translúcido del tratamiento T3, <b>C)</b> callo compacto-verde del tratamiento T5, <b>D)</b> callo compacto - crema del tratamiento T4 <b>E)</b> callo compacto - café del tratamiento T4.....	67

<b>Figura 3.8:</b> Análisis cluster jerárquico de los callos formados en los cotiledones, por combinación de conglomerados re-escalados .....	68
<b>Figura 3.9:</b> Porcentajes de callos embriogénicos y no embriogénicos en cotiledones, evaluados a los 60 días .....	70
<b>Figura 3.10:</b> Porcentajes de callo formados en ejes embriogénicos a los 15, 30, 45 y 60 días en los tratamientos de inducción a callo .....	74
<b>Figura 3.11:</b> Fotografías de los callos formados en ejes embriogénicos.....	76
<b>Figura 3.12:</b> Análisis cluster jerárquico de los callos formados en los ejes embriogénicos, por combinación de conglomerados re-escalados.....	77
<b>Figura 3.13:</b> Porcentajes de callos embriogénicos y no embriogénicos en cotiledones, evaluados a los 60 días .....	79
<b>Figura 3.14:</b> Porcentajes de callo formados en cotiledones a los 15, 30, 45 y 60 días en los tratamientos de inducción a callo.....	84
<b>Figura 3.15:</b> Fotografías de los callos formados en cotiledones .....	88
<b>Figura 3.16:</b> Análisis cluster jerárquico de los callos formados en los cotiledones, por combinación de conglomerados re-escalados .....	89
<b>Figura 3.17:</b> Porcentajes de callos embriogénicos, no embriogénicos y ausencia de formación de callo en cotiledones, evaluados a los 60 días.....	91
<b>Figura 3.18:</b> Corte histológico de callo (tratamiento T3).....	92

## LISTADO DE ANEXOS

<b>Anexo A:</b> Proceso de desinfección de los explantes.....	41
<b>Anexo B:</b> Composición de las sales minerales y vitaminas del medio Murashige & Skoog (1962).....	42
<b>Anexo C:</b> Composición de las sales minerales y vitaminas del medio Gamborg B5 (1968).....	42
<b>Anexo D:</b> Tinción de frotis con Acetocarmín 2% .....	92

## RESUMEN

Hoy en día varias son las consecuencias de la deforestación de los bosques en el Ecuador, bajo este panorama en el Distrito Metropolitano de Quito se ha creado proyectos de Forestación y Reforestación, con árboles y arbustos nativos, por lo que es necesario grandes cantidades de ejemplares, de tal manera, en el CIAC se están realizando investigaciones de especies nativas, por lo que el objetivo del presente estudio es desarrollar un protocolo de inducción a callo embriogénico a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa*, como fase inicial de la Embriogénesis somática indirecta, además del establecimiento de cultivos asépticos en primera instancia. Las variables de desinfección consistieron en el uso de dos concentraciones de NaClO (0,5 y 1,5%) durante dos tiempos de inmersión (5 y 10 min). Los resultados obtenidos arrojaron que el tratamiento con NaClO al 0,5% durante un tiempo de inmersión 5 min es el de mayor efectividad para el establecimiento de cotiledones, mientras que el tratamiento con NaClO al 0,5% durante 10 min es el de mayor efectividad para el establecimiento de ejes embriogénicos. En el ensayo preliminar de inducción a callo embriogénico los resultados indicaron que el tratamiento 1 (MS: 2,4 D  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + Kin  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el tratamiento 3 (MS: TDZ  $0,2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + AIA  $0,05\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) produjeron porcentajes considerables de formación de callo en cotiledones, mientras que en ejes embriogénico la respuesta de formación de callo embriogénico fue baja en todos los tratamientos aplicados. A partir de los resultados del ensayo preliminar de inducción se continuó con él estudió del potencial callogénico de los cotiledones, en donde en el medio MS suplementado con 2,4-D ( $4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + Kin ( $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se presentó porcentajes de formación de callo embriogénico del 100%. La macromorfología evidenció callos embriogénicos translúcidos y friables. El estudio histológico indicó una diferenciación de células embriogénicas en proceso de mitosis que presentaban estructuras características.

**Palabras claves:** callogénesis, cotiledones, ejes embriogénicos, morfológico, histológico, embriogénesis somática.

## ABSTRACT

Nowadays various are the consequences of deforestation of forests in Ecuador, under this scenario in the Distrito Metropolitano de Quito was created Afforestation and Reforestation projects with native trees and shrubs, making it large amounts of copies required, so, in the CIAC research is underway native species, so that the objective of this study is to develop a protocol to embryogenic callus induction from cotyledons and embryogenic axes of mature seeds of Guarango (*Caesalpinia spinosa*), as the initial phase the ES indirect, and the establishment of aseptic cultures in the first instance. Disinfection variants consisted in using two concentrations of NaOCl (0.5 and 1.5%) for two immersion times (5 to 10 min). The results showed that treatment with 0.5% NaClO during an immersion time of 5 min is the most effective for establishing cotyledons, while treatment with 0.5% NaClO for 10 min is the most effectiveness for establishing embryogenic axes. In the preliminary test embryogenic callus induction results indicated that treatment 1 (MS: 2.4 D  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + Kin  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and treatment 3 (MS: TDZ  $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + IAA  $0.05\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) resulted in significant percentages of callus formation in cotyledons, while axis response embryogenic embryogenic callus formation was low in all treatments. From the results of the preliminary test induction was continued callogénico study the potential of the cotyledons, where on MS medium supplemented with 2, 4-D ( $4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + Kin ( $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) percentages presented embryogenic callus formation was 100%. The macromorphology showed translucent and friable embryogenic callus. Histological examination showed an embryogenic cell differentiation mitosis presenting characteristic structures.

**Keywords:** callus formation, cotyledons, embryogenic axes, morphological, histological, somatic embryogenesis.

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del problema

El Ecuador es considerado como uno de los países con mayor biodiversidad del continente y del mundo. En cuanto a la flora se refiere cuenta con casi 25.000 especies vegetales diferentes, distribuidas en todo el país (Carrere, 1999), sin embargo la deforestación se ha venido acelerando desde los años 50, atribuyéndose en mayor porcentaje a las malas políticas agrarias, sociales y económicas, la sobre explotación de la industria maderera, la apertura de carreteras, la industria petrolera, camaronera y los monocultivos industriales (Varea & Ortiz, 1995).

Varias son las consecuencias de la deforestación que hoy en día ya nos están afectando a cada uno de los habitantes del planeta Tierra y que se puede unificar en una, que es la afectación grave de los suelos, puesto que la desaparición de la cubierta forestal favorece la erosión, que a su vez contamina y degrada los cursos de agua, derivándose en procesos de desertificación, afectando así a la flora y fauna que allí habitan y consecuentemente empeorando la calidad de vida de la mayoría de la gente (Carrere, 1999). Bajo este panorama se están tomando medidas retractorías, una de ellas es el mayor impulso de la reforestación con plantaciones forestales, es decir se habla de los *Beneficios de los Bosques Plantados*. La Organización de las Naciones Unidas-UNFF<sup>1</sup> sostiene, que los beneficios de los bosques plantados son básicamente los mismos que aquellos derivados de los bosques naturales y que la diferencia se encuentra más bien en una cuestión de manejo (Granda, 2006).

Hasta el año 2001, en el Distrito Metropolitano de Quito existía aproximadamente 9.000 hectáreas de bosques naturales y plantaciones forestales, pero son necesarias por lo menos el doble de hectáreas de cubierta forestal para amortiguar los impactos ambientales negativos producidos por la urbanización expansiva, la alta tasa de deforestación, el aprovechamiento irracional de recursos naturales, la evacuación de contaminantes al suelo, agua y aire, los equipos camineros, la actividad industrial, las actividades agropecuarias y la emisión de gases de vehículos, por ello el MDMQ<sup>2</sup> ha creado proyectos de Forestación y Reforestación, con objetivos específicos como son: el forestar el territorio del DMQ<sup>3</sup>, con árboles y arbustos nativos e introducirlos anualmente; además, se proyecta producir al menos un millón de plantas forestales de especies nativas e introducirlas y adaptarlas a los diferentes pisos climáticos de Quito.

La necesidad de grandes cantidades de ejemplares de especies nativas forestales demandadas por el MDMQ en los proyectos de Forestación y Reforestación no ha podido ser cubierta por los viveros de la Empresa Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas EPMMOP-Q, ya que la multiplicación de forestales tiene ciertas limitaciones, y es que los viveros utilizan prácticas tradicionales de cultivo y producción en la silvicultura, al igual que en el mejoramiento de árboles forestales además, el inconveniente de la obtención rápida y masiva de ejemplares forestales debido al largo ciclo de vida de estos, la dificultad de distinguir siempre entre la expresión fenotípica y los efectos ambientales, la gran cantidad de mano de obra y el amplio espacio en el campo experimental que se requiere, entre otras causas demandan recurrir a nuevas y mejores opciones como el cultivo *in vitro* que permite en cada caso solucionar inconvenientes imposible de superar por los métodos tradicionales.

---

<sup>1</sup>UNFF: Foro Forestal de las Naciones Unidas (siglas en inglés).

<sup>2</sup>MDMQ: Municipio del Distrito Metropolitano de Quito.

<sup>3</sup>DMQ: Distrito Metropolitano de Quito.

En el Laboratorio de Micropropagación del Centro de Investigaciones Ambientales de Cununyacu (CIAC) de la EPMMOP-Q se está realizando investigaciones de micropropagación de especies nativas, necesarias para los proyectos de forestación y reforestación, de manera que se tiene ya protocolos de propagación *in vitro* a partir de plántulas y *ex vitro* a partir de semillas de guarango (especie nativa), sin embargo lo que se quiere hacer ahora para esta planta es optimizar y viabilizar la callogénesis como primera fase de un método de micropropagación masivo como es la embriogénesis somática que potencializa una vía rápida y más eficiente de multiplicación clonal, mejorando así los métodos tradicionales de multiplicación *in vitro* y *ex vitro* ahora existentes y aplicados para el guarango.

## **1.2 Justificación del problema**

El Laboratorio de Micropropagación del CIAC quiere dar sentido agronómico a diferentes biotecnologías de aplicación, por lo que el cultivo de tejidos de genotipos valiosos, de meristemos libres de virus, de células transformadas, de semillas, etc., no sirve de nada desde un punto de vista aplicado si de ellos no es posible conseguir la multiplicación en masa de dichos genotipos selectos, obtener plantas saneadas o lograr plantas transgénicas, en condiciones económicamente viables y de conservación nativa (Celestino *et al.*, 2007).

Mediante el presente trabajo se busca introducir un procedimiento innovador, ya que no existe investigaciones concernientes a la callogénesis, para la obtención de callo embriogénico a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semilla maduras de guarango (*Caesalpinia spinosa*), precedente substancial para el proceso de embriogénesis somática indirecta en la especie forestal nativa referida, que contribuirá a la silvicultura clonal de alta productividad, con calidad de productos y subproductos elevada, menor impacto de enfermedades y

conservación fundamentada en su importancia ecológica, agroforestal, económica, industrial del guarango necesarias para los programas de reforestación planteados.

Por otra parte, como lo citan Nieto *et al.*, (2006) el guarango es considerado como una especie nativa forestal que está en peligro de extinción, en cuanto a que muchos de los árboles remanentes de su especie que se encuentran dispersos en los valles de la Sierra se han escapado de la tala indiscriminada que ha sufrido la especie con fines utilitarios: para leña, carbón y usos caseros de su madera. Esta especie tiene un potencial superior a fines utilitarios, en cultivos asociantes ya que es una leguminosa que nitrifica al suelo, mejorando su fertilidad y su capacidad productiva, además es una variedad perenne, siendo la opción ideal para programas de agrosilvicultura y para suelos propensos a la erosión (Nieto *et al.*, 2006). Adicional a dichas pericias su valor económico e industrial más relevante, está sustentado por el alto contenido de taninos que se obtienen de sus vainas (Mancero, 2008), convirtiéndose en un producto de exportación ambicionado por sus precios competitivos en comparación a los taninos elaborados artificialmente y también por que sin duda alguna va a beneficiar significativamente a la economía campesina que cultive ésta planta e indirectamente a la economía urbana e industrial del país (Flores & Chávarry, 2005). Como se demuestra no sólo existe un mercado potencial garantizado para productos y subproductos del guarango a nivel industrial, sino también a nivel ambiental por sus bastas características de salvaguardar el medio ambiente, que pretenden actualmente en MDMQ.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo General**

- ✓ Inducir a la formación de callo embriogénico a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de árboles de Guarango (*Caesalpinia spinosa*) para promover una vía de proliferación masiva.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Desarrollar un protocolo de desinfección efectivo para el establecimiento *in vitro* de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de Guarango.
- ✓ Determinar el medio de cultivo más adecuado para la inducción a callo embriogénico en cotiledones y ejes embriogénicos.
- ✓ Evaluar el efecto de las combinaciones y concentraciones de los reguladores de crecimiento en la fase de inducción a callo de cotiledones y ejes embriogénicos.
- ✓ Analizar de manera morfológica e histológica los callos generados en la fase de inducción.

## **1.4 Marco Teórico**

### **1.4.1 Guarango (*Caesalpinia spinosa*)**

El guarango es una planta multifuncional y de excelente adaptabilidad ya que posee un inmenso potencial mejorador de suelos, medicinal, alimenticio e industrial, siendo en este último de gran provecho para la producción de taninos, hidrocoloides o gomas y ácido gálico, entre otros y con una proyección de demanda mundial insatisfecha de taninos no vegetales puros de más de 300 mil toneladas métricas anuales, para el año 2011 (Basurto, 2009).

Una iniciativa de forestación productiva en la que se ha incluido al guarango ha sido promovida por la Fundación Desde el Surco, en colaboración con otras instituciones iniciado y ejecutado la propuesta del Consorcio Nacional de Productores de Guarango, CONAPROG, que es un proyecto de participación voluntaria de todos los propietarios de tierras aptas para integrar al productor como socio en el acopio, procesamiento y comercialización de los subproductos del guarango, queriendo lograr el volumen y la calidad de producción necesarios para satisfacer la demanda del mercado internacional (Nieto *et al.*, 2006), esto en cuanto a una visión agroproductiva.

En cuanto a una iniciativa de reforestación y arborización de las áreas verdes con especies nativas, es la que se está dando en el Distrito Metropolitano de Quito y tiene como objetivo al momento sembrar especies como Alisos, Pumamaqui, Molles, Arupos, Guarangos en varios sectores de la ciudad.

El guarango es una especie que debe ser conocida y reconocida por todo su potencial forestal y productivo conjuntamente en el aporte para la recuperación y fortalecimiento de suelos explotados, deforestados o en asociación con

sembríos, sin olvidar que se potencializa como una opción distinta para la mejora de la economía agrícola.

#### **1.4.2 Descripción botánica**

El guarango es un árbol pequeño ramificado de tipo leguminoso – leñoso que crece de 4 a 8 metros de altura, ocasionalmente 10 m y 30 cm de diámetro en condiciones favorables de suelo y agua, el sistema radicular está compuesto por raíces pivotantes profundas y raíces secundarias abundantes (Mancero, 2008).

La copa es muy frondosa, alcanza un diámetro de hasta 15 m; las ramitas contienen espinas pequeñas. Las hojas son compuestas, bipinadas, alternas en espiral, con 6 a 8 pares de folíolos ovalados de 3 cm de largo por 2 cm de ancho, de color verde césped. Las flores en inflorescencias en racimos de 40 a 100 flores hermafroditas que poseen un cáliz con 5 sépalos y corola con 5 pétalos amarillos con manchas rojizas, 10 estambres y un pistilo con estilo encorvado, ovario súpero. Los frutos son legumbres aplanadas y curvas, que cambian de color, según su madurez de verde a rosado y finalmente rojo parduzco; de 5 a 10 cm de largo y 1 a 3 cm de ancho; contienen hasta 10 semillas. Las semillas son aplanadas, color café negruscas cuando maduras (Mancero, 2008).

*Caesalpinia spinosa* es un árbol nativo de los Andes (Jørgensen & León-Yáñez, 1999) que crece, de forma silvestre o cultivada, en varios países de la región andina de Sudamérica. Tiene varios nombres comunes para cada uno de los países donde se encuentra, sin embargo en relación al nombre de “guarango” (huarango) proviene del sonido Quechua WARAN-KU, que traducido al castellano significaría: “amanecer”, pudiéndose haberse originado por la naturaleza longeva de este ancestral árbol tawantinsuyano.



**Figura 1.1:** árbol de guarango (*Caesalpinia spinosa*). (Riveros, 2008 & Basurto, 2009).

### 1.4.3 Identificación de la especie

**Tabla 1.1** detalle de la identificación del guarango según Fonsefor.

<b>Nombre científico</b>	<i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) O. Kuntze <sup>1</sup> .
<b>Nombre común</b>	"Tara", "taya" (Perú); "guarango", "cuica", "tara" (Colombia); "vinillo", "guarango" (Ecuador); "tara" (Bolivia, Chile, Venezuela), "acacia amarilla", "dividi de los Andes" (Europa).
<b>Sinónimos</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- <i>Caesalpinia tinctoria</i> (H. B. K) Bentham ex Reiche.</li><li>- <i>Poinciana spinosa</i> Molina.</li><li>- <i>Caesalpinia pectinata</i> Cavanilles.</li><li>- <i>Tara spinosa</i> (Molina) Britt &amp; Rose.</li></ul>
<b>Familia</b>	<u>Caesalpinaceae</u> (Leguminosae: Caesalpinoideae). Comprende unos 150-180 géneros y más de 2.200 especies pantropicales y subtropicales.
<b>Etimología</b>	<i>Caesalpinia</i> , en honor de Andrea Caesalpini (1524-1603), botánico y filósofo italiano. <i>Spinosa</i> , del latín <i>spinosus-a-um</i> , con espinas.

Fuente: Fonsefor – Intercooperation - Samiri (2006) y Reynel, C. & León, J. (1990).

<sup>1</sup> El nombre genérico fue creado por Lineo en 1753 con base en el nombre del filósofo, médico y naturalista italiano Andrea Cesalpino (1594-1663); el nombre específico *spinosa* se explica por sí mismo. El botánico Molina había puesto esta especie originalmente en el género *Poinciana* en 1782, pero el botánico Kuntze lo cambió a *Caesalpinia* en 1898, y ése es el género más aceptado actualmente. Los botánicos estadounidenses Rose y Britton también lo colocaron en el género *Tara* en 1930: la combinación *Tara spinosa* se puede encontrar con cierta frecuencia.

**Tabla 1.2** Clasificación taxonómica según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>Superdivisión</b>	Spermatophyta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Fabales
<b>Familia</b>	Fabaceae o Leguminosae
<b>Género</b>	Caesalpinieae
<b>Especie</b>	<i>Caesalpinia spinosa</i>

Fuente: USDA (<http://www.plants.usda.gov>), 2008

#### 1.4.4 Distribución geográfica

Se distribuye, abarcando diversas zonas áridas en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia hasta el norte de Chile. Su distribución altitudinal óptima está entre los 1500 a 3100 msnm, con un rango de precipitación promedio de 230-500 mm de lluvia anual. (Reynel & León, 1990).

En el Ecuador está en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Azuay y Loja (Jørgensen & León-Yáñez, 1999). Se encuentra principalmente en las formaciones conocidas como valles secos interandinos (Narváez *et al.*, 2009).

### 1.4.5 Enfermedades

El guarango no presenta mayores problemas de plagas ni enfermedades, no obstante se ha evidenciado la presencia de manchas blancas (*Oidium*), asociadas a las queresas y áfidos en hojas y en frutos verdes (Mancero, 2008).

➤ Según Coca (2009) algunas enfermedades pueden afectar el cultivo y llegar a ser “destruccionas” y otras alcanzan a mantenerse como enfermedades “crónicas”, pero, potenciales, por lo que el *Oidium*, es una enfermedad foliar que afecta en la producción de plántulas en vivero y plantas adultas en campo. Esta enfermedad es fácilmente reconocible por la apariencia blanquecina y polvorienta que se ve sobre las hojas.

➤ Las queresas que atacan a las vainas son de las especies como *Pinnaspis* sp. y *Coccus herperidium* Posteriormente se vuelve negra (Fumagina), razón por lo cual se le llama “guarango quemado”, que no tiene buena aceptación en el mercado (Basurto, 2009).

➤ El *Aphis craccivora* es un áfido que ataca principalmente a las vainas y en menores instancias a hojas, flores y tallos.

➤ El marchitamiento de las plántulas de guarango es la principal enfermedad en viveros, ya que la incidencia y severidad puede ser alta, en dependencia del origen y calidad de sustrato utilizado y humedad del suelo. También en plantaciones en el campo, se presenta el marchitamiento, aunque con baja incidencia (Basurto, 2009).

➤ El guarango no es susceptible a nematodos (Mancero, 2008).

#### **1.4.6 Silvicultura y manejo de las semillas**

Al señalar la unidad de reproducción sexual de las plantas, estamos hablando de las semillas que tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie. La semilla de guarango es dicotiledónea y consta esencialmente de un embrión (formado por un eje embrionario o embriogénico y dos cotiledones), una provisión de reservas nutritivas, que pueden almacenarse en un tejido especializado (albumen o endospermo) y en el propio embrión, y una cubierta seminal que recubre y protege a ambos. Para el cumplimiento del objetivo de la semilla es necesario que el embrión se transforme en una plántula, que sea capaz de valerse por sí misma y, finalmente convertirse en una planta adulta (García, 2003).

El guarango tiene una gran variabilidad en producción de semillas, puesto que existen árboles que producen 5 kg y otros que producen 40 kg; aquellos aislados, muy grandes y con buen abastecimiento de agua pueden llegar a producir 120 kg.año, pero también varían en contenido de taninos entre plantas, así como en el contenido de goma, por cuanto es conveniente identificar y seleccionar los árboles para la obtención de semillas de calidad (ProFound – Advisers In Development, 2008).

En cuanto a la variedad, Barriga (2008) señala que no existe uniformidad por lo que ya se han realizado estudios de la diversidad genética y el contenido de taninos por medio de estudios moleculares y bioquímicos (Narváez *et al.*, 2009), ideal para encontrar una variedad o ecotipo que produzca frutos con alto contenido de taninos y gomas con fines de industrialización.

La producción de frutos de guarango se inicia a partir del quinto año, de su plantación en campo definitivo y alcanza una producción estable a partir del año

15, con una permanencia de hasta 50 años o más. Según la literatura, el ciclo productivo es prolongado, puede llegar hasta a 80 años (Nieto *et al.*, 2006).



**Figura 1.2:** partes de la semilla maduras de guarango (*Caesalpinia spinosa*) (Ortega, 2012).

Las semillas maduras de guarango presentan una capacidad germinativa que oscila entre 80 y 90%, con germinación epigea que se inicia entre los 8 a 12 días y finaliza a los 20 días para lo cual requiere un método de escarificación como tratamiento pre-germinativo, para acelerar y uniformizar la germinación, ya que estas semillas presentan una testa dura en semillas maduras (Basurto, 2009).

#### **1.4.6.1 Métodos de escarificación**

Las semillas maduras de guarango poseen una cubierta dura que impide la fácil imbibición de agua y a veces también el intercambio de gases necesarios para la renovación del crecimiento embrionario y la germinación. Esta latencia física de la cubierta se da sobre todo en especies adaptadas a la alternancia de estaciones secas y húmedas, como los géneros de leguminosas (Willan, 1991), por lo que es necesario aplicar métodos de escarificación para facilitar la imbibición de agua retornando así la viabilidad de las semillas.

Un método de escarificación comúnmente utilizado es por remojo en agua; se utiliza 5 partes de agua -caliente o hirviendo- por 1 de semillas o ponerlas en ácido sulfúrico, pero estos métodos no siempre son satisfactorios ya que se requiere un control estricto. Para el método por remojo, los parámetros críticos son el tiempo y la temperatura durante la inmersión, la cual depende parcialmente del volumen de agua por semilla y sobre todo tomar en cuenta si se trata grandes cantidades de semillas durante el tratamiento. Mientras que para el método con ácido son la eliminación de grandes cantidades del mismo y los riesgos para su salud (Humblebaek, 1995).

En cuanto a los equipos de escarificación existen varias opciones según la necesidad y cantidad de semilla tratada. Según Humlebaek (1995) se puede señalar:

La pistola de semillas, trabaja con cantidades grandes de semilla, lanzando las semillas contra la pared de un cilindro metálico que gira a una velocidad de alrededor de 30 m/s. La pared es hueca y llena de arena seca. El impacto mecánico ocasiona pequeñas fisuras invisibles en las capas exteriores de la testa de la semilla (Poulsen & Stubsgaard, 2000).

El cautín o quemador incandescente, es un método manual y por consiguiente limitado a cantidades menores de semillas. Este método se utiliza ampliamente en pruebas de germinación en el laboratorio, y es muy eficaz, pudiéndose procesar cien semillas en dos o tres minutos. La punta del cautín (o cualquier punta de la varilla de hierro al rojo incandescente) toca la testa por medio segundo se forma un pequeño agujero y algunas rajaduras se hacen en la capa exterior impermeable de la testa de la semilla (Poulsen & Stubsgaard, 2000).

El quemador mecánico, es un cilindro con una ranura longitudinal gira a 20 revoluciones por min. Cuando la ranura pasa el embudo que contiene las semillas sin tratar, recoge una hilera de semillas, después de  $\frac{3}{4}$  de revolución, la ranura con las semillas se encuentran sobre un plano inclinado en el otro lado del cilindro. Aquí las semillas se salen de la ranura y se deslizan por el plano inclinado hasta que las detiene una barra que atraviesa el plano. Justo al frente de la barra hay una hendidura en el plano, en donde se coloca un alambre rojo incandescente de 0.65 mm de diámetro y 32 cm de largo. Las semillas se queman por el lado plano ya que tienden a asentarse sobre este costado. Este método es aplicable a cantidades grandes de semillas tratadas (Poulsen & Stubsgaard, 2000).

#### **1.4.7 Propiedades y usos**

El guarango es una especie forestal nativa, leguminosa que posee un amplio potencial médico, alimenticio e industrial, siendo de gran utilidad para la producción de hidrocoloides o gomas, taninos y ácido gálico, entre otros. Además, es utilizada en la protección de suelos, especialmente cuando no se dispone de agua de riego, a fin de dar buena protección a muchas tierras que hoy están en proceso de erosión (Basurto, 2009), ya que tiene la capacidad de fijar Nitrógeno atmosférico al suelo, mejorando su fertilidad y su capacidad productiva. Se usa frecuentemente en asociación con cultivos como el maíz, papa, habas, alfalfa, sorgo o pastos. No ejerce mucha competencia con los cultivos, por su raíz pivotante y profunda tampoco por su copa ya que no es muy densa y deja pasar la luz. Debido a su pequeño porte y a su sistema radicular profundo y denso, es preferida para barreras vivas, control de cárcavas y otras prácticas vinculadas a conservación de suelos en general, sobre todo en zonas áridas o semiáridas (Nieto *et al.*, 2006).

El aprovechamiento de los frutos permite obtener numerosos productos de interés. Una de ellas, es la producción de vainas y semillas de las cuales se extrae una serie de productos, destacándose la presencia de taninos en la vaina

considerados una alternativa interesante (De la Cruz, 2004). Las vainas presentan un contenido de taninos entre 40 y 53%. Los taninos son sustancias astringentes y de sabor amargo que son utilizados principalmente en:

- Curtir pieles, por su capacidad de precipitar las proteínas;
- La fabricación de plásticos y adhesivos;
- Como sustituto de la malta en la fabricación de cerveza;
- Clarificar vinos;
- Agentes de pigmentación para la aplicación de tintes en tejidos;
- En la industria del caucho;
- En cosmetología;
- En el mantenimiento de pozos de petróleo;
- En protección de metales;
- En pinturas por su acción anticorrosiva;
- En la industria farmacéutica por su condición de bactericida, fungicida y antiséptica;
- En la medicina moderna y tradicional.

Además, de la semilla de guarango se puede obtener harina o pasta con alto contenido de proteínas, para uso alimenticio humano y animal. Se extrae aceites y gomas, que se usan como espesantes en la fabricación de yogurt, salsas, mostaza, mermeladas, helados y otros. Las semillas constituyen un segundo producto de aplicación industrial y comercial. Por lo expuesto, los frutos y semillas de guarango son productos con una alta demanda nacional e internacional (Nieto *et al.*, 2006).

Otro producto obtenido de la especie es el ácido gálico, utilizado como antioxidante en la industria del aceite y en la industria cervecera como un elemento blanqueador o decolorante, así como en productos relacionados con

fotografía, tintes, manufactura del papel, farmacia y grabado o litografía (De la Cruz, 2004). Consecuentemente, ya que es una especie forestal su madera es apta para la industria maderera a nivel macro y para actividades de área local como construcciones, herramientas, artesanías entre otras opciones.

#### **1.4.8 Demanda y producción**

Cerca del 80% de la producción mundial de guarango tiene lugar en Perú, sus centros de producción están en los departamentos de Cajamarca, Ayacucho, Ancash, La Libertad y Lambayeque. Sabiendo que el producto proviene principalmente de bosques naturales, aunque en los últimos años ha existido la tendencia creciente a plantar esta especie, además, también es cultivada en China y en la India (ProFound – Advisers In Development, 2008).

En Ecuador los árboles se encuentran a lo largo de toda la región interandina, aunque las provincias productoras más importantes son Imbabura, Loja y Chimborazo. En la provincia de Bolivia, el guarango se encuentra mayormente en estado silvestre, principalmente en tres departamentos: Cochabamba, Santa Cruz y el norte de Potosí (Mancero, 2008).

Así, el guarango resulta una alternativa ideal para incursionar con éxito las nuevas demandas comerciales mundiales, ya que la producción agropecuaria tradicional ha perdido competitividad y más todavía, a partir de la vigencia de esquemas de liberación comercial, por la que muchos productos agropecuarios tendrán que salir de los mercados precisamente por falta de competitividad con productos similares, que vendrán y ya están ingresando de afuera (Nieto *et al.*, 2006).

Industrialmente a nivel internacional hay una tendencia a la utilización de productos menos contaminantes, lo que se refleja, en la prohibición de la Comunidad Europea del uso de elementos como plomo, mercurio, cadmio y cromo para el curtido de los cueros usados en automóviles a partir de 2006, lo que sin duda representa un incentivo para el empleo masivo de productos de origen vegetal que carecen de esos elementos, como el guarango (Mancero, 2008).

En programas de reforestación, la plantación masiva del guarango en parcelas biodiversas, permite recuperar suelos erosionados, mejorar el paisaje local y subir la plusvalía de los predios involucrados, además es ideal para cubrir zonas buffer de las áreas protegidas y remanentes de bosques Andinos, Adicional a esto, esta especie funciona bien bajo el concepto de cadena agro productiva, conectando la reforestación (Nieto, 2011).

#### **1.4.9 Conservación de especies forestales**

La conservación de especies vegetales con fines de conservación permite no sólo redimir especies de la flora en peligro del DQM sino también está adquiriendo cada día más relevancia como parte de una estrategia para conservar la diversidad biológica existente, progresar en la producción de plantas con el objeto, de recuperar la estructura florística, los bosques y la vegetación nativa, ya que las actividades agrícola y forestal, así como la expansión acelerada de la ciudad, industrias y complejos turísticos, generando degradación de ecosistemas naturales, pérdida de hábitats y, como consecuencia, la extinción local de especies, sin contar con otros factores, como la constante degradación por pastoreo y desertificación (Palmberg, 1980).

Según Gold, León-Lobos & Way (2004), los bancos de semillas y los jardines botánicos son los métodos más comunes para conservar la diversidad biológica vegetal *ex situ*. Los primeros, en particular, permiten conservar por

mucho tiempo y en un espacio reducido muestras representativas de diversidad genética de una gran cantidad de especies de plantas y así mismo la semilla es la forma más práctica y eficiente para recolectar, transportar, estudiar y almacenar la diversidad vegetal, por corresponder a un estado compacto, resistente e independiente dentro del ciclo de vida de una planta, puesto que cada una de ellas es, potencialmente, un nuevo individuo que contiene parte de la variabilidad genética presente en toda una población (Gold *et al.*, 2004), aunque según los avances biotecnológicos hoy podemos impulsar la producción de más de un ejemplar por parte de una sola semilla.

Las colecciones de semillas de alta calidad pueden representar la diversidad genética de una población de plantas desde donde fueron recolectadas y proveer materiales para conservación *ex situ* (conservación fuera del hábitat natural, como fuente de recuperación o sobre producción). Además de su contribución a la conservación integrada de especies, los bancos de semillas aportan a la restauración y conservación ecológica, al proveer material para multiplicación y estudios de diversidad genética e información, que permiten decidir reintroducción en caso de ser necesario y, manejo *in situ* (en el hábitat natural) según el caso (Gold *et al.*, 2004).

#### **1.4.10 Biotecnología Vegetal en especies forestales**

En la actualidad, estamos entrando en una nueva era de la agricultura, conjuntamente con nuevas biotecnologías, debiéndose a un auge enfático de los conocimientos básicos de biología vegetal y a la aplicación de las técnicas de Ingeniería, Fisiología Vegetal y Genética, es así que la denominada “revolución agrícola” ya no dependerá de improvisaciones mecánicas o químicas, sino estará basada en un uso intensivo del conocimiento científico y de técnicas moleculares y celulares (Acuña, 2007).

Primariamente el mejoramiento de los árboles se realizaba teniendo en cuenta sólo sus características agronómicas y es que en el desarrollo de una planta el tiempo que debe esperar un investigador desde la germinación de una semilla hasta que el estado de adulto es, sin duda, mucho tiempo y más aún en especies forestales, por lo que el objetivo primordial del investigador es acortar dicho tiempo y aumentar la cantidad de ejemplares ya que la mayoría de las características de interés económico están determinadas por el genotipo, el éxito del mejoramiento se basa en el manejo correcto de los recursos genéticos disponibles, es decir que se busca un aumento de la productividad y de la calidad del producto (Buitrago & Torres, 2008)., estas nuevas alternativas permitirán disminuir la amenaza que provoca la permanente extracción o mal uso de productos derivados de los pocos bosques nativos existentes en el DQM.

Las biotecnologías modernas que se utilizan actualmente en el sector forestal pueden clasificarse en tres grandes categorías:

#### **1.4.10.1 Modificación genética de especies forestales (árboles transgénicos)**

Luego de varias investigaciones se ha podido realizar plantas de soya y maíz transgénicos, implantándoles nuevos genes para que sean tolerantes a herbicidas o resistentes a insectos. A si mismo, a las especies forestales se les pueden incorporar genes que mejoren su crecimiento, resistencia a enfermedades, calidad de su madera, características requeridas esenciales en forestales (Buitrago & Torres, 2008).

#### **1.4.10.2 Tecnologías de multiplicación vegetativa**

Este tipo de técnicas tienen como objetivo la producción de materia prima uniforme a gran escala, en condiciones de laboratorio también puede utilizarse para seleccionar características tales como la resistencia a enfermedades y la

tolerancia a herbicidas, a metales, a altas concentraciones de sal, a bajas temperaturas, etc. Además usando estas nuevas técnicas para generar árboles que han mostrado tener buenas características: se eligen los ejemplares que mejor representan la característica deseada, y a partir del cultivo de sus células se obtienen individuos genéticamente idénticos al original (clones). Los clones se logran mediante técnicas de organogénesis (se induce la formación de órganos o tallos) y de embriogénesis somática o asexuada (en el cultivo se reproducen todas las fases de desarrollo de un embrión, hasta generar la nueva planta). Con estas técnicas se pueden obtener árboles con un sello genético característico, genéticamente diferenciados, también llamados “elite” (Acuña, 2007).

La Biotecnología Vegetal actual proporciona diversas herramientas para un mejor conocimiento de las características genéticas del ser vivo utilizado en las actividades forestales, el árbol, así como para producir en masa plantas mejoradas y para conservar dichos recursos genéticos (Toribio & Celestino, 2000).

Para la regeneración de forestales se puede tomar directamente varios tipos de explantes ya que las células vegetales cultivadas *in vitro* poseen totipotencialidad establecido por (Reinert, 1958 y Steward *et al.*, 1958), en virtud de esta característica del tejido vegetal, es decir, de su capacidad para formar yemas y raíces adventicias, casi cualquiera de los órganos de una planta vascular tiene relación con su propagación vegetativa al sufrir modificaciones anatómicas y funcionales que le permiten desarrollarse en un organismo vegetal completo e independiente, con las mismas características genéticas de la planta progenitora (Vázquez *et al.*, 1997) dándose una gran variedad de posibilidades biotecnológicas para dicha regeneración como es: caulogénesis, organogénesis, embriogénesis somática, entre otras.



La característica más importante de aquellos callos formados es la viabilidad que tengan para generar raíces, tallos y embriones somáticos, capaces de regenerar plantas completas y aunque el gran inconveniente del uso de callos es la inestabilidad genética que da como resultado variaciones fenotípicas en las células (González *et al.*, 2002) es una vía importante para la proliferación masiva de futuras plantas de grado recalcitrantes, en peligro de extinción, o de alta comercialización.

La embriogénesis somática es uno de los métodos más ventajosos de propagación masiva de plantas por su alta tasa de multiplicación, desarrollo y transformación de embriones somáticos en plantas, pero previo a ello, la callogénesis es el primer paso crucial hacia la generación de embriones somáticos (Hernández *et al.*, 1999), pero debido a múltiples factores adversos al cultivo como la contaminación, microbiana mala manipulación del material inicial, condiciones del explante y por la falta de investigaciones previas en las cantidades de algún componente de los medios de cultivo como son los reguladores del crecimiento, en su estudio y descripción se hacen complejos tanto para su obtención como para su estudio (Hidrobo, Ardisana & Hernández, 2002).

#### **1.4.12 Embriogénesis somática en especies forestales**

La embriogénesis somática asexual o adventicia es la formación de un embrión sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat, Esan & Murashige, 1979) a partir de una célula de cualquier parte de la planta como por ejemplo ápices radiculares y caulinares, hipocótilos, cotiledones, pecíolos, pedúnculos, hojas jóvenes y en general tejidos y órganos con características embrionarias, meristemáticas, reproductivas (embriones e inflorescencias inmaduras, trozos de escutelo, nucela, óvulos, tejido ovárico y endospermo) (Sánchez, 2000), resaltando que esto no es un fenómeno artificial y que es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia, descrita

por el científico Strasburgues en 1878, aunque Reinert, Steward y demás colaboradores en 1958 fueron quienes dieron crédito por primera vez a la descripción de la embriogénesis somática (Freire, 2003).

Una vía de regeneración apropiada para las especies forestales frente a la organogénesis es la embriogénesis somática, en la que el coste y el tiempo de desarrollo del propágulo obtenido es fundamental a nivel industrial. En los últimos quince años se han incrementado los estudios en el campo Biotecnológico, debido a todas sus ventajas potenciales, con un cierto énfasis en la silvicultura de coníferas, debido a que se están llevando a cabo amplios programas que se basan en los cultivos embriogénicos según lo dicho por Park, Barrett & Bonga (1998), destacando en primer lugar que presenta unas elevadas tasas de multiplicación mediante la embriogénesis secundaria o recurrente lo que asegura el aumento de individuos seleccionados de manera vertiginosa. Por otra parte, los cultivos embriogénicos suelen presentar una tolerable capacidad para la crioconservación, manteniendo todo su potencial de propagación y óptima estabilidad genética (Martínez *et al.*, 2010).

Como se indicó anteriormente, la embriogénesis somática ofrece muchos beneficios, pero también existe contrariedades en esta vía de regeneración, como es alcanzar la automatización del proceso y por tanto su abaratamiento, radican en la necesidad de lograr cultivos simultáneos, mejorar el proceso de maduración y lograr la inducción en tejidos procedentes de árboles adultos (Merkle, 1995). Actualmente existen publicadas investigaciones de regeneración por embriogénesis somática en ciertas especies forestales con mayor incidencia en estudios de coníferas, además en los últimos años se han realizado trabajos que indican la eventual obtención de embriogénesis somática a partir de individuos adultos, abriendo la posibilidad para la conservación *ex situ* de especies que

tienen dificultades de reproducción sexual, presentan riesgo de extinción como son las especies nativas en nuestro país (Toribio & Celestino, 2000).

Vía *in vitro* existen dos tipos de embriogénesis somática: directa e indirecta. La vía directa involucra la generación de células somáticas predeterminadas a seguir la ruta embriogénica y las células del explante primario se desarrollan para formar embriones, mientras que en la vía indirecta es necesaria una etapa de inducción a callo y su continua proliferación para que las células sigan la ruta embriogénica (Martínez *et al.*, 2004).

#### **1.4.13 Factores que intervienen en la callogénesis y en la embriogénesis somática**

En el proceso de callogénesis se comprende varios factores intracelulares y extracelulares, así como factores químicos, físicos y ambientales que influyen de manera directa e indirecta a la formación de callo en el explante.

##### **1.4.13.1 Tipo de explante**

Si se considera a la totipotencialidad de los explantes y/o tejidos vegetales, potencialmente todos estos tienen la capacidad de formar callos *in vitro*, pero en la realidad y de manera limitada pocos son los explantes que tienen dicha capacidad para producir callos embriogénicos. Por tal motivo, la elección adecuada del explante constituye uno de los factores primordiales para cubrir los objetivos de una investigación planteada (Roca & Mroginski, 1991).

Para el desarrollo de las estructuras embrionarias en la embriogénesis somática a partir de callos, Manzanilla, 2004, enuncia que se ha utilizado para la inducción una gran variedad de explantes de plantas, como embriones cigóticos, semillas geminadas, embriones inmaduros y maduros, cotiledones, ejes

embriogénicos, brotes meristemáticos, inflorescencias inmaduras, óvulos, microesporas, estigmas, estilo, hojas, nucelas, dependiendo además del genotipo de la especie vegetal y el estado de desarrollo de la planta donadora, ya que en ciertas ocasiones la utilización de tejidos muy jóvenes no permiten que se desarrollen embriones pero sí con el tejido maduro o también puede ocurrir el caso contrario (Freire, 2003).

Dos tipos de tejidos jóvenes mantienen la totipotencia celular: los meristemas apicales o axilares y tejidos inmaduros o tejidos de semillas recién o en el proceso de germinar (Santangelo, 2000).

#### **1.4.13.2 Asepsia**

En el establecimiento de los cultivos *in vitro* la contaminación es uno de los principales problemas que se debe controlar y es que dicha contaminación pueden ser con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). Muchos son los envases utilizados en el cultivo *in vitro* por lo que el ambiente generado por explante-medio de cultivo-condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos, ya que en el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican (Mroginski, Sansberro & Flaschland, 2010).

Para evitar y/o minimizar las contaminaciones de los cultivos con microorganismos es necesario:

- 1) Conocer el material vegetal con que se trabaja y los posibles contaminantes específicos.

2) Realizar una adecuada preparación de la planta dadora de explantes, cultivándola preferentemente en invernaderos tratadas con productos químicos que eliminen patógenos y eventuales microorganismos endófitos.

3) Proceder a la desinfección superficial de los explantes mediante el uso de compuestos químicos con el objeto de eliminar los microorganismos con el menor daño posible para el explante. Si bien no es posible recomendar un procedimiento general, se puede señalar que el procedimiento más popularizado consiste en una doble desinfección mediante la inmersión de los explantes en etanol (70%v/v) durante 20-60 segundos seguido de hipoclorito de sodio 1 -3%, contenido en el agua de lavandina comercial, durante 3 a 30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explante (Mroginski *et al.*, 2010).

Las células vegetales presentan largos tiempos de duplicación en comparación con las células microbianas, por lo que es necesario mantener los cultivos exentos de contaminación por microorganismos. Una sola célula bacteriana puede invadir y matar rápidamente a un tejido cultivado. Adicionalmente, se menciona como una de las ventajas del cultivo de tejidos vegetales la obtención de plantas sanas libres de enfermedades, por lo cual se deben extremar las condiciones de asepsia.

#### **1.4.13.3 Medio de cultivo**

Según Mroginski *et al.*, 2010, al medio de cultivo se lo puede definir como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de cultivos *in vitro*. Existen numerosas formulaciones, que comprenden entre 6 y 40 compuestos. De manera básica, los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran:

- Fuente de carbono
- Nutrientes minerales
- Sustancias vitamínicas
- Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos)
- Sustancias reguladoras del crecimiento

La composición del medio de cultivo juega un papel importante, por lo que se han desarrollado una gran cantidad de fórmulas para la regeneración de plantas por medio de la embriogénesis somática, como en la mayoría de las especies, se ha utilizado el medio de cultivo desarrollado por Murashige & Skoog en 1962, o las modificaciones de esta formulación, teniendo en cuenta que varios de los componentes del medio de cultivo estimulan la embriogénesis somática.

- *Fuente de carbono*

Las fuentes de carbono son necesarias en los cultivos *in vitro* ya que se conoce que la mayoría de estos son heterótrofos. La sacarosa es la más eficaz para la inducción de la embriogénesis somática, aunque otros azúcares, como la maltosa han mostrado efectos favorables en algunas especies (Gatica, 2002).

- *Nutrientes minerales y sustancias vitamínicas*

Así, el hierro es esencial para el desarrollo de los embriones somáticos, por otro lado, el nitrógeno, suministrado como ión amonio, nitrato, glutamina, alanina, caseína hidrolizada, es esencial para la iniciación y maduración de los embriones somáticos (Litz & Jarret, 1991), con especial énfasis para las leguminosas.

- *Agente gelificante*

En cuanto a los agentes gelificantes, el más usado es el agar, que es un polisacárido obtenido de la purificación de las algas, que tiene como función solidificar el medio y formar un complejo coloidal con débil poder de retención iónica (Pierik, 1990, Roca & Mroginski, 1991).

- *Sustancias reguladoras del crecimiento*

Como indica Manzanilla 2004, la adquisición de la totipotencia de las células es el paso más crítico en la formación de callo viable por lo que el factor químico más importante que la afecta, es la aplicación de hormonas endógenas, debido a que el uso de auxinas a altas concentraciones es necesario para causar la des-diferenciación y la estimulación de la totipotencia, por ello varias auxinas han sido usadas para dicho propósito como es la auxina natural IAA y otras sintéticas como el ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido naphthalenacético (NAA), indol-3-ácido acético (AIA), indol-3-butírico (IBA), picoram, ácido picolínico y cinetina. Litz, Hemdrix, Moon, & Chavez (1998) señalan que el 2,4-D es la auxina más eficiente y también la más comúnmente usada para el desarrollo de la embriogénesis somática debido a que:

- 1) Estimula una rápida división celular
- 2) Estimula una división celular sincronizada que da como resultado células proembriogénicas.
- 3) Estimula la proliferación de células proembriogénicas.

La formación del callo depende del tipo de bioregulador del crecimiento y su concentración en el medio de cultivo dependerá del genotipo y del contenido endógeno de hormonas del explante, tomando en cuenta esto será necesario aportar, sólo auxinas, sólo citoquininas o ambas, según el caso. Las auxinas son

efectivas para inducir la embriogénesis somática de un amplio rango de tejidos y estados de desarrollo, solo las auxinas tiene el potencial de regenerar células no embriogénicas (CNEs) de tejido no embriogénico, mientras que para el desarrollo de callos, las auxinas en concentraciones medias y altas, actúan sinérgicamente con las citoquininas en concentraciones bajas (Quintero, 2003), además, las auxinas, en concentraciones moderadas a altas son las más usadas para la formación de callos, otra opción probada también es, una alta concentración de auxina y una baja de citoquinina en el medio ya que promueve la proliferación celular en algunas especies, con la consecuente formación de callo. Las citoquininas más utilizadas son la kinetina (Kin) y la benciladenina (BA) (Matos, 2007).

El Thidiazurón (N-fenil-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea) (TDZ) es un compuesto derivado de la fenil - urea que ha sido creado con objeto original como defoliante de algodón, pero últimamente ha sido muy empleado para la inducción de procesos morfogénicos (Murthy, Murch & Saxena, 1998)

#### **1.4.13.4 Factores físicos**

Para Martínez, Azpiroz, Rodríguez, & Cetina (2004), las condiciones de oscuridad en la inducción a callo son necesarias para su desarrollo y aun más si se usa 2,4-D debido a que es un compuesto fotosensible, mientras que para el paso siguiente que es el desarrollo de los embriones somáticos es esencial la alta intensidad lumínica con un foto período según los requerimientos de la especie en estudio.

En cuanto a la temperatura óptima de incubación o crecimiento para cada cultivo *in vitro*, puede ser un proceso largo de determinar para cada especie, afortunadamente para la mayoría de especies mantenidas *in vitro* se puede obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación de un rango de

20 y 28 °C (Pierik, 1990) y baja humedad relativa (75%), a fin de reducir la proliferación de patógenos.

Pierik (1990), también cita otro factor relevante en la etapa de incubación o crecimiento de cultivos es la concentración de oxígeno presente en los frascos de medio, el cual debe ser igual o mayor a la del aire.

#### **1.4.13.5 Histogénesis**

La callogénesis y posterior embriogénesis somática son altamente dependiente de la especie, el genotipo, el estado fisiológico de la planta madre donante, las condiciones de incubación, la composición del medio de cultivo, el estado de desarrollo del explante y la técnica de cultivo *in vitro* que se aplique, por lo que la histogénesis de los callos ocupa un papel importante, ya que permite instaurar correlaciones sobre la influencia de los reguladores del crecimiento y el proceso generado por su influencia, considerado como desarrollo “desordenado” típico de los callos y también a la organización celular de los tejidos con estructuras organizadas que forman y diferencian a los callos embriogénicos (González, Hernández, Coronado & Silva, 2005).

#### **1.4.13.6 Aplicaciones de la embriogénesis somática**

Muchas aplicaciones se han podido evidenciar en investigaciones presentadas en varios países, citando algunos, según Fehér, Pasternak & Dudits (2003) la embriogénesis somática permite estudiar y comprender las bases moleculares y celulares de plantas así como también estudiar la capacidad embriogénica de células somáticas, como es en el caso de estudio modelo de embriogénesis de mutantes en *Arabidopsis*, por lo que se pudo concluir que la embriogénesis somática tiene muchas ventajas sobre la organogénesis, pudiendo citar algunas:

- Embriones a diferencia de brotes se originan de una célula individual.
- Los cultivos embriogénicos pueden ser sincronizados y purificados.
- Se pueden tener cultivos de material homogéneo.

Actualmente se está implementando bioreactores de inmersión temporal, en especies leñosas, representando una alternativa para la producción de semillas artificiales, embriones entre otros (Manzanilla, 2004).

De igual manera Ibaraki & Murata (2001) han reportado que la automatización de los procesos biotecnológicos puede incrementar el uso de la embriogénesis somática para la micropropagación, en dos líneas:

- 1.- Como una importante herramienta para la investigación en embriogénesis somática.
- 2.- Mejorando la eficiencia de producción de embriones, reduciendo su costo.

### 1.5 Hipótesis

Es posible inducir a la formación de callo embriogénico a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de árboles de Guarango (*Caesalpinia spinosa*) y promover proliferación masiva.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Participantes

*Para* desarrollar la presente investigación se contó con la participación y apoyo de:

#### **Instituciones:**

- Centro de Investigación Ambiental de Cununyacu (CIAC), perteneciente a la EPMMOP - Q (Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas de Quito).
- Escuela Politécnica del Ejército (ESPE).

#### **Personal académico:**

- Ing. Norman Soria Idrovo, Director.
- Ing. Marco Taipe Bolaños, Codirector.

#### **Personal externo:**

- Ing. Pedro Kingman, Coordinador de la Gerencia de Espacio Público (EPMMOP - Q).
- Ing. Cristian Reyes, Jefe del Laboratorio de Micropropagación (CIAC).
- Ing. Segundo Aguilar, Director del Banco de Semillas (CIAC).

## **2.2 Zona de Estudio**

### **2.2.1 Localización geográfica**

Este proyecto se llevará a cabo en el Laboratorio de Micropropagación del Centro de Investigaciones Ambientales de Cununyacu (CIAC) de la Empresa Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas EPMMOP-Q, situado en la provincia de Pichincha, parroquia Cumbayá, latitud: 0°20´ S, longitud: 78°30´ W a una altura de 2 200 m.s.n.m. con temperaturas promedio anuales de 17 °C.

### **2.3 Período de tiempo de investigación**

El proyecto de investigación inició en enero de 2011 y culminó en noviembre de 2011.

### **2.4 Diseño estadístico**

#### **2.4.1 Etapa de desinfección**

Para las cuatro variables de estudio presentes en esta etapa se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) tablas de contingencia, prueba Chi cuadrado a un nivel de significancia del 95% y un análisis descriptivo.

La hipótesis planteada en esta etapa fue:

**Ho:** los tratamientos de desinfección aplicados en semillas maduras de *Caesalpinia spinosa* no presentan variación en su respuesta.

#### **2.4.2 Etapa preliminar de inducción a callo embriogénico**

Tanto para los cotiledones como para los ejes embriogénicos se aplicó un DCA, para determinar el efecto de los medios de cultivo MS y Gamborg B5 al igual que los reguladores de crecimiento en la formación de callo. En los datos de carácter cualitativo, se procedió a realizar una tabla de contingencia, prueba de independencia  $\chi^2$  y un análisis descriptivo.

#### **2.4.3 Etapa final de inducción a callo embriogénico**

Para el análisis de los cotiledones se aplicó un DCA, para determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de callo. En los datos de carácter cualitativo, se procedió a realizar una tabla de contingencia, prueba de independencia  $\chi^2$ .

La hipótesis planteada en esta etapa fue:

**Ho:** los tratamientos de inducción a callo aplicados a cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa* no presentan variación en su respuesta.

#### **2.4.4 Etapa de Identificación**

Para esta etapa se realizó observaciones macro-morfológicas de carácter cualitativo con las que se procederá a realizar una estadística descriptiva, tabla de contingencia y pruebas de  $\chi^2$  para identificar si existe o no correlación entre los tratamientos y las características macro-morfológicas identificadas en los callos formados.

## 2.5 Procedimientos

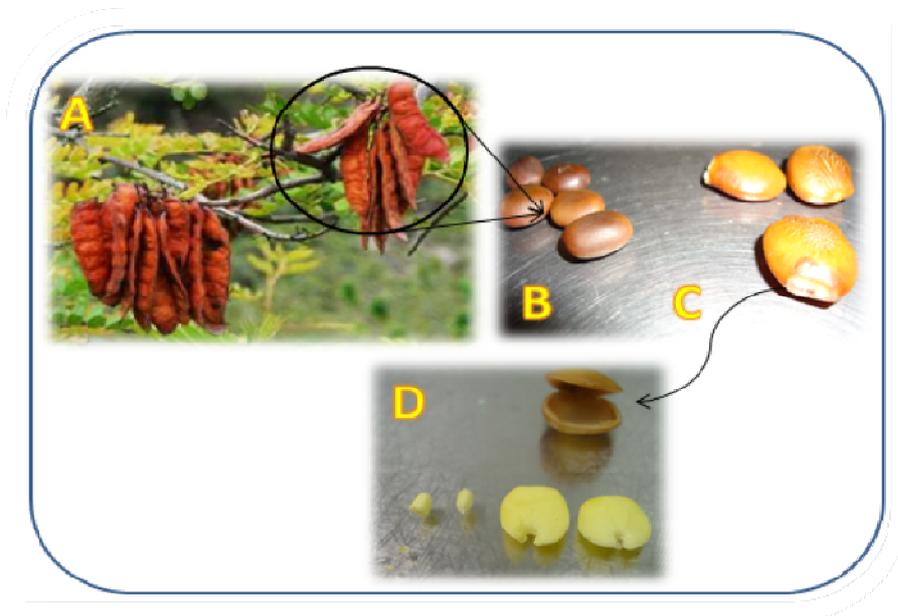
### 2.5.1 Selección y preparación del material vegetal

Para ésta investigación se utilizó como insumo central las semillas maduras de plantas adultas de *Caesalpinia spinosa* que tienen 8 años de vida productiva aproximadamente, las cuales fueron colectadas hace poco más de un año, en distintos sectores de la provincia de Pichincha y fueron desinfectadas químicamente con Carboxin – Captan, previo su conservación a -5°C, en el banco de semillas del vivero de Cununyacu de la EPMMOP-Q.

La preparación de las semillas para su manejo tanto para los ensayos de desinfección como para los ensayos de inducción a callo se describe a continuación:

1. Se realizó un lavado con una solución de 200ml agua con 2 gramos de detergente comercial por cada 30 semillas durante 40 minutos con agitación constante en un shaker (Innova-2100) y a continuación se realizó un triple enjuague con agua destilada.
2. Debido a que la testa de las semillas maduras de guarango es dura se procedió a realizar un proceso de escarificación con cautín en la zona del micrópilo.
3. Posteriormente se puso a las semillas en agua por dos días con la finalidad de ablandar la capa externa de la semilla y poderla retirar con mayor facilidad y sacarlas de su período de letargo. Además de permitir la absorción de agua al interior de la semilla para disolver y eliminar una serie de sustancias que las tenían en un periodo de latencia (Figura 2.1).

4. En este estudio se adoptaron dos tipos de explantes como unidades experimentales a partir de las semillas maduras, los cotiledones y el eje embriogénico, para determinar su respuesta a la Desinfección e Inducción a callo. Según la metodología citada por Bermúdez *et al.*, (2010) y Collado *et al.*, (2008) se procedió a separar los cotiledones de su eje embriogénico para luego sembrarlos de manera que los cotiledones se ubicaron con el lado abaxial en contacto con el medio de cultivo y los ejes embriogénicos en posición horizontal.



**Figura 2.1:** **A.** Vainas maduras del árbol de *Caesalpinia spinosa* **B.** Semillas maduras de guarango en estado de letargo, conservadas en el Banco de germoplasma del CIAC. **C.** Semillas escarificadas y reactivadas **D.** Cotiledones y ejes embriogénicos de guarango, fuera del periodo de latencia (Mancero, 2008 & Ortega, 2012).

## 2.5.2 Desinfección

### 2.5.2.1 Desinfección de los explantes

La asepsia de los explantes utilizados se precisa para el éxito en el cultivo de tejidos vegetales por lo que en este caso todas las semillas que se utilizaron además de ser tratadas con detergente previo su escarificación, debieron someterse a una serie de ensayos complementarios para su desinfección íntegra.

Se aplicaron 4 tratamientos para la desinfección, que se centraron en soluciones de hipoclorito de sodio NaClO con 4 gotas de Tween® 80 a diferentes concentraciones y tiempos de acción, que fueron puestos en agitación en un shaker (Innova 2100) por 5 minutos para luego ser sometidos a 3 lavados con agua destilada para eliminar residuos de la solución.

Estos tratamientos propuestos para la desinfección fueron fundamentados en los métodos de (Velásquez *et al.*, 2006) y (Ramírez *et al.*, 2002). Los tratamientos se resumen en la tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Tratamientos de desinfección para semillas maduras de *Caesalpinia spinosa*, Laboratorio de Micropropagación de la EPMMOP-Q, Cununyacu, 2011.

TRATAMIENTOS PARA DESINFECCIÓN		
Ensayos	Hipoclorito de sodio (NaClO) (v/v) %	Tiempo (min)
1	0.5	5
2	1.5	5
3	0.5	10
4	1.5	10

### **2.5.2.2 Medio de cultivo para la etapa de desinfección**

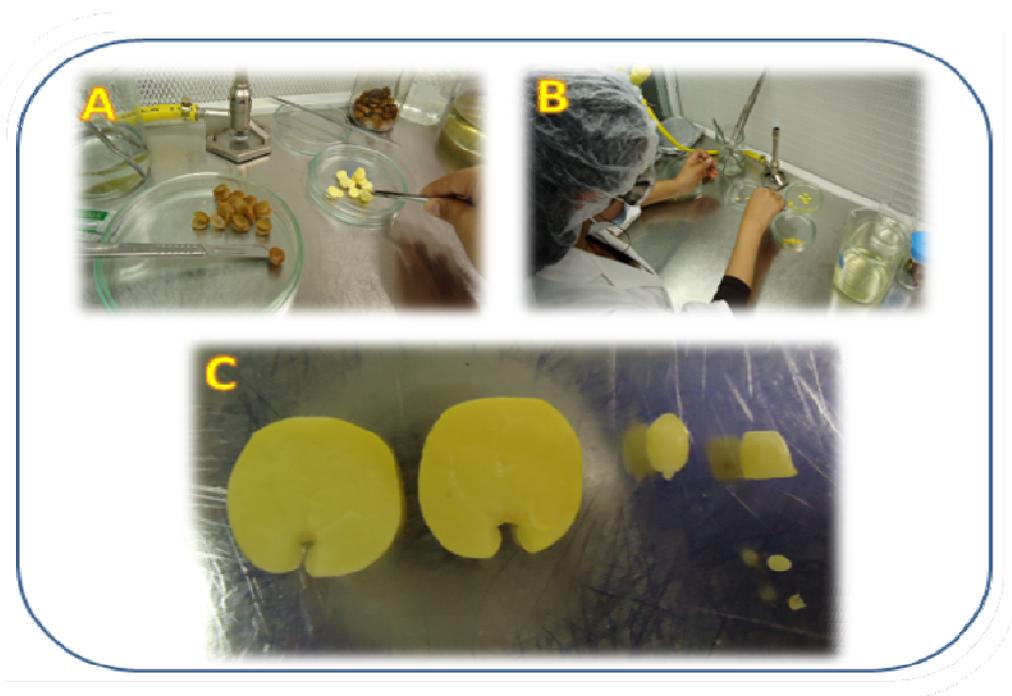
Para la fase de desinfección el medio de cultivo que se utilizó en los diferentes ensayos de desinfección fue el medio MS (Murashige & Skoog).

1. El medio de cultivo que se medio MS, sacarosa grado I y agua destilada conforme al volumen de medio requerido para cada ensayo. Las cantidades de las sustancias usadas fueron pesadas en una balanza electrónica de precisión (ACCULAB) y mezcladas con un agitador magnético en un hotplate (CIMAREC). Posterior a ello, se ajustó el pH del medio con un pH-metro (Jenway) a  $5.8 \pm 0.02$  con ayuda de NaOH (1M y 0.1 M) o HCl (1M y 0.1 M) según el caso para luego añadir el agente gelificante (agar Sigma,  $6.5 \text{ g.L}^{-1}$ ).
2. A continuación en un horno microondas (Whirpool) fue hervido el medio de cultivo con el fin de homogenizar la composición.
3. El medio posteriormente fue dispensado en tubos de 18x150mm con 15ml del medio se los tapó para esterilizarlos en una autoclave vertical (Trident Medical EA-632) por 45 minutos a  $120^{\circ}\text{C}$  de temperatura y  $127 \text{ kg.cm}^{-2}$  de presión.

### **2.5.2.3 Siembra de los explantes**

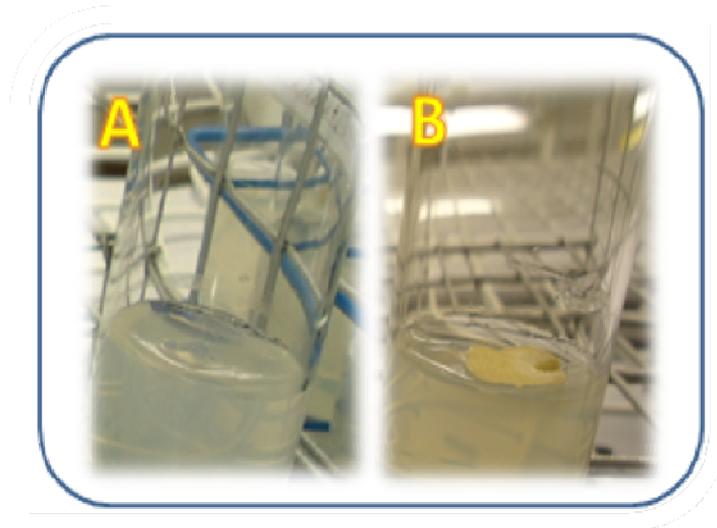
Para la siembra de los cotiledones y ejes embriogénicos en la desinfección se lo hizo en una cámara de flujo laminar (Streamline) que fue previamente esterilizada con radiación UV durante 20 minutos. De la misma manera el material de vidrio como los instrumentos de metal utilizados fueron esterilizados en una autoclave horizontal (Tuttanauer 2540M) a  $244.73 \text{ kg.cm}^{-2}$  y  $120^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos. Además para una desinfección constante de la instrumentación dentro de la cámara fue ubicado un frasco de vidrio que contenía alcohol al 96%.

Por otro lado, una vez que las semillas han sido reactivadas mediante un proceso de escarificación en la zona del micrópilo para que el agua permita que las semillas salgan del periodo de letargo en el que se encontraban al ser conservadas en el Banco de Germoplasma del CIAC, fueron sometidas a los diferentes tratamientos de desinfección detallados en la tabla 2.1 y lavados con agua destilada dentro de la cámara de flujo laminar (Streamline), se procedió a retirar la testa de la semilla utilizando un bisturí, luego se separó los cotiledones del eje embriogénico. A los ejes embriogénicos se les retiro 1mm de cada extremo y se realizo tres pinchazos con la punta del bisturí N° 11 en el centro de cada cotiledón (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** **A.** Semillas de guarango sin testa. **B. y C.** Separación de los cotiledones y ejes embriogénicos (Ortega, 2012).

A continuación los cotiledones y los ejes embriogénicos fueron sembrados de manera que los cotiledones se ubicaron con el lado abaxial en contacto con el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) y los ejes embriogénicos en posición horizontal (Collado *et al.*, 2008), poniendo un explante en cada tubo (Figura 2.3).



**Figura 2.3:** **A.** Eje embriogénico sembrado horizontalmente. **B.** Cotiledón sembrado con el lado abaxial en contacto con el medio de cultivo (Ortega, 2012).

Los tubos fueron trasladados al cuarto de crecimiento *in vitro* donde se empleó un fotoperíodo continuo de 24 horas de oscuridad y a una temperatura promedio de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (Anexo A).

#### **2.5.2.4 Análisis de datos**

Para la etapa de desinfección se aplicaron dos unidades experimentales, un cotiledón y un eje embriogénico sembrados en un tubo de ensayo. Para cada tratamiento de desinfección se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con 10 observaciones por tratamiento con 3 replicas, donde la fuente de variabilidad fueron los tratamientos de desinfección.

## **FACTORES**

Tipos de Explantes:

- Cotiledones
- Ejes embriogénicos

## **VARIABLES**

Las variables de respuesta tanto para cotiledones como para ejes embriogénicos fueron:

- Número de explantes vivos a los 25 días.
- Contaminación provocada por hongos y/o bacterias.
- Número de explantes necrosados.

### **2.5.3 Inducción a callo embriogénico**

Al haber determinado el mejor método de desinfección se procedió a plantear un ensayo preliminar de inducción a callo embriogénico basado en investigaciones relacionadas como (Buendía *et al.*, 2003), (Marinucci *et al.*, 2004), (Gómez *et al.*, 2006) y (García *et al.*, 2006). Para posteriormente instalar un ensayo final a partir de los mejores resultados arrojados del ensayo preliminar de inducción.

Los explantes utilizados para el ensayo preliminar fueron cotiledones y ejes embriogénicos que se sembraron en tubos de ensayo de 18 x 150mm con 15 mL con medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) (Anexo B) y Gamborg's B5 (Gamborg, Miller & Ojima, 1968) (Anexo C), evaluados ambos con diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento que se describen en la Tabla 2.2.

### 2.5.3.1 Medios de cultivo para la etapa de inducción a callo embriogénico

En la fase de inducción a callo para los ensayos preliminares de inducción a callo los medios de cultivo que se utilizaron fueron MS (Murashige & Skoog, 1962) y Gamborg's B5 (Gamborg *et al.*, 1968).

1. Los dos tipos de medio de cultivo se los uso a una concentración del 100%. Una vez disueltos los elementos principales tales como el medio, sacarosa grado I al 3% y agua destilada conforme al volumen de medio requerido para cada ensayo. Las cantidades de las sustancias usadas fueron pesadas en una balanza electrónica de precisión (ACCULAB) y mezcladas con un agitador magnético en un hotplate (CIMAREC). Posterior a ello, se ajustó el pH del medio con un pHmetro (Jenway) a  $5.8 \pm 0.02$  con ayuda de NaOH (1M y 0.1 M) o HCl (1M y 0.1 M) según el caso para luego añadir el agente gelificante (agar Sigma,  $6.5 \text{ g.L}^{-1}$ ).
2. Luego, el medio de cultivo fue calentado en horno microondas (Whirpool) para que se pueda homogenizar la mezcla. El suplemento de los diferentes fitorreguladores fue con la ayuda de micropipetas dependiendo del volumen correspondiente al tratamiento que se detalla en la Tabla 2.2.
3. El medio posteriormente fue dispensado en tubos de 18x150mm con 15ml del medio se los tapó para esterilizarlos en una autoclave vertical (Trident Medical EA-632) por 45 minutos a  $120^{\circ}\text{C}$  de temperatura y  $127 \text{ kg.cm}^{-2}$  de presión.
4. La siembra de los explantes manejados (cotiledones y ejes embriogénicos) en la etapa de inducción fue la misma metodología utilizada anteriormente la etapa de desinfección.

Una vez concluido la siembra de cotiledones y ejes embriogénicos en los tratamientos propuestos en los ensayos preliminares de inducción, se los llevo al cuarto de crecimiento *in vitro*, donde las gradillas de tubos fueron tapadas

completamente con una funda negra para dar la condición total de oscuridad y contribuir a la formación del callo.

**Tabla 2.2** Dosificación de bioreguladores en medio de cultivo MS y Gamborg B5 para los ensayos preliminares de inducción a callo a partir de cotiledones y de ejes embriogénicos de árboles de *Caesalpinia spinosa*, Laboratorio de Micropropagación de la EPMOP-Q, Cununyacu, 2011.

TRATAMIENTOS PRELIMINARES DE INDUCCIÓN		
Medio	Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg.L <sup>-1</sup> )
<b>MS</b>	<b>Control 1</b>	-
	<b>T1</b>	2, 4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )
	<b>T2</b>	2, 4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mg.L <sup>-1</sup> )
	<b>T3</b>	TDZ (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA (0.05 mg.L <sup>-1</sup> )
<b>Gamborg B5</b>	<b>Control 2</b>	-
	<b>T4</b>	2, 4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )
	<b>T5</b>	2, 4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mg.L <sup>-1</sup> )
	<b>T6</b>	TDZ (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA (0.05 mg.L <sup>-1</sup> )

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BAP: 6-bencilaminopurina; Kin: kinetina; AIA: ácido indol-acético y TDZ: thidiazuron.

### 2.5.3.2 Análisis de datos, ensayo preliminar de inducción a callo

Para el ensayo preliminar de inducción se aplicaron dos unidades experimentales, un cotiledón y un eje embriogénico sembrados en un tubo de ensayo. Para cada tratamiento se implementó Para cada tratamiento de inducción se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con 10 observaciones por tratamiento con 3 replicas, donde la fuente de variabilidad fueron los tratamientos de desinfección. En los datos de carácter cualitativo, se procedió a realizar una

tabla de contingencia y se aplicó la prueba de independencia  $\chi^2$  junto con un análisis descriptivo.

## **FACTORES**

### **Tipos de Explantes**

- Cotiledones
- Ejes embriogénicos

### **Medio de cultivo**

- Medio MS
- Medio Gamborg's B5

### **Combinación de Bioreguladores**

- Sin Biorreguladores
- 2, 4-D ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + Kin ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ )
- 2, 4-D ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + BAP ( $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ )
- TDZ ( $0.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + AIA ( $0.05 \text{ mg.L}^{-1}$ )

## **VARIABLES**

La variable de respuesta tanto para cotiledones como para ejes embriogénicos fue:

- Formación de callo a los 60 días.
- Tiempo de formación de callo a los 15, 30, 45 y 60 días.
- Análisis macro-morfológico.
- Formación de callo embriogénico.

Luego de evaluar los resultados conseguidos en el ensayo preliminar de inducción como son, formación de callo a los 15, 30, 45 y 60 días y el análisis morfológico de friabilidad, color y textura de los callos formados a los 60 días de haber sido sembrados. El explante en el cual se dio resultados positivos para

callogénesis fue únicamente en el cotiledón. Así se pudo seleccionar los dos mejores tratamientos empleados que generaron la mayor presencia de callo viable y con ellos se procedió a montar el ensayo final de inducción, probando tres niveles de concentraciones de las combinaciones de los reguladores de crecimiento en el respectivo medio de cultivo, de manera ortogonal, incluyendo los tratamientos iniciales de los cuales se parte, definidos en la Tabla 2.3.

La elaboración del medio de cultivo para los ensayos finales de inducción fue la misma aplicada en los ensayos preliminares de inducción con la diferencia en las cantidades de los reguladores de crecimiento aplicados.

**Tabla 2.3** Dosificación de las concentraciones y combinaciones de bioreguladores para los ensayos concluyentes de inducción a callo a partir de cotiledones de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa*, Laboratorio de Micropropagación de la EPMMOP-Q, Cununyacu, 2011.

TRATAMIENTOS FINALES DE INDUCCIÓN		
Medio	Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mgL <sup>-1</sup> )
MS	<b>Control 1</b>	-
	<b>T1</b>	2, 4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (0.5 mg.L <sup>-1</sup> )
	<b>T2</b>	2, 4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )
	<b>T3</b>	2, 4-D (4 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (2 mg.L <sup>-1</sup> )
	<b>Control 2</b>	-
	<b>T4</b>	TDZ (0.1 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA (0.025 mg.L <sup>-1</sup> )
	<b>T5</b>	TDZ (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA (0.05 mg.L <sup>-1</sup> )
	<b>T6</b>	TDZ (0.4 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA (0.10 mg.L <sup>-1</sup> )

Una vez concluido la siembra las gradillas con los tubos de los tratamientos de los ensayos finales de inducción fueron llevadas al cuarto de crecimiento *in vitro* donde fueron tapadas completamente con una funda negra para dar la condición total de oscuridad y contribuir a la formación del callo.

### **2.5.3.3 Análisis de datos del ensayo final de inducción a callo**

En el ensayo final de inducción se aplicó una unidad experimental, un cotiledón sembrado en un tubo de ensayo. Se utilizó en este ensayo un DCA, además en los datos de carácter cualitativo, se procedió a realizar una tabla de contingencia, una prueba de independencia  $\chi^2$  y un análisis descriptivo. Igual que en el ensayo preliminar se realizaron 10 observaciones por tratamiento con 3 replicas.

#### **FACTORES**

- Combinación de reguladores de crecimiento

#### **VARIABLES**

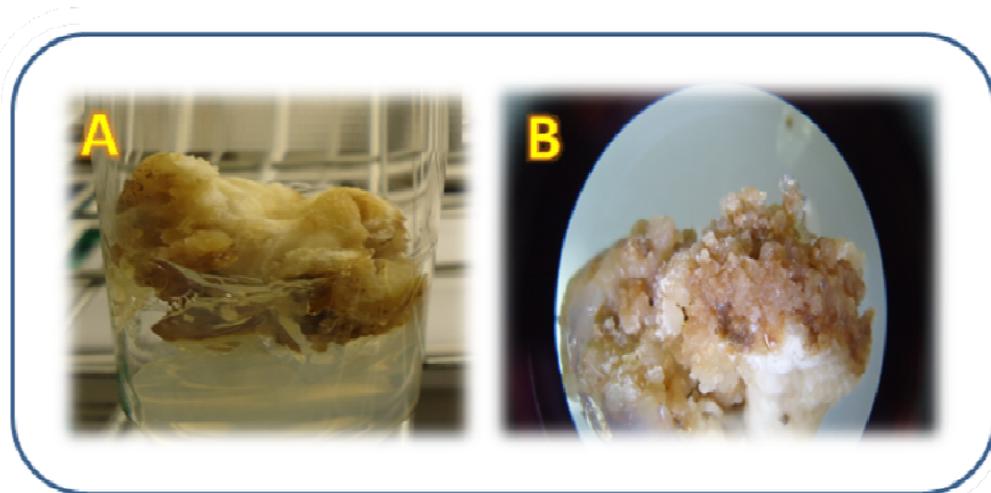
La variable de respuesta tanto para cotiledones como para ejes embriogénicos fue:

- Formación de callo a los 60 días.
- Tiempo de formación de callo a los 15, 30, 45 y 60 días.
- Análisis macro-morfológico.
- Formación de callo embriogénico.

### **2.5.4 Identificación de callo embriogénico**

Completado la etapa de inducción a callo se procedió a la identificación de viabilidad de los callos mediante su particular macro-morfología, como el color y la

textura (Rodríguez *et al.*, 2005), utilizando par la identificación la ayuda de un estereoscopio (Olympus).



**Figura 2.4:** **A.** Callo obtenido en la etapa de inducción. **B** Callo observado al estereoscopio (Ortega, 2012).

#### 2.5.4.1 Análisis Histológico

Una vez identificados los callos con características viables a callo embriogénico se procedió a realizar el análisis histológico que consistió en un frotis de una muestra de dichos callos viables aproximadamente 0.5 mm. Las placas fueron teñidas con una solución de acetocarmín al 2% (p/v) por 15 segundos, en seguida, se realizó un lavado del exceso de tinción con agua destilada, y finalmente se observó directamente en el microscopio óptico (Olympus CX31) dentro de la cámara de flujo laminar (Streamline), permitiendo así la identificación de estructuras embriogénicas (Vega & Prehn, 2005).

#### **2.5.4.2 Análisis de datos**

Los datos generados en el análisis macro-morfológico fueron de carácter cualitativo con los que se procedió a realizar una estadística descriptiva, tabla de contingencia y para la identificación de viabilidad de los callos se realizó un análisis cluster jerárquico de su macro-morfología, como el color, con cuatro subniveles translúcido, crema, café, verde, y textura con dos subniveles compacto y friable, utilizando para la identificación la ayuda de un estereoscopio (Olympus).

En cuanto a las observaciones histológicas en el microscopio de los callos embriogénicos se realizó frotis de los callos para poder identificar estructuras propias del tejido embriogénico.

## **CAPÍTULO 3: RESULTADOS**

La descripción de los resultados se presenta en cuatro fases. La primera fase consta de la desinfección de cotiledones y de ejes embriogénicos dentro de los cuales se analizó a los explantes vivos, su contaminación y necrosis. La segunda fase constituyen los ensayos preliminares de inducción de cotiledones en primera instancia y de ejes embriogénicos posteriormente, la tercera fase describe al ensayo final de inducción a callo de cotiledones. Finalmente la cuarta fase describe al análisis histológico de los callos embriogénicos formados en la etapa tres.

### **3.1 Fase 1: Desinfección de los explantes**

Durante la etapa de desinfección de los dos explantes usados en este estudio (cotiledones y ejes embriogénicos de la semilla de guarango), se evaluó el efecto de cuatro tratamientos establecidos con dos diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) (0,5 y 1,5%) y dos tiempos de inmersión (5 y 10 minutos).

#### **3.1.1 Explantes vivos en cotiledones y ejes embriogénicos**

Los datos de los explantes vivos y descartados tanto en cotiledones como en ejes embriogénicos se detallan en la Tabla 3.1.

Tras 25 días de haber sido establecidos los cotiledones y ejes embriogénicos se analizaron los datos de la desinfección (Tabla 3.1). De manera general se pudo observar que tanto el porcentaje de explantes vivos en

cotiledones (56,7%) como en ejes embriogénicos (75,8%) fue mayor que los explantes descartados.

**Tabla 3.1** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de cotiledones y ejes embriogénicos vivos y descartados, evaluados a los 25 días de haber sido establecidos.

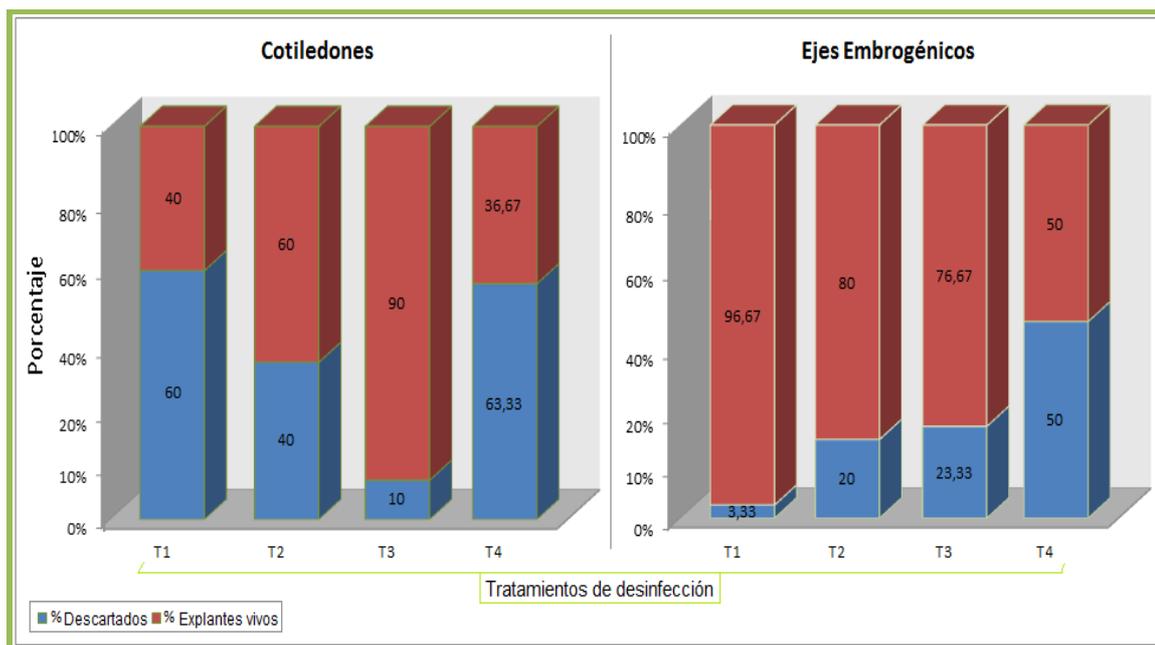
Tratamientos de desinfección		Cotiledones		Total	Ejes Embriogénicos		Total
		Vivos	Descartados		Vivos	Descartados	
Tratamiento 1	Frec	12	19	30	29	1	30
(NaClO 0,5% x 5min)	%	40,0%	63,3%	100,0%	96,7%	3,3%	100,0%
Tratamiento 2	Frec	18	12	30	24	6	30
(NaClO 1,5% x 5min)	%	60,0%	40,0%	100,0%	80,0%	20,0%	100,0%
Tratamiento 3	Frec	27	3	30	23	7	30
(NaClO 0,5% x 10min)	%	90,0%	10,0%	100,0%	76,7%	23,3%	100,0%
Tratamiento 4	Frec	11	18	30	15	15	30
(NaClO 1,5% x 10min)	%	36,7%	60,0%	100,0%	50,0%	50,0%	100,0%
Total	Frec	<b>68</b>	<b>52</b>	<b>120</b>	<b>91</b>	<b>29</b>	<b>120</b>
	%	<b>56,7%</b>	<b>43,3%</b>	<b>100,0%</b>	<b>75,8%</b>	<b>24,2%</b>	<b>100,0%</b>
Chi-cuadrado de Pearson		21,991 <sup>a</sup>			18,325 <sup>a</sup>		

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 13,00.

En el caso de los cotiledones se pudo observar que el tratamiento T3 (NaClO al 0,5% durante 10 min) presentó una frecuencia de 27, lo que representó un porcentaje de 90% de explantes vivos, que fue superior a los demás tratamientos aplicados, y el porcentaje de descarte para este tratamiento fue de 10% (Figura 3.1).

El tratamiento T4 presentó un porcentaje de 36,67% de explantes vivos, mientras que los dos tratamientos restantes T1 y T2 presentaron porcentajes de explantes vivos de 40 y 60% respectivamente.

Mientras que como se puede visualizar en la Tabla y Figura 3.1 en el caso de la desinfección de ejes embriogénicos, el tratamiento T1 (NaClO al 0,5% durante 5 min) presentó una frecuencia de 29 lo que representó el 96,7% de explantes vivos, superando al resto de tratamientos aplicados, que obtuvieron porcentajes entre el 50 y el 80% de explantes vivos.



**Figura 3.1:** Porcentajes de cotiledones y ejes embriogénicos vivos y descartados, evaluados a los 25 días de haber sido establecidos (Ortega, 2012).

Tras el análisis estadístico de los datos de desinfección, Chi- cuadrado de Pearson tomó un valor de 21,991 para cotiledones y 18,325 para ejes embriogénicos, siendo ambos valores significativos al 95% de confianza, por lo cual se decidió rechazar la hipótesis de independencia y concluir que las variables, vivos y descartados para ambos explantes están relacionados con los tratamientos de desinfección aplicados.

### 3.1.2 Contaminación bacteriana, fúngica y necrosis

En esta fase se describe la contaminación por bacterias, hongos y la necrosis en los dos explantes (cotiledones y ejes embriogénicos) por separado, como se detalla a continuación:

#### 3.1.2.1 Cotiledones

Del total de cotiledones sembrados (120 unidades), el 43,3% fue descartado (Tabla 3.1), de este porcentaje se pudo ver en la Tabla 3.2, que en el tratamiento T1 fue donde mayor porcentaje de descarte se presentó 16,8%, de éste porcentaje, el factor de descarte que mayor incidencia mostró fue la contaminación por hongos (9,2 %), en el tratamiento T4 el porcentaje de descarte fue de 11,8%, en este caso el factor de descarte que mayor presencia demostró fue la necrosis (10,8%). En el caso del tratamiento T3 el porcentaje de descarte fue de 4,2%, que fue el porcentaje más bajo de descarte de todos los tratamientos aplicados.

**Tabla 3.2** Tabla de contingencia de frecuencia y porcentaje de los factores de descarte en los cotiledones de la semilla de guarango.

Condición		T1	T2	T3	T4	Total
		5 min		10 min		
		0,5%NaClO	1,5%NaClO	0,5%NaClO	1,5%NaClO	
Necrosis	Frec	0	7	2	13	22
	%	,0%	5,8%	1,7%	10,8%	18,3%
Hongo	Frec	11	4	2	1	18
	%	9,2%	3,4%	1,7%	0,8%	15,0%
Bacteria	Frec	9	2	1	0	12
	%	7,5%	1,7%	0,8%	,0%	10,0%
Total	Frec	<b>20</b>	<b>13</b>	<b>5</b>	<b>14</b>	52(43,3%)
	%	<b>16,8%</b>	<b>10,9%</b>	<b>4,2%</b>	<b>11,8%</b>	120(100%)

En la Tabla 3.3, se presenta el resultado del tiempo vs la concentración de NaClO, en la cual muestra el efecto de estos componentes de los tratamientos de desinfección sobre cada agente de descarte de dichos explantes.

**Tabla 3.3** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes del efecto del tiempo y la concentración de NaClO sobre los factores de descarte en los cotiledones.

Tiempo (min)	Bacteria			Hongo			Necrosis			Total	
	0,5% NaClO	1,5% NaClO	Parcial	0,5% NaClO	1,5% NaClO	Parcial	0,5% NaClO	1,5% NaClO	Parcial		
5	Frec	9	2	11	11	4	15	0	7	7	31
	%	7,5%	1,7%	9,2%	36,7%	3,4%	12,5%	,0%	5,8%	5,8%	25,8%
10	Frec	1	0	1	2	1	3	2	13	15	21
	%	0,8%	,0%	0,8%	1,7%	0,8%	2,5%	1,7%	10,8%	12,5%	17,5%
Total	Frec	10	2	12	13	5	18	2	20	22	52
	%	8,3%	1,7%	10%	10,8%	4,2%	15%	1,7%	16,7%	18,3%	43,3%

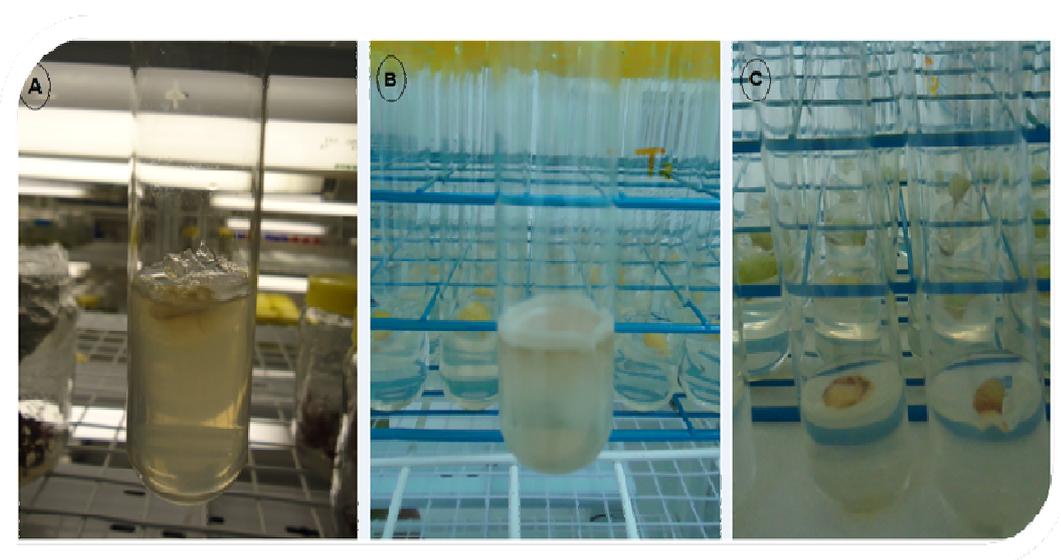
De manera global se observa una incidencia mayor en la necrosis (18,3%) que visualmente representa al tejido del cotiledón necrosado, en segundo lugar fue el porcentaje de contaminación por hongos (15,0%) y en tercer lugar se presentó la contaminación por bacterias con una incidencia de 10,0 % (Tabla 3.3).

Así mismo, el solo efecto de la variable tiempo (filas de la Tabla 3.3) sobre la contaminación (bacteria; hongo) pudo deberse a que a mayor tiempo de inmersión menor contaminación, mientras que se concibe un efecto contrario para la necrosis en los cotiledones, ya que a mayor tiempo de inmersión hubo mayor número de explantes necrosados.

Por otro lado, también se comparó el resultado de la variable concentración de NaClO (columnas de la Tabla 3.3), en este punto se puede

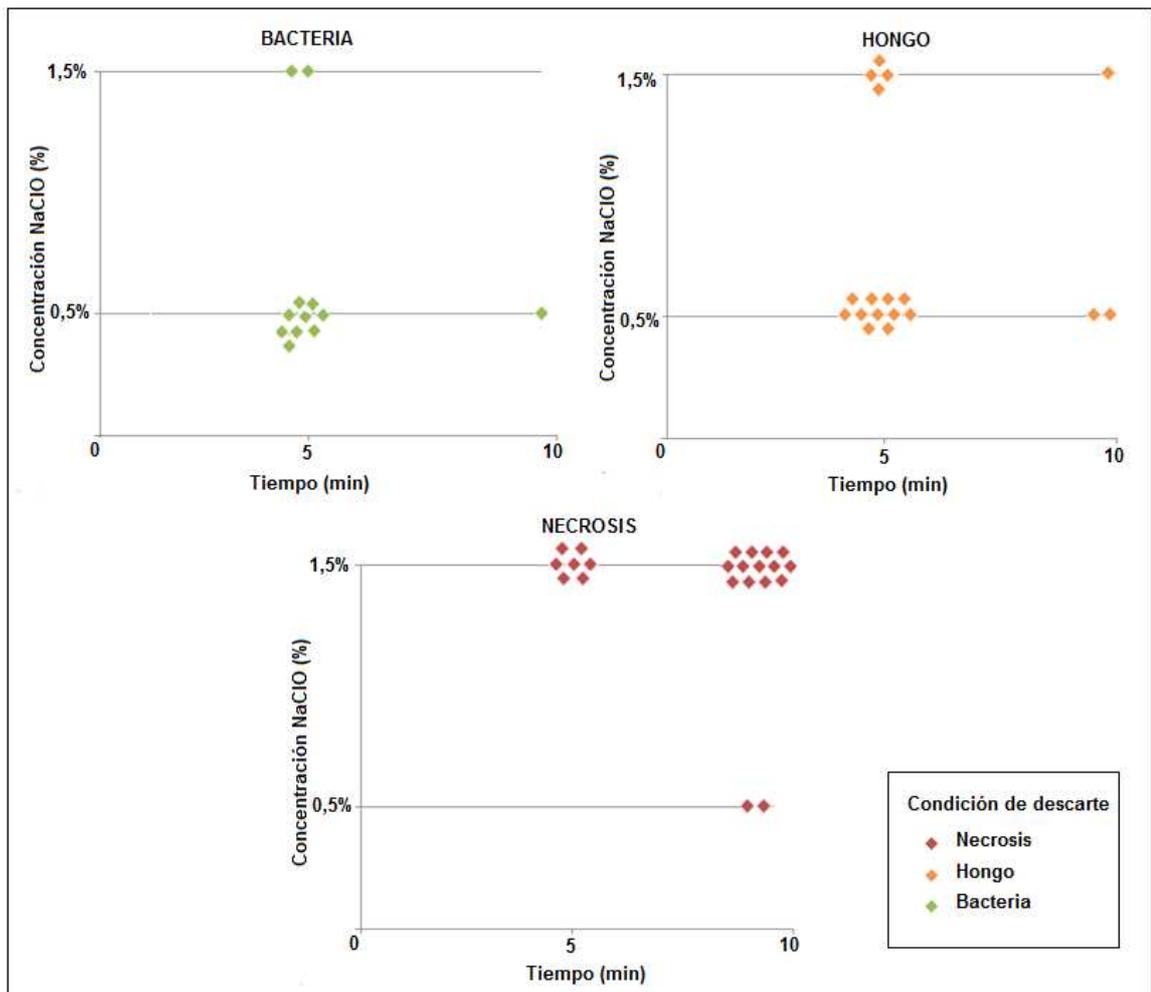
observar que en la concentración más alta de NaClO (1,5%) sobre la contaminación (bacteria; hongo) hubo menor cantidad de explantes contaminados, no así en el caso de la necrosis en la cual se observó que a mayor concentración de NaClO mayor cantidad de explantes necrosados se presentaron.

En la Figura 3.2 se muestran fotografías de cotiledones contaminados por bacterias, hongos y cotiledones necrosados apreciados a los 25 días.



**Figura 3.2:** Factores de descarte en cotiledones durante la fase de desinfección **A)** contaminación bacteriana, **B)** contaminación fúngica y **C)** necrosis del explante (Ortega, 2012).

En la Figura 3.3 del diagrama de dispersión de componentes, se muestra la correlación entre los niveles de cada factor que formaron los tratamientos de desinfección para el caso de los cotiledones, el tiempo de inmersión de los cotiledones al hipoclorito vs la concentración del mismo.



**Figura 3.3:** Diagrama de dispersión del análisis de componentes (tiempo de exposición de los cotiledones al hipoclorito vs la concentración de NaClO) de los tratamiento de desinfección para cada una de las condiciones de descarte (Ortega, 2012).

### 3.1.2.2 Ejes embriogénicos

En cuanto a los ejes embriogénicos totales sembrados (120 unidades), el 24,2% fue descartado (Tabla 3.1), del cual como se pudo ver en la Tabla 3.4, el tratamiento T4 tiene el mayor porcentaje de descarte 12,5%, siendo la necrosis el único factor de descarte, en los tratamientos T2 y T3 el porcentaje de descarte fue bajo de 5,0% y 5,8% respectivamente, predominando la necrosis como factor de descarte.

**Tabla 3.4** Tabla de contingencia de frecuencia y porcentaje de los factores de descarte en ejes embriogénicos de la semilla de guarango.

Condición		T1	T2	T3	T4	Total
		5 min		10 min		
		0,5%NaClO	1,5%NaClO	0,5%NaClO	1,5%NaClO	
Necrosis	Frec	0	6	7	15	28
	%	,0%	5,0%	5,8%	12,5%	23,4%
Hongo	Frec	0	0	0	0	0
	%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%
Bacteria	Frec	1	0	0	0	1
	%	0,8%	,0%	,0%	,0%	0,8%
Total	Frec	1	6	7	15	29(24,2%)
	%	<b>0,8%</b>	<b>5,0%</b>	<b>5,8%</b>	<b>12,5%</b>	120(100%)

En la Tabla 3.5, se muestra el efecto del tiempo vs la concentración de NaClO, componentes de los tratamientos de desinfección, sobre cada agente de descarte para los ejes embriogénicos, sean estos por bacterias, hongos y por necrosis.

**Tabla 3.5** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes del efecto del tiempo y la concentración de NaClO sobre los factores de descarte en los ejes embriogénicos.

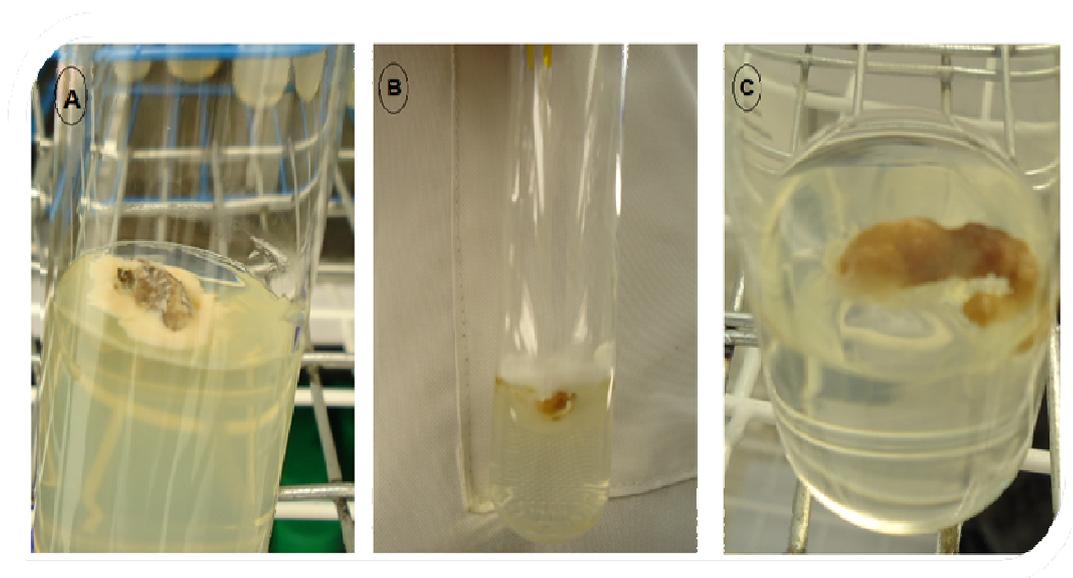
Tiempo (min)	Bacteria			Hongo			Necrosis			Total	
	0,5% NaClO	1,5% NaClO	Parcial	0,5% NaClO	1,5% NaClO	Parcial	0,5% NaClO	1,5% NaClO	Parcial		
5	Frec	1	0	1	0	0	0	0	6	6	7
	%	0,8%	,0%	0,8%	,0%	,0%	,0%	,0%	5,0%	5,0%	5,8%
10	Frec	0	0	0	0	0	0	7	15	22	22
	%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	5,8%	12,5%	18,3%	18,3%
Total	Frec	1	0	1	0	0	0	7	21	28	29
	%	0,8%	,0%	0,8%	,0%	,0%	,0%	5,8%	17,5%	23,3%	24,2%

A manera general se observó que la mayor incidencia de descarte que se presentó es la necrosis (23,3%), que visualmente figura el tejido del explante necrosado, también se pudo apreciar la presencia de contaminación por bacterias (0,8%) más no contaminación por hongos (Tabla 3.5).

En las filas de la Tabla 3.5 se puede apreciar el sólo efecto de la variable tiempo, así, con respecto a la contaminación por bacteria se pudo ver que en el tiempo de inmersión cinco-minutos se dio un porcentaje de 0,8%, caso contrario se evidenció en el tiempo de inmersión diez-minutos para el caso de la necrosis, que demostró un porcentaje de 18,3% mayor que en el tiempo de inmersión cinco-minutos que fue de 5,0%.

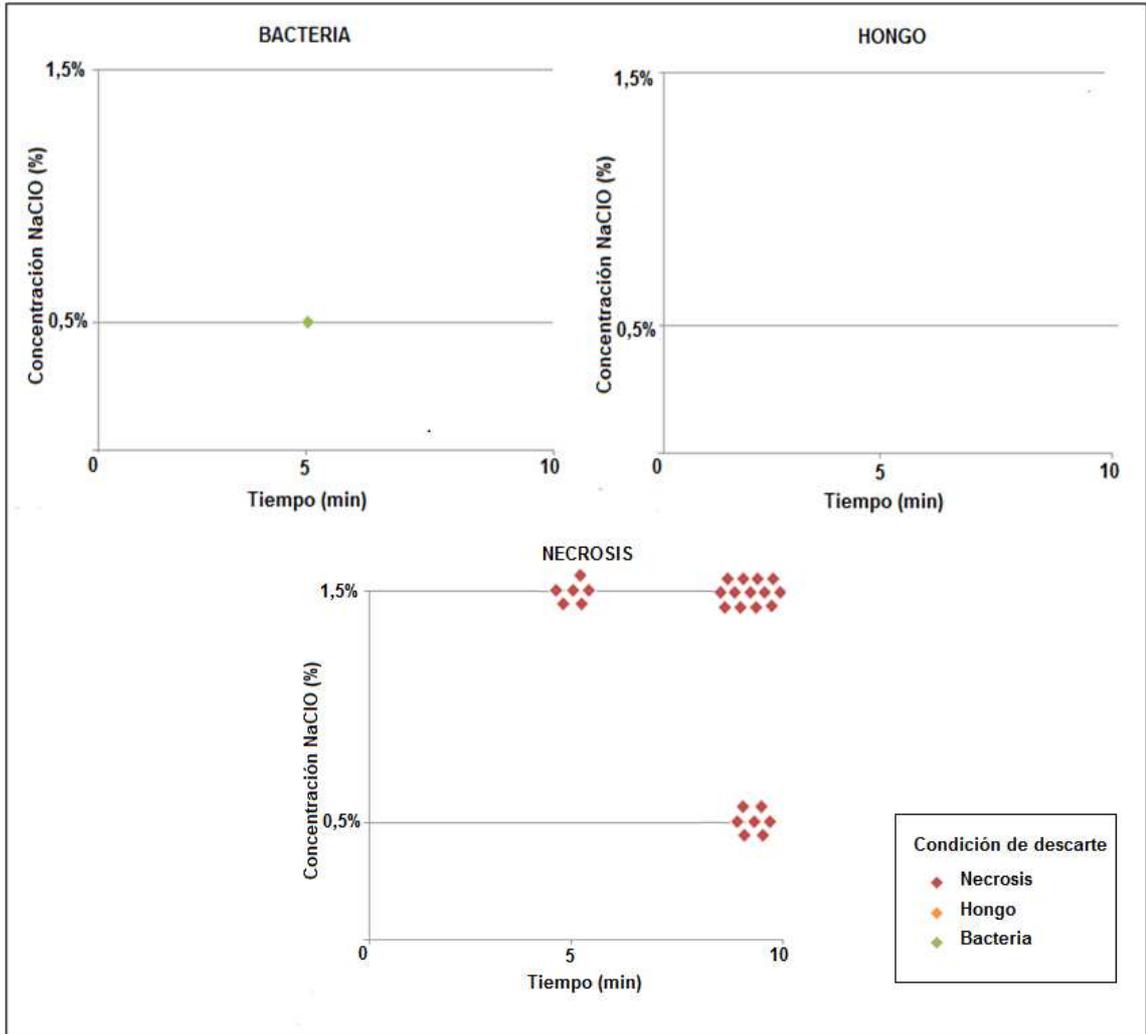
De la misma manera, también se comparó el resultado de la variable concentración de NaClO (columnas de la Tabla 3.5) en el caso de la necrosis en la cual se observó que a mayor concentración de NaClO se presentó mayor cantidad de explantes necrosados.

En la Figura 3.4 se muestran fotografías de ejes embriogénicos contaminados por bacterias, hongos y cotiledones necrosados apreciados a los 25 días.



**Figura 3.4** Factores de descarte en ejes embriogénicos durante la fase de Desinfección **A)** contaminación bacteriana, **B)** contaminación fúngica y **C)** necrosis del explante (Ortega, 2012).

En la figura 3.5 del diagrama de dispersión de componentes se modela la correlación entre los niveles de cada factor que formaron los tratamientos de desinfección para el caso de los ejes embriogénicos, el tiempo de inmersión de los ejes embriogénicos al hipoclorito vs la concentración del mismo.



**Figura 3.5:** Diagrama de dispersión del análisis de componentes (tiempo de exposición vs concentración de NaClO) de los tratamiento de desinfección para cada una de las condiciones de descarte en ejes embriogénicos (Ortega, 2012).

### **3.2 Fase 2: Ensayo preliminar para la inducción a callo**

Luego del establecimiento de los métodos de desinfección para los dos explantes usados en este estudio (cotiledones y ejes embriogénicos de la semilla de guarango), se procedió a realizar dos ensayos para la inducción a callo embriogénico.

Acorde a la metodología descrita para esta fase tanto para cotiledones como para ejes embriogénicos se utilizó medio MS y Gamborg B5 con tres diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento más dos controles.

Los resultados se presentarán primero en cotiledones y luego en ejes embriogénicos, en el siguiente orden: formación de callo evaluado a los 60 días, tiempo de formación de callo evaluado a los 15, 30, 45 y 60 días y morfología del callo.

#### **3.2.1 Cotiledones**

##### **3.2.1.1 Formación de callo**

Se analizó el porcentaje total de formación de callo al término de 60 días de haber sido establecidos.

Tras el análisis del efecto del medio de cultivo se pudo observar que en el medio MS se presentó mayor formación de callo (42,5%) a diferencia del medio Gamborg B5 que mostró un porcentaje de formación de callo de 14,2%.

**Tabla 3.6** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de la formación y ausencia de callo en cotiledones, evaluados a los 60 días.

Tratamientos preliminares inducción			Condición		Total
Medio	Reguladores de Crecimiento		Formación de callo	No formación de callo	
MS	<b>Control 1</b>	Frec	0	30	30
		%	,0%	100,0%	100,0%
	<b>T1</b> 2,4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	19	11	30
		%	63,3%	36,7%	100,0%
	<b>T2</b> 2,4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0,5 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	10	19	30
		%	33,3%	63,3%	100,0%
	<b>T3</b> TDZ (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA(0,05 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	22	8	30
		%	73,3%	26,7%	100,0%
	Total	Frec	<b>51</b>	<b>68</b>	<b>120 (100%)</b>
		%	<b>42,5%</b>	<b>56,6%</b>	
Gamborg B5	<b>Control 2</b>	Frec	0	30	30
		%	,0%	100,0%	100,0%
	<b>T4</b> 2,4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	8	13	30
		%	26,7%	43,3%	100,0%
	<b>T5</b> 2,4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0,5 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	9	7	30
		%	30,0%	23,3%	100,0%
	<b>T6</b> TDZ (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA(0,05 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	30	30
		%	,0%	100,0%	100,0%
	Total	Frec	<b>17</b>	<b>80</b>	<b>120 (100%)</b>
		%	<b>14,2%</b>	<b>66,7%</b>	

De la misma manera, se puede observar en la Tabla 3.6 que la combinación medio de cultivo – reguladores de crecimiento genero dos tratamientos que se destacaron en la formación de callo, T3 (MS: TDZ (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) + AIA (0,05 mg.L<sup>-1</sup>)) con un 73,3% de callos formados y una ausencia de callo del 26,7%, de igual manera T1 (MS: 2, 4-D (2 mg.L<sup>-1</sup>) + Kin (1 mg.L<sup>-1</sup>)) tiene una proporción de 63,3% en la formación de callo.

Por otro lado, los tratamientos que presentaron porcentajes bajos de callo formado fueron: T2 (MS: 2,4-D ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ )) que presentó un porcentaje de 33,3% en la formación de callo, T4 (Gamborg B5: 2,4-D ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + Kin ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ )) y T5 (Gamborg B5: 2, 4-D ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ )) presentaron porcentajes inferiores al Tratamiento 2 (T2).

Para la variable ausencia de callo, además de los controles C1 (MS) y C2 (Gamborg B5) que presentaron un porcentaje del 100% de ausencia de callo, el tratamiento T6 (Gamborg B5: TDZ ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + AIA ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ )) fue el único con ausencia total de callos formados.

### **3.2.1.2 Tiempo de formación de callo**

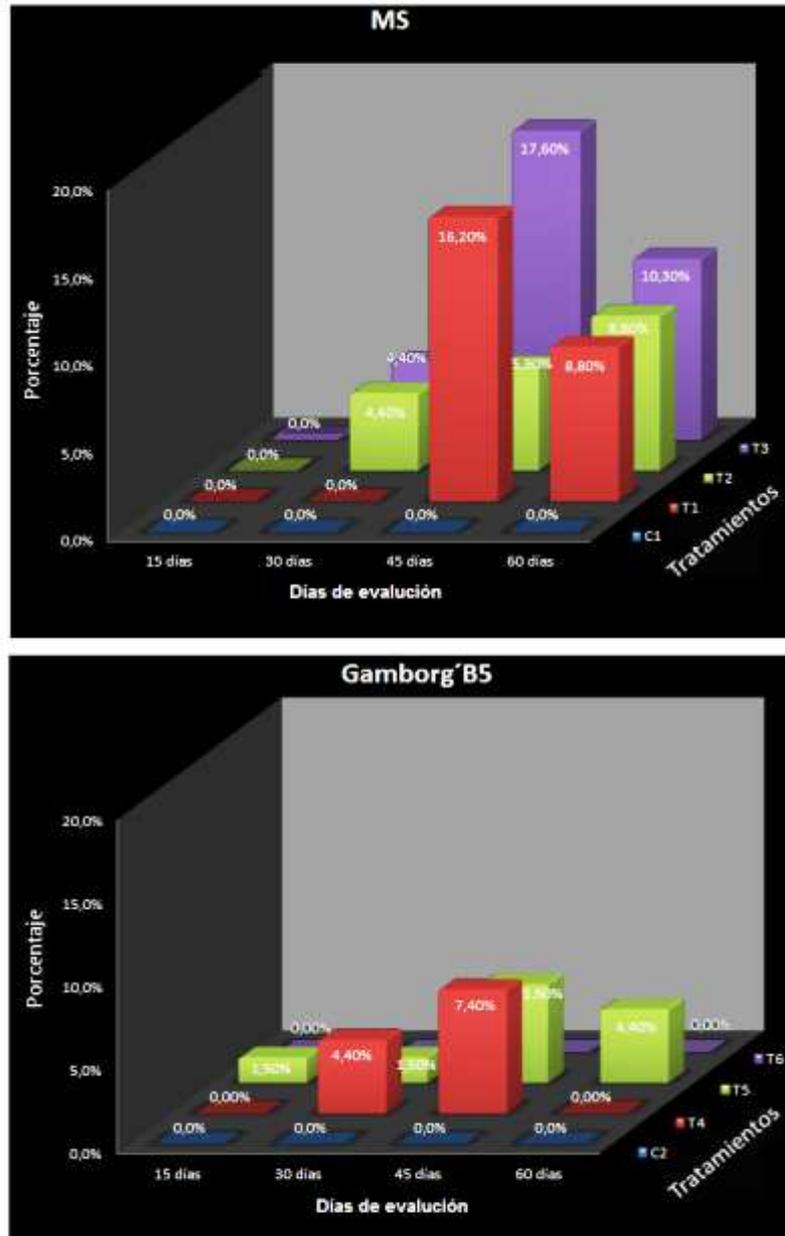
Los resultados de la variable tiempo de formación de callo fueron evaluados en cuatro períodos (15, 30, 45 y 60 días) a partir del porcentaje total de callo formado 56,7% (Tabla 3.6).

En el medio MS a los 15 días de evaluación no se evidenció presencia de callo, mientras el mayor porcentaje de formación de callo en este mismo medio se presentó a los 45 días de evaluación. En tanto que, para el caso del medio Gamborg B5 se observó de manera general menor porcentaje de formación de callo que en el medio MS, sin embargo, en los cuatro períodos evaluados se evidencio formación de callo (Tabla 3.7).

**Tabla 3.7** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de formación de callo en cotiledones, evaluados a los 15, 30, 45 y 60 días.

Tratamientos preliminares inducción			Condición			
Medio	Reguladores de Crecimiento		15 días	30 días	45 días	60 días
MS	<b>Control 1</b>	Frec	0	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%	,0%
	<b>T1</b> 2,4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	11	6
		%	,0%	,0%	16,2%	8,8%
	<b>T2</b> 2,4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0,5 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	3	4	6
		%	,0%	4,4%	5,9%	8,8%
	<b>T3</b> TDZ (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA (0,05 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	3	12	7
		%	,0%	4,4%	17,6%	10,3%
	<b>Total</b>	Frec	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>27</b>	<b>19</b>
		%	<b>,0%</b>	<b>8,8%</b>	<b>39,7%</b>	<b>27,9%</b>
Gamborg B5	<b>Control 2</b>	Frec	0	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%	,0%
	<b>T4</b> 2,4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	3	5	0
		%	,0%	4,4%	7,4 %	,0%
	<b>T5</b> 2,4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0,5 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	1	1	4	3
		%	1,5%	1,5%	5,9%	4,4%
	<b>T6</b> TDZ (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA (0,05 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%	,0%
	<b>Total</b>	Frec	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>3</b>
		%	<b>3,3%</b>	<b>4,4%</b>	<b>13,2%</b>	<b>4,4%</b>

Al estudiar el efecto que causa la combinación de medio de cultivo-reguladores de crecimiento, se destacaron los tratamientos T1 y T3 a los 45 y 60 días de evaluación como se puede apreciar en la Tabla 3.7 y Figura 3.6.



**Figura 3.6:** Porcentajes de callo formados en cotiledones a los 15, 30, 45 y 60 días en los tratamientos de inducción a callo (Ortega, 2012).

### 3.2.1.3 Morfología de los callos

Para el análisis macro-morfológico de los callos formados (Tabla 3.6) en cada uno de los tratamientos preliminares de inducción aplicados se tomó en cuenta textura del callo (friable; compacto) y color (translúcido, café, crema y

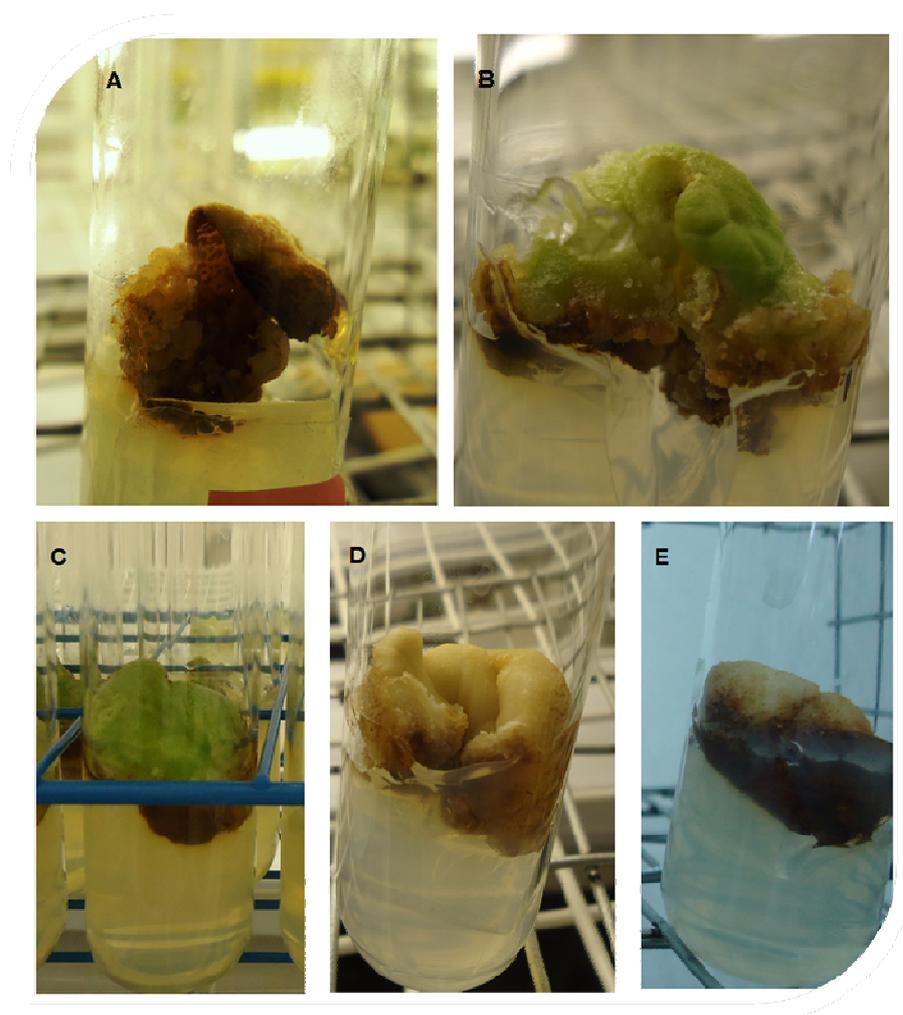
verde) como se muestran en la Tabla 3.8, pudiendo de esta manera conocer las características de dichos callos, en la Figura 3.7 se pueden ver fotografías de los diferentes tipos de callos formados.

Además se analizaron las variables textura y el color de los callos formados, mediante la prueba Chi<sup>2</sup>, con la cual se verificó la relación directa entre las variables textura y color del callo en los tratamientos que presentaron formación de callo.

**Tabla 3.8** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de las características macro-morfológicas de los callos formados en cotiledones.

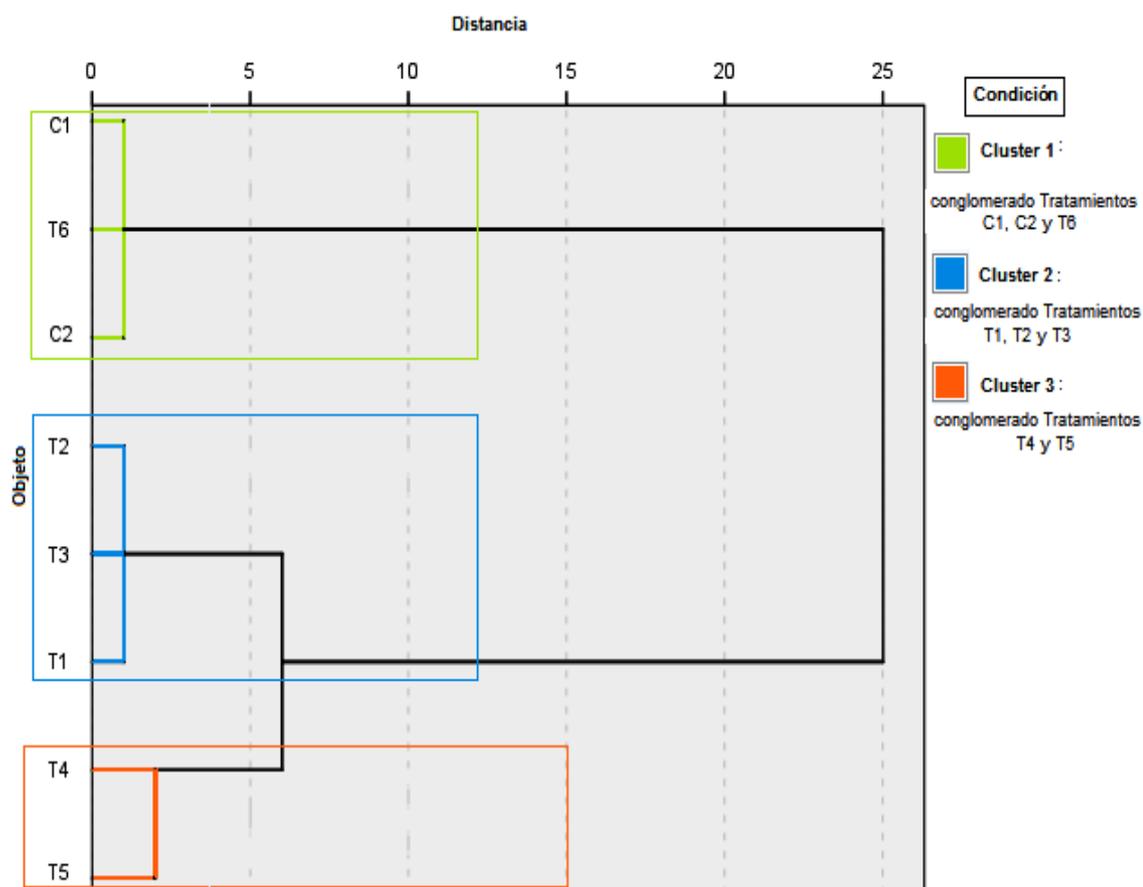
Tratamientos preliminares inducción			Color				Textura	
Medio	Reguladores de Crecimiento		Translúcido	Café	Crema	Verde	Friable	Compacto
MS	<b>Control 1</b>	Frec	0	0	0	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%
	<b>T1</b> 2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	17	0	0	0	17	0
		%	24,9%	,0%	,0%	,0%	27,9%	,0%
	<b>T2</b> 2,4-D (1 mgL <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	10	3	0	0	10	3
		%	14,7%	4,4%	,0%	,0%	14,7%	4,4%
	<b>T3</b> TDZ (0.2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA (0.05 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	19	0	0	2	19	2
		%	27,9%	,0%	,0%	2,9%	29,4%	2,9%
	<b>Total</b>	Frec	<b>46</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>46</b>	<b>5</b>
		%	<b>67,64%</b>	<b>4,4%</b>	<b>,0%</b>	<b>2,9%</b>	<b>67,64%</b>	<b>7,4%</b>
Gamborg B5	<b>Control 2</b>	Frec	0	0	0	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%
	<b>T4</b> 2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	0	6	2	0	0	8
		%	,0%	8,8%	2,9%	,0%	,0%	11,8%
	<b>T5</b> 2,4-D (1 mgL <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	5	4	0	9
		%	,0%	,0%	7,4%	5,8%	,0%	13,2%
	<b>T6</b> TDZ (0.2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA (0.05 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	0	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%
	<b>Total</b>	Frec	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>17</b>
		%	<b>,0%</b>	<b>8,8%</b>	<b>10,3%</b>	<b>5,8%</b>	<b>,0%</b>	<b>25%</b>
Chi-cuadrado de Pearson			162,821 <sup>a</sup>					

Para conocer si existe una correlación entre las variables color y textura de los callos formados en cada tratamiento aplicado se realizó una prueba Chi cuadrado de Pearson que tomó un valor de 162,821, al 95% de confianza, por lo cual se decide rechazar la hipótesis de independencia y concluir que el color y textura están relacionados con los tratamientos de inducción aplicados.



**Figura 3.7:** Fotografías de los callos formados en cotiledones: **A)** callo friable - translúcido del tratamiento T1, **B)** callo friable - translúcido del tratamiento T3, **C)** callo compacto-verde del tratamiento T5, **D)** callo compacto - crema del tratamiento T4 **E)** callo compacto - café del tratamiento T4 (Ortega, 2012).

Mediante el análisis cluster jerárquico (Figura 3.8) se pudo conglomerar los callos formados según las características distintivas que mostraron cada uno, mediante la selección de la medida usada para comprobar el semejante entre los explantes usados con distintas distancias y de esta manera agruparlos según sus características.



**Figura 3.8:** Análisis cluster jerárquico de los callos formados en los cotiledones, por combinación de conglomerados re-escalados (Ortega, 2012).

Como se puede distinguir en la Figura 3.8 existen tres cluster o conglomerados, de los cuales el cluster 2, reunió a los tratamientos 1,2 y 3 en los cuales se presentó formación de callo con características similares, que se describen en la Tabla 3.8 y que distingue a un callo embriogénico morfológicamente hablando. El cluster 3, conglomeró a los tratamientos 4 y 5, que

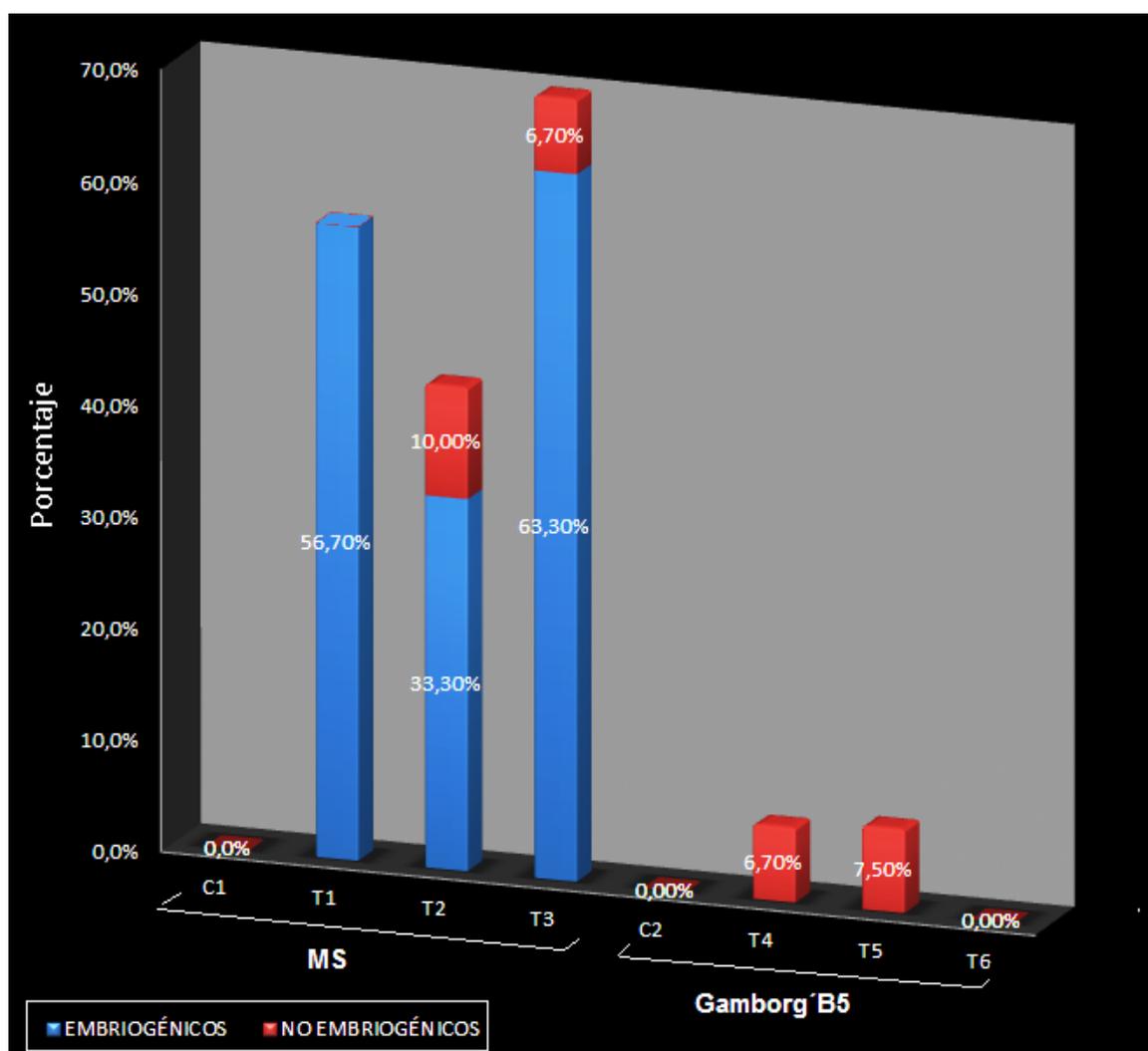
mostraron callos de textura compacta y de color café, crema y verde siendo estas características típicas de callos no embriogénicos. El cluster 1 conglomeró los casos que no presentaron formación de callo.

En la Tabla 3.9 se puede observar en que tratamiento y cuantos de los callos formados fueron embriogénicos o no embriogénicos y así identificar el mejor medio de cultivo conjuntamente con la combinación de reguladores de crecimiento con los cuales se pudo construir el ensayo final de inducción a callo.

**Tabla 3.9** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de callos formados, callos embriogénicos y no embriogénicos en cotiledones, evaluados a los 60 días.

Tratamientos preliminares inducción		Condición			
Medio	Reguladores de Crecimiento	Formación de callo			
		Emb	No Emb.	Total	
MS	<b>Control 1</b>	Frec	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%
	<b>T1</b> 2,4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	17	0	17
		%	56,7%	,0%	56,7%
	<b>T2</b> 2,4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	10	3	13
		%	33,3%	10,0%	43,3%
	<b>T3</b> TDZ(0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA(0.05 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	19	2	21
		%	63,3%	6,7%	70,0%
	<b>Total</b>	Frec	<b>46</b>	<b>5</b>	<b>51</b>
		%	<b>38,3%</b>	<b>4,2%</b>	<b>42,5%</b>
Gamborg B5	<b>Control 2</b>	Frec	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%
	<b>T4</b> 2,4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	8	8
		%	,0%	6,7%	6,7%
	<b>T5</b> 2,4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	9	9
		%	,0%	7,5%	7,5%
	<b>T6</b> TDZ (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA(0.05 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%
	<b>Total</b>	Frec	<b>0</b>	<b>17</b>	<b>17</b>
		%	<b>,0%</b>	<b>14,2%</b>	<b>14,2%</b>

En la Tabla 3.9 se puede observar que el medio MS presentó el mayor porcentaje de callo embriogénico 38,3% y una frecuencia de 46 de una frecuencia total de 120 para éste medio de cultivo, entre tanto en el medio Gamborg B5 el porcentaje de callo embriogénico fue 0,0%.



**Figura 3.9:** Porcentajes de callos embriogénicos y no embriogénicos en cotiledones, evaluados a los 60 días (Ortega, 2012).

De los resultados de la formación de callo en cada uno de los tratamientos de inducción aplicados, se identificó con la ayuda del análisis cluster jerárquico callos embriogénicos y no embriogénicos. De tal manera, en la Figura 3.9 y en la

Tabla 3.9 se puede visualizar que en el Tratamiento 3 (MS: TDZ (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) + AIA (0,05 mg.L<sup>-1</sup>)) con un 73,3% de formación total de callo, el 63,3% fue callo embriogénico y el 6,7% no embriogénico, el tratamiento T1 (MS: 2, 4-D (2 mg.L<sup>-1</sup>) + Kin (1 mg.L<sup>-1</sup>)) también presentó un porcentaje alto de formación de callo 56,7%, de éste su totalidad fueron callos embriogénicos. T2 (MS: 2,4-D (1 mg.L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup>)) presentó callos embriogénicos en su totalidad aunque su porcentaje de formación de callo fue baja 33,3%.

T4 (Gamborg B5: 2,4-D (2 mg.L<sup>-1</sup>) + Kin (1 mg.L<sup>-1</sup>)) y T5 (Gamborg B5: 2, 4-D (1 mg.L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup>)) presentaron un porcentaje menor a 33,3% en la formación de callo, y ambos tratamientos mostraron callos no embriogénicos.

### **3.2.2 Ejes embriogénicos**

#### **3.2.2.1 Formación de callo**

Se analizó el porcentaje total de formación de callo al término de 60 días de haber sido establecidos.

En la Tabla 3.10 se muestra de manera general, que el medio MS presentó un porcentaje de formación de callo de 18,3%, mientras que en el medio Gamborg B5 la formación de callo obtuvo un porcentaje de 28,3%.

En cuanto al análisis específico de la combinación: medio de cultivo-reguladores de crecimiento, se observó mayoritariamente porcentajes bajos de formación de callo exceptuado T6 (Gamborg B5: TDZ (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) + AIA (0,05 mg.L<sup>-1</sup>)) que presentó el porcentaje más alto 66,7%, el T2 (MS: 2,4-D (1 mg.L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup>)) mostró un porcentaje del 40% y los tratamientos: T1 (MS: 2,4D

(2 mg.L<sup>-1</sup>) + Kin (1 mg.L<sup>-1</sup>)) T5 (Gamborg B5: 2,4-D (1 mg.L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup>)) Y T4 (Gamborg B5: 2,4-D (2 mg.L<sup>-1</sup>) + Kin (1 mg.L<sup>-1</sup>)) presentaron porcentajes inferiores al obtenido en T2 es decir menores al 40%.

En cuanto a la ausencia de callo, T3 (MS: TDZ (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) + AIA (0,05 mg.L<sup>-1</sup>)) manifestó ausencia total de callos formados, al igual que en los controles C1 (MS) y C2 (Gamborg B5).

**Tabla 3.10** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de la formación y ausencia de callo en ejes embriogénicos, evaluados a los 60 días.

Tratamientos preliminares inducción			Condición		Total
Medio	Reguladores de Crecimiento		Formación de callo	Ausencia de callo	
MS	<b>Control 1</b>	Frec	0	30	30
		%	,0%	100,0%	100,0%
	<b>T1</b> 2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	10	20	30
		%	33,3%	66,7%	100,0%
	<b>T2</b> 2,4-D (1 mgL <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	12	18	30
		%	40,0%	60,0%	100,0%
	<b>T3</b> TDZ(0.2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0.05 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	0	30	30
		%	,0%	100,0%	100,0%
	Total	Frec	<b>22</b>	<b>98</b>	<b>120</b>
		%	<b>18,3%</b>	<b>81,7%</b>	<b>100%</b>
Gamborg B5	<b>Control 2</b>	Frec	0	30	30
		%	,0%	100,0%	100,0%
	<b>T4</b> 2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	6	24	30
		%	20,0%	80,0%	100,0%
	<b>T5</b> 2,4-D (1 mgL <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	8	22	30
		%	26,7%	73,3%	100,0%
	<b>T6</b> TDZ (0.2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0.05 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	20	10	30
		%	66,7%	33,3%	100,0%
	Total	Frec	<b>34</b>	<b>86</b>	<b>120 (100%)</b>
		%	<b>28,3%</b>	<b>71,7%</b>	

### 3.2.2.2 Tiempo de formación de callo

Para la variable tiempo de formación de callo en ejes embriogénicos se evaluó cuatro períodos (15, 30, 45 y 60 días), para verificar en que período de tiempo se presentó mayor formación de callo tomando en cuenta el porcentaje total de callo formado (46,6%).

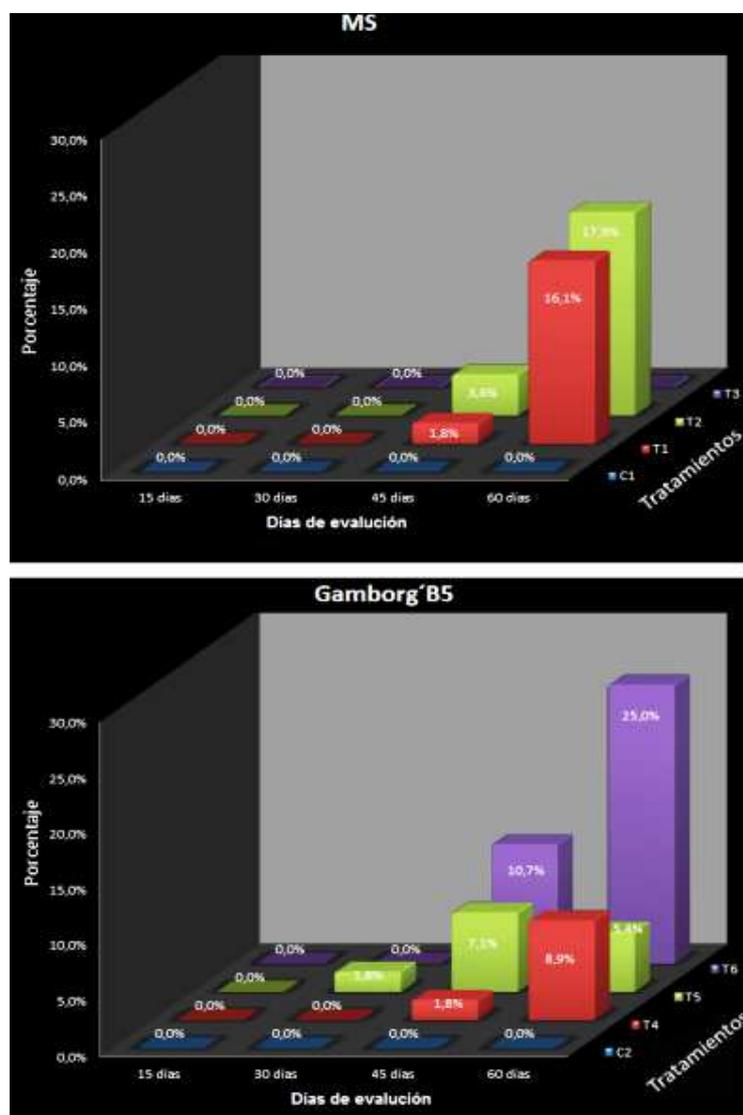
**Tabla 3.11** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de formación de callo en ejes embriogénicos, evaluados a los 15, 30, 45 y 60 días.

Tratamientos preliminares inducción			Condición			
Medio	Reguladores de Crecimiento		15 días	30 días	45 días	60 días
MS	<b>Control 1</b>	Frec	0	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%	,0%
	<b>T1</b> 2,4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	1	9
		%	,0%	,0%	1,8%	16,1%
	<b>T2</b> 2,4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	2	10
		%	,0%	,0%	3,6%	17,9%
	<b>T3</b> TDZ (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA (0.05 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%	,0%
	<b>Total</b>	Frec	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>19</b>
		%	<b>,0%</b>	<b>,0%</b>	<b>5,4%</b>	<b>33,9%</b>
Gamborg B5	<b>Control 2</b>	Frec	0	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%	,0%
	<b>T4</b> 2,4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	1	5
		%	,0%	,0%	1,8%	8,9%
	<b>T5</b> 2,4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	1	4	3
		%	,0%	1,8%	7,1%	5,4%
	<b>T6</b> TDZ (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA (0.05 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	6	14
		%	,0%	,0%	10,7%	25%
	<b>Total</b>	Frec	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>22</b>
		%	<b>,0%</b>	<b>1,8%</b>	<b>19,6%</b>	<b>39,3%</b>

En el medio MS a los 15 y 30 días de evaluación no se evidenció presencia de callo, por otro lado a los 60 días de evaluación se observó el mayor porcentaje de formación de callo (33,9%). Para el caso del medio Gamborg B5 se

observo de manera general mayor formación de callo que en el medio MS presentando a los 60 días de evaluación el mayor porcentaje de callos formados 39,3% (Tabla 3.11).

Al estudiar el efecto que causa la combinación: medio de cultivo-reguladores de crecimiento, se destacó el tratamiento T6 a los 60 días de evaluación con un porcentaje de 25% como se puede apreciar en la Tabla 3.11 y Figura 3.10.



**Figura 3.10:** Porcentajes de callo formados en ejes embriogénicos a los 15, 30, 45 y 60 días en los tratamientos de inducción a callo (Ortega, 2012).

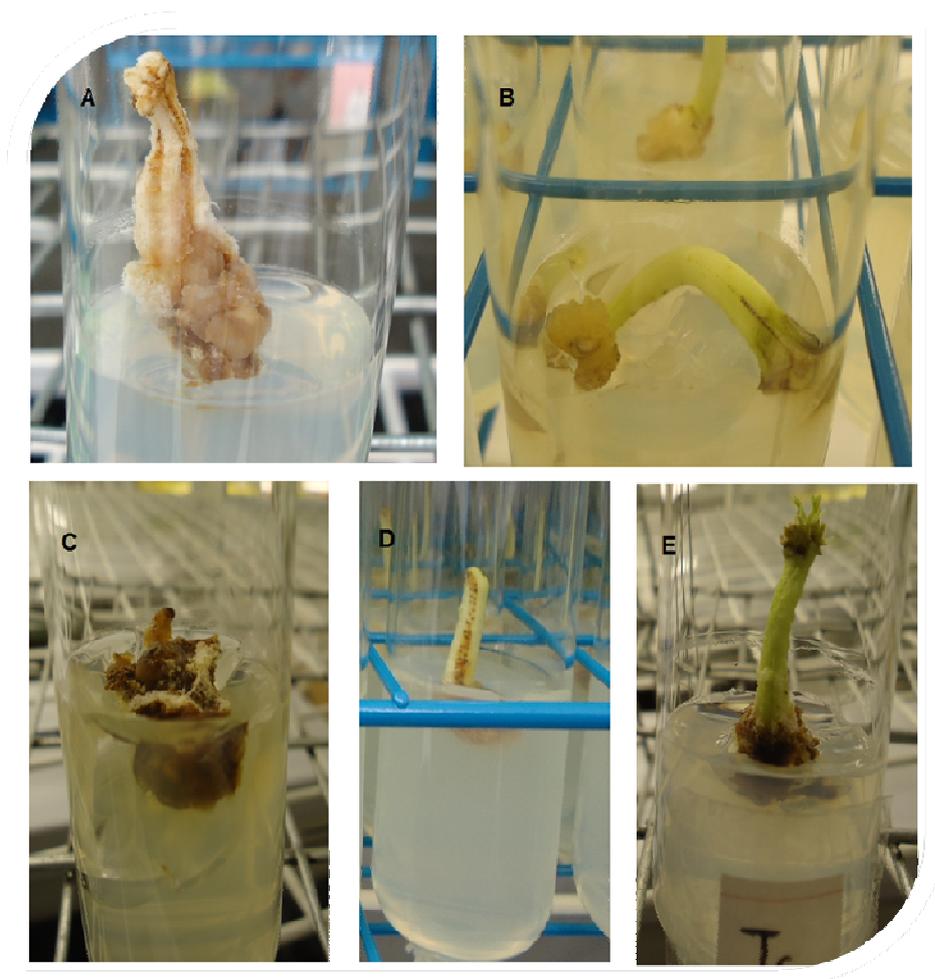
### 3.2.2.3 Morfología de los callos

Se realizó el análisis macro-morfológico de los callos formados (Tabla 3.6) en cada uno de los tratamientos preliminares de inducción aplicados a los ejes embriogénicos tomándose en cuenta textura del callo (friable; compacto) y color (translúcido, café, crema y verde) como se muestran en la Tabla 3.12, pudiendo de esta manera conocer las características de dichos callos, en la Figura 3.11 se pueden ver fotografías de los diferentes tipos de callos formados.

**Tabla 3.12** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de las características macro-morfológicas de los callos formados en ejes embriogénicos.

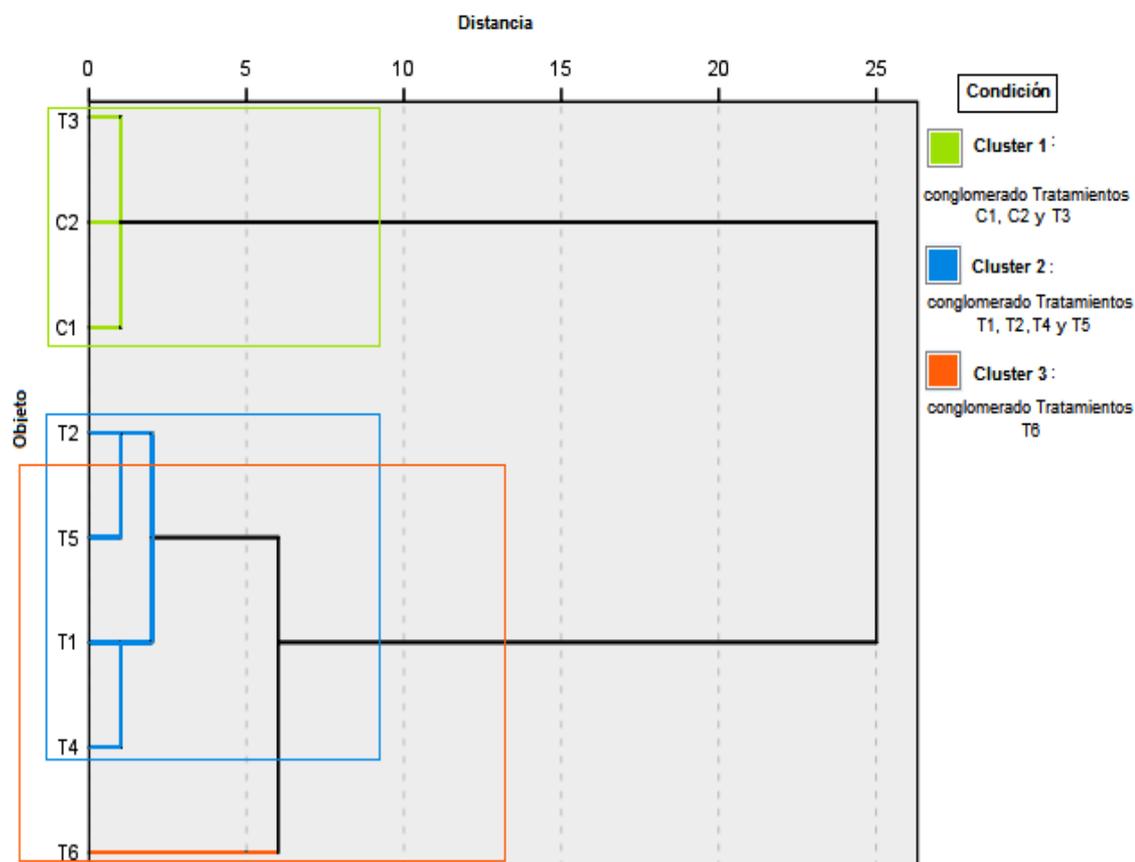
Tratamientos preliminares inducción			Color				Textura		
Medio	Reguladores de Crecimiento		Translúcido	Café	Crema	Verde	Friable	Compacto	
MS	<b>C1</b>	Frec	0	0	0	0	0	0	
		%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	
	<b>T1</b> 2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	1	9	0	0	1	9	
		%	1,8%	16,1%	,0%	,0%	1,8%	16,1%	
	<b>T2</b> 2,4-D (1 mgL <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	2	2	8	0	2	10	
		%	3,6%	3,6%	10,7%	,0%	3,6%	17,9%	
	<b>T3</b> TDZ (0.2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA (0.05 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	0	0	0	0	
		%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	
<b>Total</b>		Frec	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>19</b>	
		%	<b>5,4%</b>	<b>19,6%</b>	<b>10,7%</b>	<b>,0%</b>	<b>5,4%</b>	<b>33,9%</b>	
Gamborg B5	<b>C2</b>	Frec	0	0	0	0	0	0	
		%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	
	<b>T4</b> 2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	0	5	1	0	0	6	
		%	,0%	8,9%	1,8%	,0%	,0%	10,7%	
	<b>T5</b> 2,4-D (1 mgL <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	0	2	6	0	0	8	
		%	,0%	3,6%	10,7%	,0%	,0%	14,3%	
	<b>T6</b> TDZ (0.2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA (0.05 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	3	17	0	20	
		%	,0%	,0%	5,4%	30,4%	,0%	35,7%	
<b>Total</b>		Frec	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>0</b>	<b>34</b>	
		%	<b>,0%</b>	<b>12,5%</b>	<b>19,6%</b>	<b>30,4%</b>	<b>,0%</b>	<b>60,7%</b>	
Chi-cuadrado de Pearson			80,642 <sup>a</sup>						

El valor de la prueba Chi cuadrado de Pearson fue 80,642 al 95% de confianza, por lo cual se decide rechazar la hipótesis de independencia y concluir que el color y textura están relacionados con los tratamientos de inducción aplicados.



**Figura 3.11:** Fotografías de los callos formados en ejes embriogénicos: **A)** callo con parte friable - translúcido del tratamiento T1, **B)** callo con parte friable - translúcido del tratamiento T2, **C)** callo compacto- café del tratamiento T4, **D)** callo compacto - crema del tratamiento T5 **E)** callo compacto - verde del tratamiento T6 (Ortega, 2012).

De manera similar al caso de los cotiledones, se realizó un análisis cluster jerárquico (Figura 3.12) por medio del cual se pudo conglomerar los callos formados según las características distintivas que mostradas en cada uno de ellos.



**Figura 3.12:** Análisis cluster jerárquico de los callos formados en los ejes embriogénicos, por combinación de conglomerados re-escalados (Ortega, 2012).

Como se puede distinguir en la Figura 3.12 existen tres cluster o conglomerados, de los cuales el cluster 2 reunió a los tratamientos 1,2, 4 y 5 que presentaron callos con textura compacta pero se visualiza que se sub-conglomeran previamente debido a que el T2 y T5 presentaron una mayor cantidad de callos de color crema, mientras que T1 y T4 mostraron en su mayoría callos de color café (ver Tabla 3.12). El cluster 3 se conglomera y transpone con el cluster 2 debido a que el Tratamiento T6 que pertenece al cluster 3 presentó callos

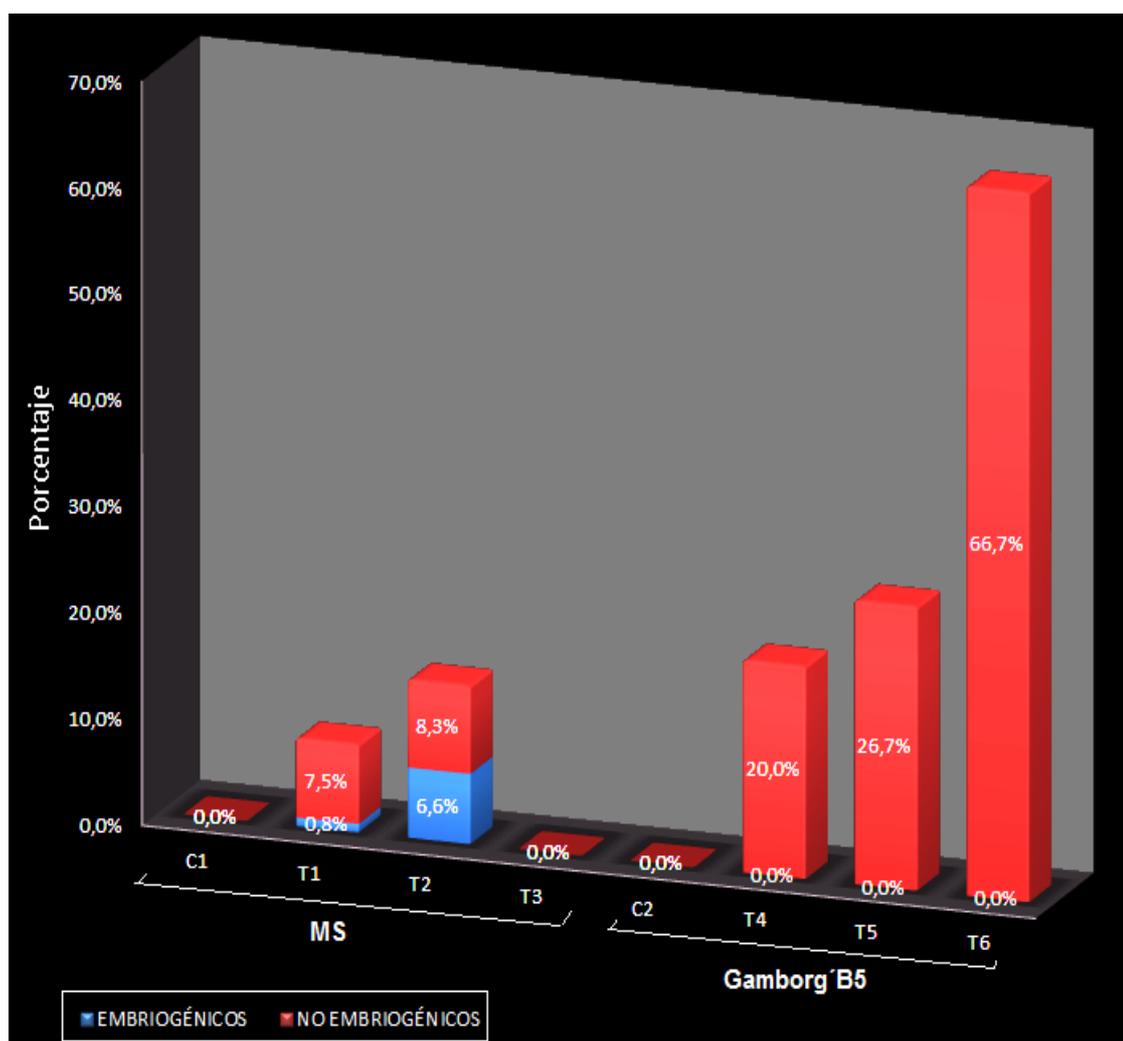
con textura compacta pero el color de todos los callos formados fue de color verde. El cluster 1 conglomeró los casos que no presentan formación de callo.

Se puede observar en la Tabla 3.13 en que tratamiento y cuantos de los callos formados fueron embriogénicos o no embriogénicos y así identificar el mejor medio de cultivo conjuntamente con la combinación de reguladores de crecimiento.

**Tabla 3.13** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de callos formados, callos embriogénicos y no embriogénicos en ejes embriogénicos, evaluados a los 60 días.

Tratamientos preliminares inducción		Condición			
Medio	Reguladores de Crecimiento		Formación de callo		
			Emb	No Emb.	Subtotal
MS	<b>Control 1</b>	Frec	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%
	<b>T1</b> 2,4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	1	9	10
		%	0,8%	7,5%	8,3%
	<b>T2</b> 2,4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	2	10	12
		%	6,6%	8,3%	10%
	<b>T3</b> TDZ(0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA(0.05 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%
	<b>Total</b>	Frec	<b>3</b>	<b>19</b>	<b>22</b>
		%	<b>2,5%</b>	<b>15,8%</b>	<b>18,3%</b>
Gamborg B5	<b>Control 2</b>	Frec	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%
	<b>T4</b> 2,4-D (2 mg.L <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	6	6
		%	,0%	20%	20%
	<b>T5</b> 2,4-D (1 mg.L <sup>-1</sup> ) + BAP (0.5 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	8	8
		%	,0%	26,7%	26,7%
	<b>T6</b> TDZ (0.2 mg.L <sup>-1</sup> ) + AIA(0.05 mg.L <sup>-1</sup> )	Frec	0	20	20
		%	,0%	66,7%	66,7%
	<b>Total</b>	Frec	<b>0</b>	<b>34</b>	<b>34</b>
		%	<b>,0%</b>	<b>28,3%</b>	<b>28,3%</b>

En la Tabla 3.13 se puede observar que sólo el medio MS presentó formación de callo embriogénico en un proporción de 2,5% y una frecuencia de 3 de la frecuencia total de 120 para este medio de cultivo, entre tanto en el medio Gamborg B5 el porcentaje de callo embriogénico fue 0,0%.



**Figura 3.13:** Porcentajes de callos embriogénicos y no embriogénicos en ejes e., evaluados a los 60 días (Ortega, 2012).

De los resultados de la formación de callo en cada uno de los tratamientos de inducción aplicados se identificó con la ayuda del análisis cluster jerárquico callos embriogénicos y no embriogénicos. De tal manera, en la Figura

3.14 y en la Tabla 3.13 se observó que en T2 (MS: 2,4-D ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ )) presentó un porcentaje de callos embriogénicos y un 33,3% de callos no embriogénicos, el T1 (MS: 2, 4-D ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + Kin ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ )) mostró un 3,3% de callos embriogénicos y un 30% de callos no embriogénicos.

T6 (Gamborg B5: TDZ ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + AIA ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ )) presentó un alto porcentaje de callos formados 66,7% pero en su totalidad fueron callos no embriogénicos.

Los tratamientos T4 (Gamborg B5: 2,4-D ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + Kin ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ )) T5 (Gamborg B5: 2, 4-D ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ )) mostraron porcentajes bajos 20% y 26,7% respectivamente, en la formación de callo destacando que ambos tratamientos presentaron callos no embriogénicos.

### **3.3 Fase 3: Ensayo final para la inducción a callo**

Tras los resultados obtenidos en los ensayos preliminares de inducción a callo en cotiledones y ejes embriogénicos, se continuó con el estudio únicamente de los cotiledones debido a que estos produjeron resultados positivos para la formación de callo embriogénico. Por otra parte, la investigación para la inducción a callo embriogénico en ejes embriogénicos no se extendió debido a los resultados que se dieron en el ensayo preliminar de inducción, ya que se obtuvo un rendimiento bajo de callos embriogénicos.

#### **3.3.1 Formación de callo en cotiledones**

De acuerdo a la metodología establecida para esta fase (Tabla 2.3) se pudo seleccionar los dos mejores tratamientos empleados que generaron la mayor presencia de callo embriogénico viable de la fase 2: ensayo preliminar de

inducción a callo y con ellos se procedió a montar el ensayo final de inducción, que presenta tres niveles de concentraciones de las combinaciones de los reguladores en el medio de cultivo MS, de manera ortogonal, dando como resultados los mostrados a continuación en la Tabla 3.14.

**Tabla 3.14** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de la formación, ausencia de callo y callos descartados en cotiledones, evaluados a los 60 días.

Tratamientos finales inducción			Condición			Total
Medio	Reguladores de Crecimiento		Formación de callo	Ausencia de callo	Descartados	
MS	<b>C1</b>	Frec	0	29	1	30
		%	,0%	96,7%	3,3%	100,0%
	<b>T1</b>	Frec	4	25	1	30
		2,4-D (1 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (0,5 mgL <sup>-1</sup> ) %	13,3%	83,3%	3,3%	100,0%
	<b>T2</b>	Frec	18	12	0	30
		2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mgL <sup>-1</sup> ) %	60,0%	40,0%	,0%	100,0%
	<b>T3</b>	Frec	30	0	0	30
		2,4-D (4 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (2 mgL <sup>-1</sup> ) %	100,0%	,0%	,0%	100,0%
	<b>T4</b>	Frec	12	18	0	30
		TDZ (0,1mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,025mgL <sup>-1</sup> ) %	40,0%	60,0%	,0%	100,0%
	<b>T5</b>	Frec	23	7	0	30
		TDZ (0,2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,05 mgL <sup>-1</sup> ) %	76,7%	23,3%	,0%	100,0%
	<b>T6</b>	Frec	5	25	0	30
		TDZ (0,4 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,10 mgL <sup>-1</sup> ) %	16,7%	90,0%	,0%	100,0%
Total	Frec	<b>92</b>	<b>146</b>	<b>2</b>	<b>210 (100%)</b>	
	%	<b>38,3%</b>	<b>60,8%</b>	<b>,8%</b>		
Chi-cuadrado de Pearson			98,694 <sup>a</sup>			

A excepción del tratamiento control C1, todos los tratamientos aplicados en la inducción presentaron callos formados, de ellos el tratamiento T3 (MS: 2,4-D (4 mg.L<sup>-1</sup>) + Kin (2 mg.L<sup>-1</sup>)) mostro un 100% de callos formados, en segunda instancia el tratamiento T5 (MS: TDZ (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) + AIA (0,05 mg.L<sup>-1</sup>)) presentó un 76,7% de callos formados y en tercer instancia el tratamiento T2 (MS: 2,4-D (2

mg.L<sup>-1</sup>) + Kin (1 mg.L<sup>-1</sup>)) que mostró un porcentaje del 60,0% en la formación de callo.

Niveles bajos en la formación de callo manifestó el tratamiento T4 (MS: TDZ (0,1 mg.L<sup>-1</sup>) + AIA (0,025 mg.L<sup>-1</sup>)) con un porcentaje del 40% de callos formados, mientras que T1 (MS: 2,4-D (1 mg.L<sup>-1</sup>) + Kin (0,5 mg.L<sup>-1</sup>)) y T6 (MS: TDZ (0,4 mg.L<sup>-1</sup>) + AIA (0,10 mg.L<sup>-1</sup>)) presentaron porcentajes del 13,3% y 10,0% respectivamente.

Por otro lado, los niveles de descarte fueron mínimos, se evidenciaron porcentajes de 3.3% de descarte en el tratamiento T1 y en el control C1.

Para el análisis estadístico de los datos de inducción a callo de cotiledones, Chi- cuadrado de Pearson (Tabla 3.14) tomó un valor de 98,694 al 95% de confianza, por lo cual se decide rechazar la hipótesis de independencia y concluir que las variables, formación, ausencia y descartados para los explantes - cotiledones están relacionadas con los tratamientos aplicados de inducción a callo.

### **3.3.2 Tiempo de formación de callo**

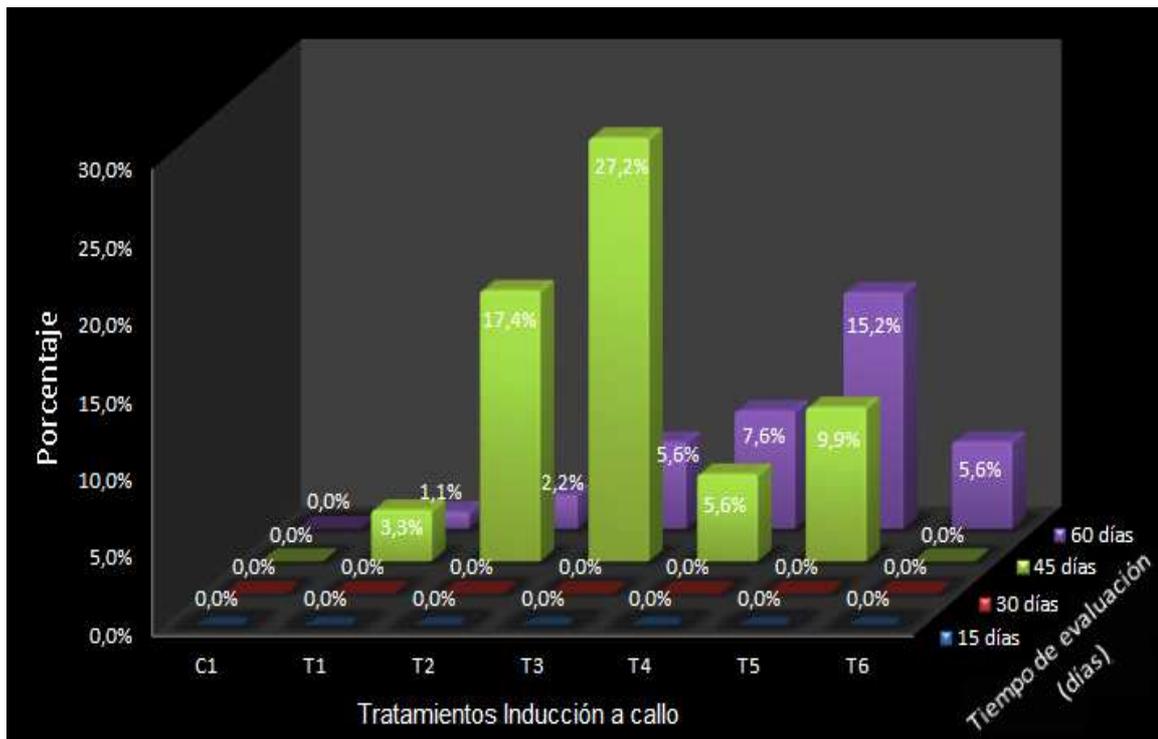
Se evaluó el tiempo de formación de callo en cotiledones, a partir de cuatro períodos (15, 30, 45 y 60 días), para verificar en que período de tiempo se presenta mayor porcentaje de formación de callo.

De manera general, se puede ver en la Tabla 3.15 que a los 15 y 30 días de evaluación no se evidenció presencia de callos formados, mientras que el mayor porcentaje de callos formados fue a los 45 días de evaluación con 63% de callos formados.

**Tabla 3.15** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de formación de callo en cotiledones, evaluados a los 15, 30, 45 y 60 días.

Tratamientos preliminares inducción		Condición				
Medio	Reguladores de Crecimiento	15 días	30 días	45 días	60 días	
MS	<b>Control 1</b>	Frec	0	0	0	0
		%	,0%	,0%	,0%	,0%
	<b>T1</b>	Frec	0	0	3	1
	2,4-D (1 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (0,5 mgL <sup>-1</sup> )	%	,0%	,0%	3,3%	1,1%
	<b>T2</b>	Frec	0	0	16	2
	2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mgL <sup>-1</sup> )	%	,0%	,0%	17,4%	2,2%
	<b>T3</b>	Frec	0	0	25	5
	2,4-D (4 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (2 mgL <sup>-1</sup> )	%	,0%	,0%	27,2%	5,6%
	<b>T4</b>	Frec	0	0	5	7
	TDZ (0,1mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,025mgL <sup>-1</sup> )	%	,0%	,0%	5,6%	7,6%
	<b>T5</b>	Frec	0	0	9	14
	TDZ (0,2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,05 mgL <sup>-1</sup> )	%	,0%	,0%	9,9%	15,2%
	<b>T6</b>	Frec	0	0	0	5
	TDZ (0,4 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,10 mgL <sup>-1</sup> )	%	,0%	,0%	,0%	5,6%
<b>Total</b>	Frec	0	0	58	34	
	%	,0%	,0%	63,0%	37,0%	

Al estudiar el efecto que causa la combinación: medio de cultivo-reguladores de crecimiento, se destacaron los tratamientos T3 y T2 a los 45 días de evaluación con un porcentaje de 27,2% y 17,4% respectivamente, mientras que a los 60 días de evaluación se destacó el tratamiento T5 con un porcentaje de 15,2% como se puede apreciar en la Tabla 3.14 y Figura 3.14.



**Figura 3.14:** Porcentajes de callo formados en cotiledones a los 15, 30, 45 y 60 días en los tratamientos de inducción a callo (Ortega, 2012).

### 3.3.3 Morfología de los callos

De los callos formados en cada uno de los tratamientos finales de inducción aplicados a los cotiledones se realizó un análisis macro-morfológico tomándose en cuenta textura del callo (friable; compacto) y color (translúcido, café, crema y verde) Tabla 3.16, pudiendo de esta manera conocer las características de dichos callos, en la Figura 3.15 se pueden ver fotografías de los diferentes tipos de callos formados.

Además se analizó la relación directa entre las variables textura y los reguladores q conforman los tratamientos de inducción, al igual que con la variable color de los callos formados, mediante la prueba Chi cuadrado.

**Tabla 3.16** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes del color y textura de los callos formados en cotiledones.

Tratamientos preliminares inducción			Color				Textura		
Medio	Reguladores de Crecimiento		Translúcido	Café	Crema	Verde	Friable	Compacto	
MS	<b>C1</b>	Frec	0	0	0	0	0	0	
		%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	
	<b>T1</b> 2,4-D (1 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (0,5 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	4	0	0	0	4	0	
		%	4,3%	,0%	,0%	,0%	4,3%	,0%	
	<b>T2</b> 2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	18	0	0	0	18	0	
		%	19,6%	,0%	,0%	,0%	19,6%	,0%	
	<b>T3</b> 2,4-D (4 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (2 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	30	0	0	0	30	0	
		%	32,6%	,0%	,0%	,0%	32,6%	,0%	
	<b>T4</b> TDZ (0,1mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,025mgL <sup>-1</sup> )	Frec	12	0	0	0	12	0	
		%	13,0%	,0%	,0%	,0%	13,0%	,0%	
	<b>T5</b> TDZ (0,2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,05 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	23	0	0	0	23	0	
		%	25,0%	,0%	,0%	,0%	25,0%	,0%	
	<b>T6</b> TDZ (0,4 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,10 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	0	0	0	5	0	5	
		%	,0%	,0%	,0%	5,4%	,0%	5,4%	
<b>Total</b>	Frec	<b>87</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>87</b>	<b>5</b>		
	%	<b>94,6%</b>	<b>,0%</b>	<b>,0%</b>	<b>5,4%</b>	<b>94,6%</b>	<b>5,4%</b>		
Chi Cuadrado de Pearson			114,253 <sup>a</sup>						

Se puede ver en la Tabla 3.15 que cinco de los seis tratamientos presentaron callos translúcidos y callos friables en los mismos casos, de tal manera, el tratamiento T3 es el que presentó la mayor presencia de callos translúcidos y friables (32,6%), siguiéndole en porcentaje el tratamiento T5 con 25%, en tanto, el tratamiento T6 fue el único que mostró callos de color verde y de textura compacta.

Luego del análisis de correlación de las variables morfológicas y los tratamientos de inducción, la prueba Chi cuadrado con un valor de 114,253 al 95% de confianza, verifica los tratamientos está directamente relacionado con el color y la textura obtenida en los callos, por la cual se decide rechazar la hipótesis de independencia.

Se realizó un análisis que determinó que color y textura proporciona mayor cantidad de callos embriogénicos (Tabla 3.16 y Tabla 3.17).

**Tabla 3.17** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes del color de los callos embriogénicos y no embriogénicos formados en cotiledones.

Condición		Tipo de callo	
		Embriogénico	No embriogénico
Color			
Translúcido	Frec	87	0
	%	94,6%	,0%
Café	Frec	0	0
	%	,0%	,0%
Crema	Frec	0	0
	%	,0%	,0%
Verde	Frec	0	5
	%	,0%	5,4%
Total	Frec	<b>87</b>	<b>5</b>
	%	<b>94,6%</b>	<b>5,4%</b>
Chi Cuadrado de Pearson		98,694 <sup>a</sup>	

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.

Para el análisis estadístico de la correlación entre la variable color y la variable textura de los callos con el tipo de callos formados sean embriogénicos y no embriogénicos se realizó la prueba Chi cuadrado de Pearson al 95% de confianza, tomando éste un valor de 98,694, para el análisis color vs tipo de callo, por la cual se decide que según el color expresado en el callo formado se identificó el tipo de callo es decir si es embriogénico o no.

En la Tabla 3.17 se considera únicamente los datos de textura de los callos formados en ésta fase de inducción a callo.

**Tabla 3.18** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de la textura de los callo embriogénicos y no embriogénicos formados en cotiledones.

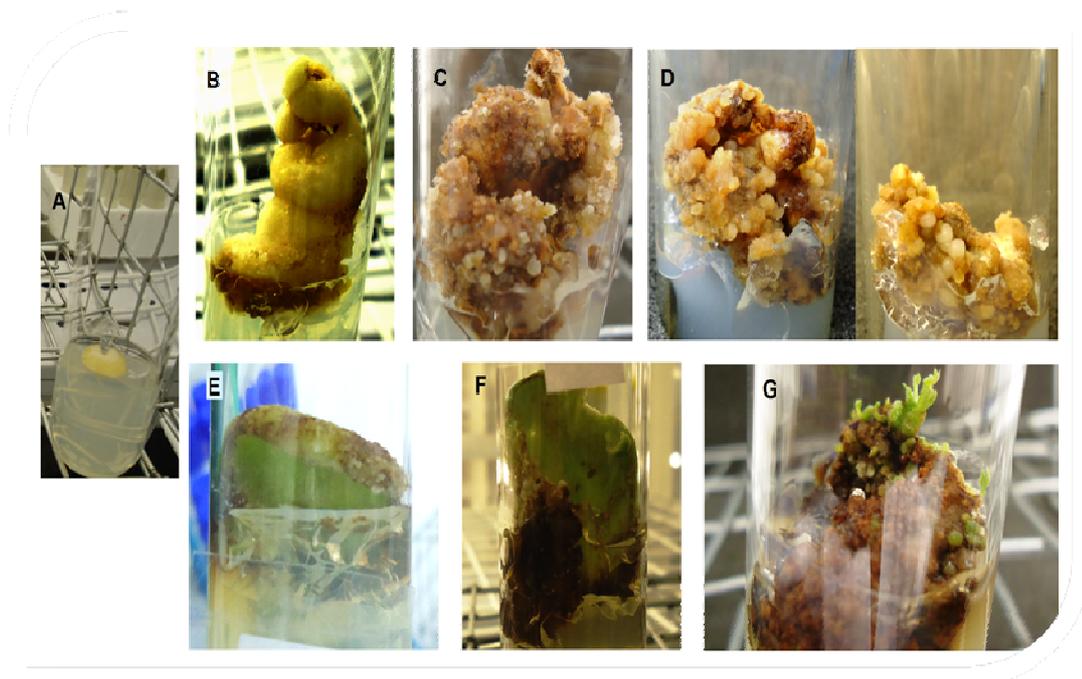
Condición		Tipo de callo	
		Embriogénico	No embriogénico
Textura			
Friable	Frec	87	0
	%	94,6%	,0%
Compacto	Frec	0	5
	%	,0%	5,4%
Total	Frec	<b>87</b>	<b>5</b>
	%	<b>94,6%</b>	<b>5,4%</b>
Chi Cuadrado de Pearson		98,694 <sup>a</sup>	

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.

En tanto que, para la variable textura del callo la prueba Chi- cuadrado de Pearson, tomó un valor de 140,157 al 95% de confianza, para el análisis textura vs tipo de callo, por la cual se resuelve que, según la textura expresada en el callo formado se identifica el tipo de callo es decir si es embriogénico o no.

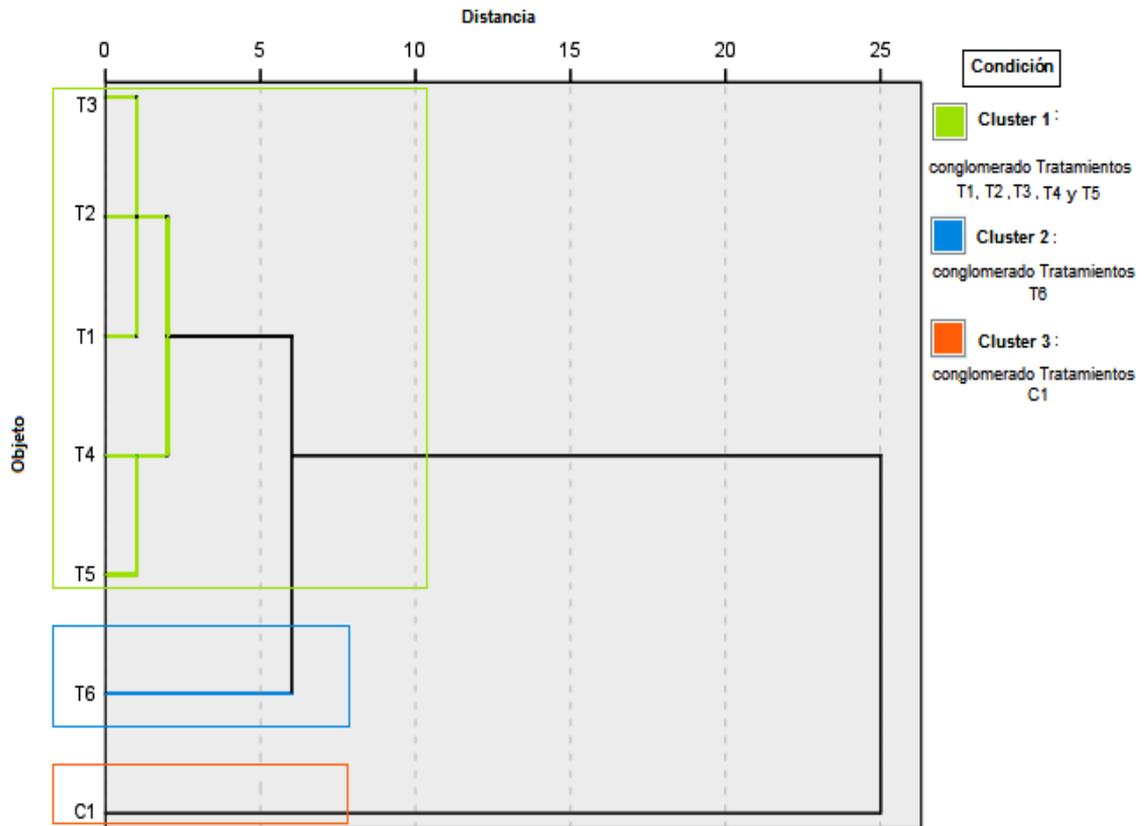
En la Figura 3.15, se presentan fotografías de los callos formados en cotiledones de semillas de guarango que se formaron en cada tratamiento de inducción en las que se puede evidenciar las características macro - morfológicas como textura y color que se tomaron en cuenta para en éste.

Cabe resaltar que dentro del callo de tipo embriogénico existe la presencia de pequeñas zonas no embriogénicas que toman un color café o verde en los distintos casos y que para este estudio no son tomadas en cuenta por que el análisis del explante es íntegro.



**Figura 3.15:** Fotografías de los callos formados en cotiledones: **A)** tratamiento control, ausencia de callo, **B)** callo con parte friable - translúcido del tratamiento T1, **C)** callo friable - translúcido del tratamiento T2, **D)** vista anterior y posterior del callo friable – translúcido del tratamiento T3, **E)** y **F)** callos con parte friable – translúcido del tratamiento T4 y T5 respectivamente, **G)** callo compacto - verde con presencia de brotes del tratamiento T6 (Ortega, 2012).

Tras el análisis cluster jerárquico (Figura 3.16) se pudo conglomerar los callos formados según las características distintivas que mostró cada uno, es decir las características morfológicas y el tiempo de formación de callo, a partir de la selección de la medida usada para comprobar el semejante entre los individuos con distintas distancias y así agruparlos según sus características.



**Figura 3.16:** Análisis cluster jerárquico de los callos formados en los cotiledones, por combinación de conglomerados re-escalados (Ortega, 2012).

Se puede ver en la Figura 3.17 que existen tres cluster o conglomerados, de los cuales, el cluster 1 reunió a los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 que presentaron callos con textura friable y color translúcido, aunque también se visualizan sub-conglomerados que se deben al tiempo de formación de callo ver la Tabla 3.15. El cluster 2 corresponde a el Tratamiento T6 que fueron los callos de tipo compacto – verde y finalmente el cluster 3 concierne al tratamiento control C1 que no presentó formación de callo.

Una vez obtenidos los resultados del porcentaje de formación de callo en cada tratamiento de inducción y de la conglomeración de las características morfológicas se puede observar en la Tabla 3.19 y Figura 3.17 que tratamiento y cuantos de los callos formados fueron embriogénicos o no embriogénicos y así identificar el mejor medio de cultivo conjuntamente con la combinación de reguladores de crecimiento que favorezcan al objetivo propuesto en esta etapa.

**Tabla 3.19** Tabla de contingencia de frecuencias y porcentajes de callos formados, callos embriogénicos y no embriogénicos en cotiledones, evaluados a los 60 días.

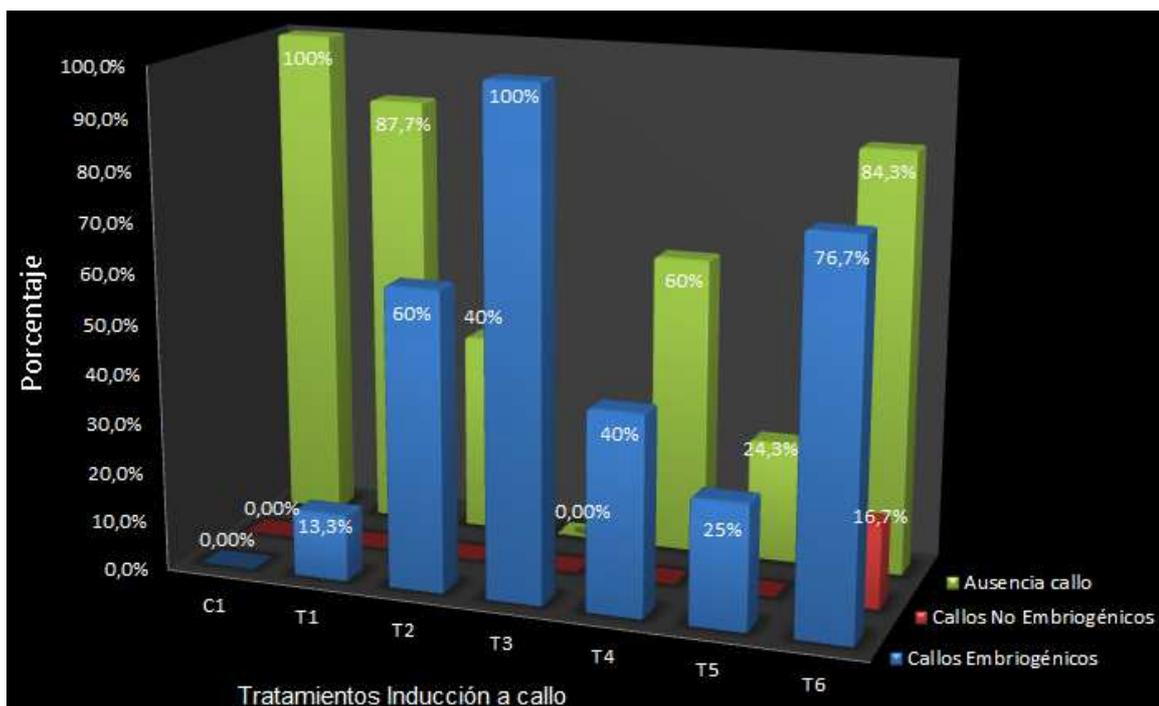
Tratamientos preliminares inducción			Condición			
Medio	Reguladores de Crecimiento		Formación de callo			
			Emb	No Emb.	Ausencia	Subtotal
MS	<b>Control 1</b>	Frec	0	0	30	30
		%	,0%	,0%	100,0%	100,0%
	<b>T1</b> 2,4-D (1 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (0,5 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	4	0	26	30
		%	13,3%	,0%	87,7%	100,0%
	<b>T2</b> 2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (1 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	18	0	12	30
		%	60%	,0%	40%	100,0%
	<b>T3</b> 2,4-D (4 mgL <sup>-1</sup> ) + Kin (2 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	30	0	0	30
		%	100%	,0%	,0%	100,0%
	<b>T4</b> TDZ (0,1mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,025mgL <sup>-1</sup> )	Frec	12	0	18	30
		%	40%	,0%	60%	100,0%
	<b>T5</b> TDZ (0,2 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,05 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	23	0	7	30
		%	76,7%	,0%	24,3%	100,0%
	<b>T6</b> TDZ (0,4 mgL <sup>-1</sup> ) + AIA(0,10 mgL <sup>-1</sup> )	Frec	0	5	25	30
		%	,0%	16,7%	84,3%	100,0%
<b>Total</b>	Frec	<b>87</b>	<b>5</b>	<b>118</b>	<b>210</b>	
	%	<b>41,4%</b>	<b>2,4%</b>	<b>56,1%</b>	<b>(100%)</b>	

En la Tabla 3.19 se puede observar que todos los tratamientos de inducción presentaron formación de callo, destacándose T3 (MS: 2,4-D (4 mg.L<sup>-1</sup>) + Kin (2 mg.L<sup>-1</sup>) el cual fue el que presentó mayor porcentaje de callos embriogénicos con un 100% del total de callos sembrados, el segundo tratamiento

con porcentaje alto de callos embriogénicos fue el T5 (MS: TDZ ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + AIA ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ )) presentando un 76,7%.

T1 (MS: 2,4-D ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + Kin ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ )) fue el que menor porcentaje de callos embriogénicos formados obtuvo, con un 13,3%.

El tratamiento T6 (MS: TDZ ( $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + AIA ( $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$ )) presentó un porcentaje de callo formado de 16,7% pero a diferencia de los demás tratamientos los callos formados fueron de tipo no embriogénico.



**Figura 3.17:** Porcentajes de callos embriogénicos, no embriogénicos y ausencia de formación de callo en cotiledones, evaluados a los 60 días (Ortega, 2012).

### 3.4 Fase 4: Análisis histológico de los callos embriogénicos

Tras la evaluación macro-morfológica y estadística de los callos formados en la fase final de inducción a callo en cotiledones de semillas de guarango, se efectuó un análisis micro-morfológico de los callos embriogénicos de los que se realizaron disgregaciones-frotis a partir de pequeñas porciones de callo para luego teñirlas con acetocarmín al 2% (p/v) como se detalla en la metodología descrita para esta fase (Anexo D).

Finalmente, se presenta una de las placas preparadas que fue observada al microscopio óptico permitiendo determinar la existencia de células embriogénicas, no embriogénicas y elementos característicos de las células embriogénicas como se puede observar en la Figura 3.18.



**Figura 3.18:** Corte histológico de callo (tratamiento T3) mostrando posibles (CNE), célula no embriogénica. Posible célula embriogénica (CE); pro-embrión (Pe) núcleo (n), citoplasma denso (Ci) y pared celular primaria engrosada rodeando esta célula (pcp), (objetivo 100X) (Ortega, 2012).

En la Figura 3.18 se puede observar posibles pro-embriones (Pe). El acetocarmín tiñó las células embriogénicas (CE), las cuales presentaron un citoplasma denso (Ci), núcleos (n) teñidos fuertemente y glicoproteínas de color rojo intenso. Las células sin capacidad embriogénica (CNE) presentaron menor intensidad de color.

## **CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN**

### **4.1 Fase 1: Desinfección de los explantes**

Para ésta investigación se utilizaron semillas maduras de *Caesalpinia spinosa*, las cuales previo a su conservación a -5°C en el banco de semillas del vivero de Cununyacu de la EPMMOP-Q fueron desinfectadas químicamente con el fungicida (Carboxin – Captan), por lo que para remover dicho fungicida de la superficie de las semillas de guarango, éstas fueron sometidas a un lavado con una solución de detergente para de esta manera poderlas manipular.

Se sabe que el detergente puede definirse como un compuesto que facilita la separación de materias o sustancias extrañas de las superficies sólidas cuando se emplea en un disolvente (usualmente agua) en una operación de lavado (Barragan & Cogollo, 2010) por lo que es el más utilizado en el área de micropropagación vegetal.

#### **4.1.1 Explantes vivos en cotiledones y ejes embriogénicos**

La desinfección es uno de los pasos más críticos en el establecimiento de cultivo *in vitro* por lo que uno de los principales problemas es la contaminación de los explantes con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus) y por otro lado la necrosis de los cultivos (Mroginski *et al.*, 2010), por lo que para la fase de desinfección de los cotiledones y de los ejes embriogénicos de la semilla de guarango se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO).

El mejor tratamiento de desinfección para el caso de los cotiledones fue el T3 (NaClO al 0,5% durante 10 minutos + 4 gotas de Tween 80) presentando un porcentaje de 90% de explantes vivos, mientras que para el caso de los ejes embriogénicos, el tratamiento que mejor resultados presentó fue T1 (NaClO al 0,5% durante 5 min + 4 gotas de Tween 80) con un porcentaje de 96,7% de explantes vivos, pudiéndose evidenciar que para ambos casos la baja concentración de hipoclorito de sodio dio resultados favorables a la desinfección de los dos explantes, tal como Esquivel & Escalan (1994) lo señalan en su estudio, anotando que el hipoclorito de sodio con el Tween son en conjunto el desinfectante y el tensoactivo más comúnmente utilizados en la micropropagación *in vitro* debido a que el hipoclorito de sodio es uno de los menos tóxicos en concentraciones inferiores al 2%.

#### **4.1.2 Contaminación bacteriana, fúngica y necrosis**

El ambiente generado por el explante -medio de cultivo y condiciones físicas de incubación, es altamente propicio para la proliferación de muchos microorganismos (hongos o bacterias) que pueden provocar la pérdida de los cultivos, sin embargo, es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus y fitoplasmas, por lo que en la práctica cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se refiere a cultivos donde no se produzca la proliferación de hongos y bacterias (Mroginski *et al.*, 2010),

Del total de cotiledones sembrados, el 43,3% fue descartado, de éste porcentaje el factores de descarte por contaminación (hongos y bacterias) mostró mayor incidencia en el tratamiento de menor concentración y menor tiempo T1 (NaClO al 0,5% durante 5 minutos) con un 16,8%, mientras que en el tratamiento T3 (NaClO al 1,5% durante 5 minutos) y T4 (NaClO al 1,5% durante 10 minutos) los porcentajes de contaminación fueron menores, de 5,1% y 0,8%

respectivamente, demostrándose que a concentraciones bajas de NaClO (0,5%) existe mayor presencia de agentes contaminantes mientras que a concentraciones altas (1,5% NaClO) dicha contaminación disminuyó, lo expuesto concuerda con Borges, Estrada, Pérez & Meneses (2009) a medida que aumenta la concentración de hipoclorito de sodio, disminuye el porcentaje de contaminación. pero el porcentaje de necrosis o muerte de los explantes *in vitro* se incrementa.

Los porcentajes de contaminación en los ejes embriogénicos fueron nulos por lo que no se pudo realizar un análisis de los mismos.

Se obtuvieron porcentajes altos para el factor necrosis en los dos explantes. En los cotiledones el porcentaje de necrosis fue de 18,3% y en los ejes embriogénicos de 21,7% siendo éste el factor de descarte con mayor incidencia, destacándose en ambos casos los tratamientos que contenían las concentraciones de NaClO al 1,5% (T2 y T3). Esto coincide con lo destacado por Ramírez, Urdaneta & León de Sierralta (2002) los cuales observaron un fuerte efecto fototóxico del hipoclorito de sodio a concentraciones mayores de 2% en los explantes usados en micropropagación *in vitro*, provocando así la muerte del explante.

Walker & Aya (1997) señalan también que la necrosis de los explantes, ésta relacionada con varios factores pero el más común son las altas dosis de desinfectante que pueden provocar que el explante se quemé a corto o largo plazo.

De los resultados obtenidos se pudo identificar a los tratamientos que mejor resultado arrojaron en cuanto a la desinfección de los explantes. Para los cotiledones el mejor tratamiento fue T3 (NaClO al 0,5% durante 10 min) y para los ejes embriogénicos fue T1 (NaClO al 0,5% durante 5 min), observándose que los

dos tratamientos coinciden que una concentración baja de hipoclorito de sodio conlleva a una buena respuesta de desinfección generando porcentajes altos de explantes vivos (90%) para cotiledones y (96,7%) para los ejes embriogénicos.

Roca & Mroginski (1991) resaltan que la selección de la concentración del hipoclorito y el tiempo de desinfección se determinan en gran medida por las características del o los explantes que en la práctica se establecen experimentalmente por ensayo y error.

## **4.2 Fase 2: Ensayo preliminar para la inducción a callo**

Los explantes más usados para la inducción a callo embriogénico han sido cotiledones, ejes hipocótilos, embriones cigóticos, ejes embriogénicos, ejes radiculares, etc. (Li & Huang, 1996), los cuales en la práctica han sido extraídos de órganos como óvulos cigóticos, semillas, embriones o partes de plántulas tiernas en donde en todos los casos la determinación embrionica todavía persiste (Gamborg, 1995).

### **4.2.1 Formación de callo**

Mroginski, *et al.*, (2010) resaltan la utilización como medio básico en leguminosas, el medio MS (Murashige & Skoog) al igual que Gamborg (B5) que son medios de regeneración, que poseen concentraciones relativamente altas de nitrógeno (suministrado como ión amonio y nitrato en el medio de cultivo) y potasio comparados a otros medios comerciales (Roca & Mroginski, 1991).

En los resultados obtenidos en el análisis del efecto del medio de cultivo en los cotiledones, se pudo observar que el medio MS presentó mayor formación de callo (42,5%) a diferencia del medio Gamborg B5 que mostró un porcentaje de formación de callo del 14,2%, pudiendo deberse a que el medio Gamborg (B5)

posee menor concentración de nitrato y amonio que el medio MS (Litz & Jarret, 1991) logrando de esta manera afectar el porcentaje de formación de callo, como se evidenció en los resultados obtenidos.

Para los ejes embriogénicos el porcentaje de formación de callo en el medio MS fue de 18,3% mientras que en el medio Gamborg´ B5 la formación de callo obtuvo un porcentaje de 28,3% los cuales fueron menores a los obtenidos en los cotiledones.

Se ha enfatizando que el éxito en la formación de callo embriogénico depende del tipo de explante, de su estado fisiológico, y de la interacción de los microorganismos contaminantes con las fitohormonas que varía entre tejidos y genotipos, por lo que la interacción con los reguladores presentes en el medio de cultivo propician diversos cambios epigenéticos que van desde ausencia de respuesta morfogénica, presencia de callo friable sin diferenciación de embriones, hasta formación de callos no embriogénicos o embriogénicos (Gómez *et al.*, 2010).

#### **4.2.2 Tiempo de formación de callo**

En el medio MS el mayor porcentaje de formación de callo en cotiledones se presentó en los tratamientos T1 y T3 a los 45 y 60 días de evaluación, en el caso del medio Gamborg´B5 fue en los tratamientos T4 y T5 a los 45 días de evaluación, en tanto que, para los ejes embriogénicos el panorama fue distinto, ya que en el medio Gamborg´B5 y MS el tiempo de inducción mayor fue a los 60 días de evaluación en el tratamiento T6 pero también hubo formación de callo a los 45 días.

Warren (1992) explica que los cultivos de callos son a menudo de crecimiento lento y heterogéneo, debido fundamentalmente a la disponibilidad vectorial de los nutrientes que por lo general y según la especie puede durar de 30 a 45 días o un poco más, en tanto que en este mismo periodo de tiempo el efecto de los reguladores de crecimiento esta empezando, lo que explica que la presencia de callo en los cotiledones se haya dado mayormente a partir de los 45 días y en los ejes embriogénicos haya empezado con menor incidencia a los 45 días y con mayor énfasis a los 60 días de haber sido establecido en el medio de inducción.

### **4.2.3 Morfología de los callos**

#### **4.2.3.1 Cotiledones**

Corea (2007) indica que el callo, es un crecimiento desorganizado de células obtenidas a partir de un determinado explante y para su diferenciación y viabilidad depende de varios factores siendo uno de los principales, el o los reguladores del crecimiento y su concentración en el medio, según el caso, sólo auxinas, sólo citoquininas o ambas (Matos, 2007).

Se suscitaron tres cluster o conglomerados, de los cuales el cluster 2, reunió a los tratamientos que presentaron callos con textura friable y translúcidos pudiendo catalogarlos como callos de tipo embriogénico debido a que según Rodríguez, *et al.*, (2005) los callos originados a partir de cotiledones e hipocótilos en especies leñosas se mostraron translúcidos, friables y de color amarillo a café, características que se han atribuido a un comportamiento embriogénico en las mencionadas especies.

Del cluster 2 se identificó dos tratamientos que se destacaron en la formación de callo embriogénico, el primero T3 (MS: TDZ ( $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + AIA ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ )) con un 73,3% de formación total de callo, del cual el 63,3% fue callo embriogénico, pudiéndose atribuir al efecto del thidiazuron (TDZ), que es una citoquinina, que ha demostrado ser más efectiva que todos los tipos de adenina citoquininas para la inducción a embriogénesis somática en varias especies de plantas, en especial en especies leñosas recalcitrantes (Velásquez *et al.*, 2006).

Adicional a lo dicho, la combinación de TDZ y AIA fue utilizada para el genotipo Xan-159 de *P. vulgaris*, logrando callos a partir de los cotiledones, pero no de ejes embriogénicos (Zambre *et al.*, 1998).

El segundo tratamiento en cotiledones que mostró buenos resultados en la formación de callo fue el T1 (MS: 2, 4-D ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + Kin ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ )) mostrando un porcentaje alto de formación de callo embriogénico de 56,7%, pudiendo comprobar lo expuesto por Chawan (2002); que una alta concentración de auxina y baja de citoquinina promueve la proliferación celular en algunas especies leñosas con la consecuente formación de callo viable.

#### **4.2.3.2 Ejes embriogénicos**

Similar caso sucedió en los ejes embriogénicos, produciéndose tres cluster que conglomeraron callos fundamentalmente de tipo no embriogénicos.

De tal manera, dos tratamientos originaron la formación de callo embriogénico pero en porcentajes bajos el T2 (MS: 2,4-D ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ )) presentó un porcentaje de 6,6% de callos embriogénicos y el T1 (MS: 2, 4-D ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + Kin ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ )) mostró un 3,3% de callos embriogénicos.

En el caso de T6 (Gamborg B5: TDZ ( $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ ) + AIA ( $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ )) presentó un alto porcentaje de callos formados 66,7%, la totalidad de éste porcentaje fue de tipo no embriogénicos y con la presencia de brotes en el lado del hipocótilo.

Resultados similares se produjeron en hipocótilos de semillas de *Eucalyptus globulus* Labill, sometidos a tratamientos conformados por el medio Gamborg B5 (2,4-D  $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  + BAP  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y 2,4-D  $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  + Kin  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) en donde los callos formados presentaron rutas morfogénicas dirigidas principalmente hacia caulogénesis y rizogénesis, situación descrita en otros reportes, y que posteriormente produce una reducida tasa de producción de callo embriogénico (Gómez *et al.*, 2006).

### **4.3 Fase 3: Ensayo final para la inducción a callo a partir de cotiledones.**

#### **4.3.1 Formación de callo**

En el ensayo final se tomó únicamente en cuenta a los cotiledones de semillas de *Caesalpinia spinosa* ya que los ensayos preliminares de inducción fueron los que generaron resultados favorables a la formación de callo embriogénico.

Se consiguió la formación de callos con estructuras embriogénicas en todos los tratamientos estudiados, pero en diferentes proporciones, a excepción del tratamiento control C1 el cual no contenía ninguna combinación de reguladores de crecimiento por lo cual no presentó formación de callo.

En el análisis del efecto de los reguladores 2,4-D (2,4 diclorofenoxiacético) + Kin (Kinetina) se puede evidenciar que conforme aumenta la concentración de dichos reguladores de crecimiento aumentó también el porcentaje de callos formados, por lo que el tratamiento T3 (MS: 2,4-D ( $4 \text{ mg.L}^{-1}$ ) + Kin ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), 24 horas de oscuridad) fue el que mostró un 100% de callos formados.

En analogía con éste estudio, García y sus colaboradores en el 2006, expusieron que en semillas maduras de *Phaseolus vulgaris* L. los callos formados presentaron un mayor crecimiento en la medida que se incrementaron las concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo MS, además el abundante crecimiento de los callos puede deberse indirectamente a que en condiciones de oscuridad no ocurre el efecto degradativo que provoca la luz sobre las auxinas, principalmente 2,4-D presente en el tratamiento T3 y el AIA presente en el tratamiento T5, por un proceso oxidativo. Esta respuesta a sido observada en varios cultivos (Jiménez, 2001).

Para la combinación TDZ (Thidiazuron) + AIA (*Ácido indolacético*) la mejor respuesta se dio a concentraciones inferiores o iguales a TDZ ( $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ ) + AIA( $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ ), lo que significa que a bajas concentraciones de TDZ los cotiledones procuraron mejores respuestas que a concentraciones altas, similar situación concluye Huetteman & Preece, 1993, en la inducción a callo de *Phaseolus* spp, ya que a bajas concentraciones, el TDZ induce porcentajes altos de formación de callos, demostrado ser una citoquinina muy activa a bajas concentraciones.

Los cotiledones fueron establecidos con la cara abaxial en contacto con el medio de inducción de cada tratamiento dando porcentajes altos de formación de callo, esto concuerda con Vega & Prehn (2005), que describen situaciones

similares como en el estudio morfológico y anatómico de hojas de *Psychotria acuminata* que reveló que la actividad embriogénica, ocurre únicamente en la superficie adaxial de las hojas, debido posiblemente a que la cara abaxial de los cotiledones tienen una cutícula más delgada que la de la cara adaxial, permitiendo el ingreso de nutrientes y reguladores de crecimiento con mayor facilidad. En trabajos realizados en otras especies como *Feijoa sellowiana* (Mirtaceae), se encontró que cuando cultivaron embriones cigóticos *in vitro* ocurría la formación de embriones somáticos solo en la superficie abaxial de los cotiledones, consumando que la posición del explante es la que tiene mayor influencia en la promoción de la embriogénesis.

#### **4.3.2 Tiempo de formación de callo**

El tiempo de formación de callo no fue el mismo para todos los tratamientos aplicados, así, el efecto de la combinación: medio de cultivo-reguladores de crecimiento, se destacó a los 45 días de evaluación con un porcentaje general de 63% de callos formados y en segunda instancia a los 60 días de evaluación con un porcentaje de 37%.

Algunos de los factores que influyen en el tiempo de formación de callo son: la especie, tipo de explante, condiciones de cultivo, etc., los cuales pueden acelerar o retrasar la callogénesis, sin embargo uno de los principales factores es la cantidad de nutrientes por lo que el aporte de todos los compuestos al medio de cultivo tiene que realizarse dentro de un rango más o menos amplio en función del compuesto en concreto y del cultivo *in vitro* a realizar (Marinucci *et al.*, 2004).

#### **4.3.3 Morfología de los callos**

Con los datos morfológicos obtenidos de los callos formados se realizó un análisis cluster jerárquico, donde se confirmó la formación de tres cluster o

conglomerados, de los cuales el cluster 1 reunió a cinco de los siete tratamientos aplicados. El cluster 1 conglomeró a los callos que presentaron textura friable y color translúcido, que son características distintivas de callos de tipo embriogénico.

T1, T2 y T3 fueron tres de los cinco tratamientos conglomerados en el cluster 1, suplementados con 2,4-D (2,4 diclorofenoxiacético) + Kin (Kinetina) y que además de presentar las características ya citadas mostraron pequeñas áreas de color café –amarillo. T3 (MS: 2,4-D (4 mg.L<sup>-1</sup>) + Kin (2 mg.L<sup>-1</sup>) fue el que presentó mayor porcentaje de callos embriogénicos con un 100% del total de callos sembrados.

El uso de estos dos reguladores (2,4-D + Kin) se aplicó en la investigación de Gómez, *et al.*, (2006) en *E. globulus* dando como resultado callos translúcidos, friables y con zonas de color amarillo a café, características que se han atribuido a comportamiento embriogénico en especies leñosas (Rodríguez *et al.*, 2005).

De acuerdo con Carron, *et al.*, (1995) la adición de kinetina en el medio de cultivo puede oscurecer algunas zonas el color de los callos en el medio de inducción de callogénesis, ya que este regulador promueve la inducción de la embriogénesis somática y al posterior conversión de los embriones a plántulas.

Los tratamientos T4 y T5 (medios suplementados con TDZ y AIA) también son parte del cluster 1 que presentaron callos con textura friable y color translúcido, distintivas de callos de tipo embriogénico, adicional a estas características algunos callos presentaron zonas de color verde. El tratamiento T5

(MS: TDZ (0,2 mg.L<sup>-1</sup>) + AIA (0,05 mg.L<sup>-1</sup>)) presentó la mayor proporción de callo embriogénico (76,7%) suplementado con TDZ y AIA.

El efecto del ácido indolacético se ha comprobado en otros estudios como el citado por Martínez, *et al.*, (2004) en el estudio de *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urophylla*, donde exponen que las mejores respuestas observadas en la formación de callo se dieron en segmentos de peciolo sembrados en medio MS y complementados con AIA los cuales se mantuvieron como estructuras verdes sin lograr que germinen, de manera similar a los cotiledones de guarango utilizados en este estudio.

Estrada (2006) cita estudios de *P. vulgaris L.* y *P. acutifolius A.* en donde el uso de TDZ junto con AIA desarrollaron callos verdes con aspecto nodular capaces de generar callos viables, mientras que si se utiliza al TDZ sin auxinas en *P. vulgaris L.* produjo brotes y no callos. Además, el TDZ es capaz de movilizar las auxinas desde su sitio de producción y almacenamiento endógeno hacia los puntos donde sea requerido un proceso de división celular tal como fue señalado por Velásquez *et al.*, (2006).

Si bien existe dos tipos de tratamientos que generaron resultados positivos en la formación de callo embriogénico, el efecto de cada regulador de crecimiento que conforma el tratamiento en cuestión se puede explicar según la función que éste ejerza sobre el explante, como es el caso del tratamiento T6 (MS: TDZ (0,4 mgL<sup>-1</sup>) + AIA (0,10 mgL<sup>-1</sup>)) que fue el único que presentó un porcentaje de callo no embriogénico de 16,7%, éstos mostraron callos compactos de color café con brotes adventicios de color verde que promueven el desarrollo de la caulogénesis.

Explicando que el aumento en la concentración de TDZ conduce a desdiferenciación de los brotes que se han formado debido a la aceleración en el proceso de división celular que conduce a la inducción de callo y reduce la tasa de multiplicación celular como consecuencia de la desdiferenciación de las células maduras (parenquimáticas) y funcionales que conforman los brotes y no a células embriogénicas (Chamorro, 2007).

#### **4.4 Fase 4: Análisis histológico de los callos embriogénicos**

Se efectuó un análisis micro-morfológico de los callos embriogénicos de los que se realizaron disgregaciones-frotis a partir de pequeñas porciones de callo para luego teñirlas con acetocarmín al 2% (p/v).

De manera general en los frotis se pudo observar pro-embriones, células embriogénicas, que presentaron: un citoplasma denso, núcleos teñidos fuertemente y glicoproteínas de color rojo intenso. Las células no embriogénicas presentaron menor intensidad de color, estas estructuras coinciden con las visualizadas en frotis de los callos originados a partir de hojas de *Psychotria acuminata* identificadas por Lara, *et al.*, (2003) donde se evidenció una capa conformada por células pequeñas con núcleos grandes y citoplasma denso. Estas células mitóticamente activas se tiñen más intensamente debido a una mayor cantidad tanto de ácidos nucleicos como de proteínas.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- Los mejores resultados para la desinfección de cotiledones se obtuvo del tratamiento T3 aplicando una solución de NaClO al 0,5% (v/v) más cuatro gotas de Tween 80 por un periodo de 10 minutos con una proporción de 90% de explantes vivos.
- Los mejores resultados para la desinfección de ejes embriogénicos se consiguió del tratamiento T1 que consistió en una solución de NaClO al 0,5% (v/v) más cuatro gotas de Tween 80 por un periodo de 5 minutos con una proporción de 96,7% de explantes vivos.
- Los mejores explantes para lograr una proporción del 100% en la formación de callo embriogénico se produjo a partir de cotiledones de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa*.
- El mayor porcentaje de formación de callo (calogénesis *in vitro*) en cotiledones de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa* ocurrió al utilizar el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) al total de su concentración.
- Posiblemente el incremento de las concentraciones de los reguladores de crecimiento 2,4 Diclorofenoxiacético de 2 mg.L<sup>-1</sup> a 4 mg.L<sup>-1</sup> y de Kinetina de 1 mg.L<sup>-1</sup> a 2 mg.L<sup>-1</sup> aumentó el porcentaje en la formación de callo embriogénico a partir de cotiledones de 60% a 100%.
- La mejor respuesta para la obtención de callo embriogénico a partir de cotiledones de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa* fueron: medio basal

Murashige & Skoog al total de su concentración,  $3\text{g.L}^{-1}$  de sacarosa, 0,65% de agar,  $4\text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4 D y  $2\text{ mg.L}^{-1}$  de Kin a los 45 días como tiempo de inducción.

- La morfología más importante que presentaron los callos de tipo embriogénico en cotiledones de *Caesalpinia spinosa* fue: callos translúcidos y de textura friable.
  
- El tejido embriogénico de los callos formados a partir de cotiledones semillas maduras de *Caesalpinia spinosa* presentó pro-embriones, células embriogénicas en división celular (mitosis), que contenían citoplasma denso, núcleos y glicoproteínas.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Para disminuir el porcentaje de necrosis en la desinfección de cotiledones y ejes embriogénicos se deberá probar nuevos procesos de desinfección basado en la utilización de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) puesto que ha presentado buenos resultados en la desinfección de semillas de otras especies.
- Con base en los resultados obtenidos, se podría probar nuevas combinaciones y concentraciones adicionales de auxinas y citoquininas para la obtención de callos embriogénicos en ejes embriogénicos.
- Ya que se generaron posibles vías de organogénesis en los ejes embriogénicos de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa*, se puede continuar el estudio ésta ruta *in vitro* de generación masiva de plantas.
- Es importante realizar otro tipo de estudios histológicos con la finalidad de identificar estructuras adicionales a las ya señaladas para tener un mayor conocimiento referente a los procesos de la callogénesis *in vitro* en cotiledones de *Caesalpinia spinosa* que permita ampliar su entendimiento.
- Continuar la investigación, tendiente a lograr un protocolo eficiente de embriogénesis somática indirecta en cotiledones y ejes embriogénicos de semillas maduras de *Caesalpinia spinosa*.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña, C. (2007). La biotecnología forestal. Consejo argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología. Chile: Salviat Impresores S.A.
2. Barragan V. & Cogollo K, (2009). Bondades del fruto jaboncillo (*Sapindus saponaria*) como un detergente biodegradable. Extraído el 16 de diciembre, 2012, de: <http://www.botanical-online.com/monografias/jaboncillo.htm>
3. Barriga, C. (2008). Cultivos y aprovechamiento de la tara *Caesalpinia spinosa* en la región andina (documento de trabajo). ECOBONA. Lima. p. 5 – 12.
4. Basurto, L. (2009). Todo sobre la Tara *Caesalpinia spinosa* o *Caesalpinia tinctoria*, la tara. Extraído el 11 de enero, 2012, de <http://taninos.tripod.com>
5. Bermúdez, I., Del Socorro Blanco, T., Pérez-Pérez, J., García, J., Veitía, N., Collado, R., Torres, D., Romero, C. & Roque, B. (2010). Efecto de la orientación y la longitud del cotiledón inmaduro sobre la formación de embriones somáticos en dos genotipos cubanos de soya. Biotecnología Vegetal, 10 (2), 121 – 128.
6. Borges, M., Estrada, E., Pérez, I. & Meneses, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Revista Colombia de Biotecnología 11(2), 127 – 135.

7. Buendía L., Sandoval E., Chávez V., J. Vernon E. & Cruz F. (2003). Inducción de embriogénesis somática en *Prosopis laevigata*. Dpto. de Biotecnología, Dpto. de IPH, UAM-Iztapalapa. Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM. México, D.F.
  
8. Buitrago, G., & Torres, F. (2008). Prospectiva de la Biotecnología aplicada en el sector forestal en Colombia. En: Colombia Gestión & Sociedad ISSN: 2027-1433. Colombia: Unisalle v.1 fasc.NA. p. 89 – 107.
  
9. Carrere, R. (1999). Deforestación y monocultivos forestales en Ecuador: Las venas siguen abiertas. Extraído el 16 de diciembre, 2012, de <http://www.wrm.org.uy/paises/Ecuador/venas.html>
  
10. Carron, M., Etienne, H., Michaux – Ferrière, N., & Montoro, P., (1995). Somatic embryogenesis in rubber (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.) Somativ embryogenesis in woody plants. 2, 117 – 136.
  
11. Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D., Jiménez, J., Alegre, J., Vieira-Peixe, A., Zavattieri, A. & Toribio, M. (2007). La embriogénesis somática como vía de regeneración clonal de especies forestales mediterráneas. Madrid, España. Extraído el 11 de enero, 2012, de <http://www.scielo.oces.mctes.pt/pdf/rca/v30n1/v30n1a51.pdf>
  
12. Chamorro, A., Martínez, S., Fernández, J., & Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento

en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Limonium* var. Misty blue. *Agronomía colombiana* 25 (1), 47-53.

13. Chawla, H. (2002). Introduction to plant biotechnology. Science Publishers Inc., USA. p. 189–201.

14. Coca, M. (2009). Enfermedades de la tara (*Caesalpinia spinosa*). Serie de publicaciones Fitopatológicas Laboratorio de Fitopatología Cochabamba, 3 (2): p. 1-4.

15. Corea, H. (2007), Inducción, multiplicación de callos, regeneración de plantas y variación somaclonal de las vitroplantas en cinco cultivares de quequisque (*Xanthosoma* spp.) Managua. p. 3.

16. De la Cruz, P. (2004). Aprovechamiento integral y nacional de la tara *Caesalpinia spinosa*- *Caesalpinia tictoria*. Revista del instituto de Investigación FIGMMG. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 7 (14): p. 64-73

17. Desde el Surco, Fundación de Investigación, Difusión y Capacitación Agropecuaria. (2008). Consorcio de Productores de Guarango CONAPROG. Extraído el 11 de enero de 2012, de <http://www.desde-elsurco.com>

18. Esquivel A. & Escalant J. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales editor Bib. Orton IICA/CATIE. p.18-19.

19. Estrada, J. (2006). Regeneración in vitro de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) vía embriogénesis somática universidad de Michoacana de san Nicolás de hidalgo. p.28
  
20. Fehér, A., Pasternak, T. & Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 74, 201-228.
21. Flores, F. & Chávarry, L. (2005). Edad óptima del patrón, época oportuna de injertado y producción masiva de injertos de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze- "Tara".\_Cajamarca: Asociación Civil para la Investigación y el Desarrollo Forestal - ADEFOR- y Programa Andino de Fomento de Semillas Forestales –FOSEFOR-. p. 13.
  
22. Fosefor – Intercooperation – Samiri (Universidad Técnica del Norte, ESPOCH, Fundación Arco Iris). 2006. La Tara en el Ecuador. *Caesalpinia Spinosa*. Cartilla técnica. Ecuador. p: 7.
  
23. Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, (4) 3, 195 – 200.
  
24. Gamborg, O., Miller, R. & Ojeina, K. (1989). Nutrient requirement suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50, 151-158
  
25. Gamborg, O. (1995). *Plant Cell, Tissue and organ culture*. Springer – Verlag. Berlin, Germany. p: 357.

26. García, F. (2003). Biología y Botánica. Programa de la asignatura. Universidad Politécnica de Valencia. (Cap. 2). Extraído el 11 de enero, 2012, de <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/programa.htm>
27. García, L., Pérez, J., Torres, D., Padrón, Y. & Romero, C. (2006). Influencia de reguladores del crecimiento en la formación de callos de *Phaseolus vulgaris* L cv. CIAP 7247. Biotecnología Vegetal 6 (2), 73 - 77.
28. Gatica, A. (2002). Regeneración de plantas de café (*Coffea arabica* cv. Caturra y Catuai) por Embriogénesis Somática directa a partir de segmentos de hoja. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular Universidad de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. p. 31.
29. Gold, K., León-Lobos, P. & Way, M. (2004). Manual de recolección de semillas de plantas silvestres para conservación a largo plazo y restauración ecológica. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi, La Serena, Chile. Boletín INIA, 110. P. 62.
30. Gómez, A., Aravanopoulos, P., Alía, R. & Bueno, M. (1999). *Pinus halepensis* RAPD markers: Linkage and genetic diversity. *In: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed). 22-25 September. Vitoria-Gasteiz. España. p. 143-146.
31. Gómez, C., Uribe, M., Ríos, D. & Sánchez, M. (2006). INDUCCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO EN *Eucalyptus globulus* Labill. INCI 31 (10), 734-738.

32. Gómez, P., Iracheta L., Castellanos, M., Méndez, I., Sandoval, A., Aguirre, J., Ojeda, M. & Gutiérrez, A. (2010). Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café Rev. Fitotec. Mex. 33 (3), 205 – 213.
33. González, O., Silva, J., Espinosa, A., Ros, C., Acosta, L., Meneses, S., & Hernández, M. (2002). La Embriogénesis Somática en *Ipomoea*: una posibilidad para la multiplicación y conservación de los Recursos Vegetales. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Cuba. p. 1.
34. González, O., Hernández, M., Coronado, M. & Silva, J. (2005). Caracterización histológica de la embriogénesis somática a partir de limbos foliares de boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) O. S. Cultivos Tropicales, 26 (4): p. 37-41.
35. Granda, P. (2006). Monocultivos de árboles en Ecuador. Movimiento Mundial por los Bosques Tropicales. Impreso en Uruguay: Hersilia Fonseca. p. 14.
36. Hernández, M., Hidrobo, J., & Araujo, B. (1999). Proceso de Embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum*, L.). En: Memorias del IX Seminario Científico del INCA, San José de las Lajas, p. 12-13.
37. Hidrobo J., Ardisana, E., & Hernández, A. (2002). Estudio sobre la efectividad del RIZOBAC en el proceso de callogénesis en papa var. Desiree. Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de la Habana (UNAH). Departamento de Fitotecnia, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1, CP 32 700. San José de las Lajas, Provincia La Habana, CUBA. Biotecnología vegetal 2 (4),195-200.

38. Huetteman, C. & Preece, J. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33 (2), 105 - 119.
39. Humlebaek, D. (1995). Three methods for mechanical scarification of hard coated seed. *Danida Forest Seed Centre*, 27: p. 15.
40. Ibaraki, H. & Murata, K. (2001). Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65 (3): p. 179 – 199.
41. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). (2000). Adaptación de un método de embriogénesis somática para la regeneración de embriones asexuales de Pinabete (*Abies guatemalensis redher*) FASE I. Quetzaltenano, Guatemala.
42. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). (2003). Adaptación de un método de embriogénesis somática para la regeneración de embriones asexuales de Pinabete (*Abies guatemalensis redher*) FASE II. Quetzaltenano, Guatemala.
43. Jiménez, E. (1997). Curso teórico práctico de propagación masiva de plantas. Santa Clara. p. 25-30.
44. Jiménez, V. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13 (2), 196 – 223.
45. Jørgensen, P.M. & León-Yáñez, S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 75 (4), p. 40.

46. Lara, A., Valverde, R. Gómez, L.(2003). Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. Agronomía Costarricense 27(1), 37-48.
47. Li, XY. & Huang, FH. (1996). Induction of somatic embriogénesis in loblolly pine (*Pinus toeda* L). In vitro Cell. Dev. Boil-Plant 32, 129-135
48. Litz, RE. & Jarret, RL. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca, WM; Mroginski LA (Eds) Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. p. 143-172.
49. Litz, R. Hemdrix, R. Moon, P. & Chavez, V. (1998). Induction of embriogenic mango cultures as affected by genotype, explanting, 2,4 -D and embriogenic nurse culture. Plant cell, tissue and organ culture 53, 13 - 18.
50. Mancero, L. (2008). La Tara (*Caesalpinia spinosa*) en Perú, Bolivia y Ecuador: Análisis de la Cadena Productiva en la Región. Programa Regional ECOBONA - INTERCOOPERATION, Quito. p. 13 – 35.
51. Manzanilla, M. (2004). Inducción de embriogénesis somática de tejido nucelar de tres variedades de mango (*Mangifera indica* L.). Facultad de ciencias Biológicas y Agronómicas. Universidad de Colima. Tecomán- Colombia. p. 20 – 38.

52. Marinucci L., M. Ruscitti M. & Abedini W. (2004). Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía, 105 (2), 27-36.
53. Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, J. & Cetina, M. (2004). Embriogénesis somática de Eucaliptus Grandis Hill ex Maiden y Eucaliptus Urophyllas S. T. Blake. Serie ciencia forestales y del ambiente, 10 (2). UAC. México, p. 83-92.
54. Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, J.L., Cetina, V., & Gutiérrez M.A. (2010). Biología Aplicada A Los Recursos Forestales. México: ISBN. p. 11.
55. Matos, A. (2007). Inducción de callo en plantas silvestres de zábila (*aloe vera*) con diferentes combinaciones de 2,4-d, ba y kinetina. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, boletín del centro de investigaciones biológicas, 41(4), 503–516.
56. Merkle, S.A. (1995). Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1, 112-121.
57. Mroginski, L., Sansberro, P., & Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *En: Biología y Mejoramiento Vegetal II*, Argenbio, INTA. p.19-25.

58. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays whit tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473 – 497.
59. Murthy, B., Murch, S., & Saxena, P. (1998). Review-Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34, 267-275.
60. Narváez-Trujillo, A., Calvo, A. & Troya, M. (2009). “Las poblaciones naturales de la tara (*Caesalpinia spinosa*) en el Ecuador: una aproximación al conocimiento de la diversidad genética y el contenido de taninos a través de estudios moleculares y bioquímicos”. Serie Investigación y Sistematización, 7. Programa Regional ECOBONA INTERCOOPERATION, Laboratorio de Biotecnología Vegetal Escuela de Ciencias Biológicas Pontificia Universidad Católica del Ecuador PUCE. Quito. p. 5 – 12.
61. Nieto, C. (2011). El Guarango. Fundación desde el Surco. Extraído el 11 de enero, 2012, de [http://www.desdeelsurco.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=62:guarango&catid=1:latest-news&Itemid=50](http://www.desdeelsurco.com/index.php?option=com_content&view=article&id=62:guarango&catid=1:latest-news&Itemid=50)
62. Nieto, C., Barona, N. & Ortiz, S. (2006). Cadena agroproductiva para la conservación de la cuenca media del río Pita. Compartiendo Experiencias, 5. Fondo para la Protección del Agua. Quito-Ecuador. p. 8-16
63. Ojeda, M. (1996). Inducción de Organogénesis y Embriogénesis Somática en *Pinus cembroides* (Zucc) y *Pinus halepensis* (Mili). Tesis presentada para optar al grado de Maestro en Ciencias en Producción Agrícola. Universidad Autónoma de

Nuevo León. Facultad de Agronomía, Subdirección de Estudios de Postgrado. México.

64. Palmberg, C. (1980). Principios y estrategias para el mejor aprovechamiento de los recursos genéticos forestales. Mejora Genética de árboles Forestales. Informe sobre el curso de capacitación FAO/DANIDA sobre la mejora genética de árboles forestales celebrado en Mérida. p. 27- 50.

65. Park, Y., Barrett, J., & Bonga, J. (1998). Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 34, 231-239.

66. Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. España. Mundi-Prensa. p. 144-145

67. Poulsen, K., & Stubsgaard, F. (2000). Tres métodos de escarificación mecánica de semillas de testa dura. En: Técnicas para la escarificación de semillas forestales. Serie Técnica. Manual Técnico N° 36. CATIE-PROSEFOR-DFSC. Turrialba, Costa Rica.

68. Profound – Advisers In Development. (2008). Estudio de Mercado Tara *Caesalpinia Spinosa*. Perú. Extraído el 11 de enero de 2012, de <http://www.biocomercioperu.org/admin/recursos/productos/ESTUDIOPRELIMINAR-DE-MERCADO-TARA.pdf>

69. Quintero, M. (2003). Ajuste del sistema Rita® para la inducción de callo embriogénico y regeneración de plantas a partir del cultivo de anteras de arroz. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agropecuarias Departamento de Agricultura sede Palmira. Cali, Colombia. p. 29 – 30.
70. Ramírez, M., Urdaneta, A. & León de Sierralta S. (2002). Establecimiento *in vitro* de explantes adultos de guanabo (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. Revista Facultad de Agronomía 19 (1), 1-8.
71. Reinert, J. (1958). Studies on morphogenesis in tissue cultures. Ver. Dtsch. Bot. Ges. 71, 15-24.
72. Reynel, C. & León, J. (1990). Árboles y arbustos andinos para agroforestería y conservación de suelos, Lima, Perú, Proyecto FAO/Holanda/DGFF. p. 361.
73. Roca, W. & Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura. Cali: CIAT. p. 143-172.
74. Rodríguez, R., Álvarez, C., Centeno, M., Berros, B. & Rodríguez, A. (2005). Embriogénesis somática y estrategias para superar las limitaciones en leñosas. En Sánchez M, Ríos D (Eds.) *Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal*. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. Chile. p. 63-67.

75. Sánchez, O. (2000). Micropropagación de algunas leñosas nativas. Universidad de Concepcion. Chile: Trama. p. 322.
76. Santangelo, E. (2000) Efforts in *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris* multiple shoots induction. Fifth PHASELIEU Workshop, Hannover, Germany. Extraído el 11 de enero, 2012, de <http://aob.oxfordjournals.org/content/88/3/371.short>
77. Suárez, A. (1997). Métodos de asepsia y esterilización. *In*: M. Perea y J. Cedeño (Eds.). Cultivo de Tejidos Vegetales y sus Aplicaciones en la Agricultura. Curso: UDO-OIEA, Maturín, Venezuela. p. 33-40.
78. Steward, F., Mapes, M., Y Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. *American Journal of Botany*. 45, 705-708.
79. Tisserat, B., Esan, E., & Murashige, T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1, 1-78.
80. Toribio, M., & Celestino, C. (2000). El uso de la Biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA). *Investigación Agraria: Sistema de Recursos Forestales*, 2, 250.

81. Varea, A. & Ortiz, P. (1995). Conflictos socio-ambientales vinculados a la actividad petrolera en el Ecuador. Estudio introductorio. En: Marea negra en la Amazonía. Quito, Abya-Yala/ILDIS/FTPP/UICN. p. 3.
82. Vázquez, C., Orozco, A., Rojas, M., Sánchez, M., & Cervantes, V. (1997). La reproducción de las plantas: semillas y meristemos. Fondo de cultura económica. Primera edición México, D.F. ISBN 968-16-5376-9. Impreso en México.
83. Velásquez, R., Colmenares, J., Chirinos, M., Noguera, A. & Pérez, M. (2006). Embriogénesis somática en samán (*Samanea saman*). Personal Docente e Investigación. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía (UCV-FAGRO). Instituto de Genética. Laboratorio de Cultivo de Tejidos CIBA. Apdo. 4579. 56(4), 593-600.
84. Vega, A., & Prehn, D. (2005). Inducción e Inicio de Maduración *In vitro* de Tejido Embriogénico de *Quillaja saponaria*. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile.p. 198-208.
85. Vega, K. C., Bermejo, F. J., Villegas, A. G., Quezada, P. J., Aguilar, L. M., & Conde V. E., (2007). Massive propagation of *Polylepis tomentella* Weddell ssp. Nana through in vitro culture techniques. *Ecología en Bolivia*, 42(2), 102-120
86. Walker, M. & Aya, G. (1997), *Agrocambio*, Corpoica Regionales cinco y nueve. 3(10), 33.

87. Warren, G., Fowler, M. & Moo, M. (1992). The cell biology of plant cell culture systems. In: *Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology*. Second Supplement. Pergamon Press, England. p. 1-32.
88. Willan, R. (1991). Guía para la manipulación de semillas forestales. Centro de Semillas Forestales de DANIDA/FAO. Roma: Danida.
89. Zambre M., De Clereq E., Vranová M., Van Montagu G., Angenon G. & SDillen W. (1998). Plant regeneration from embryo – derived in *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) and *P. acutifolius* A. Gray (tepary bean). Plant Cell Reports 17, 626 – 630.