

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

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

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE
PROPAGACIÓN *in vitro* A PARTIR DE SEGMENTOS
NODALES DE CUCARDA (*Hibiscus rosa-sinensis*),
COMO ESTRATEGIA DE REFORESTACIÓN DEL
ESPACIO PÚBLICO DEL DISTRITO METROPOLITANO
DE QUITO**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

JESSICA CAROLINA GORDÓN NÚÑEZ

SANGOLQUÍ, 10 DE DICIEMBRE DE 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

Jessica Carolina Gordón Núñez

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

Ing. Grace Tatiana Páez Barrera

Sangolquí, 10 de diciembre de 2012

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. JESSICA CAROLINA GORDÓN NÚÑEZ como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 10 de diciembre de 2012

Ing. Grace Tatiana Páez Barrera, MC.

DIRECTORA

Quim. Jaime Francisco Gía Bustamante, MSc.

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Jessica Carolina Gordón Núñez

Declaro que:

El proyecto de grado denominado ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN *in vitro* A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES DE CUCARDA (*Hibiscus rosa-sinensis*), COMO ESTRATEGIA DE REFORESTACIÓN DEL ESPACIO PÚBLICO DEL 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 a 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, 10 de diciembre de 2012

Jessica Carolina Gordón Núñez

AUTORIZACIÓN

Yo, Jessica Carolina Gordón Núñez

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN *in vitro* A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES DE CUCARDA (*Hibiscus rosa-sinensis*), COMO ESTRATEGIA DE REFORESTACIÓN DEL ESPACIO PÚBLICO DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 10 de diciembre de 2012

Jessica Carolina Gordón Núñez

DEDICATORIA

A mi madre, por ser mi más grande inspiración y apoyo; a mi padre, por ser el mejor ejemplo de sabiduría y fortaleza. A mis hermanos quienes me han dado felicidad, aliento y coraje. A Patricio por transmitirme optimismo y perseverancia durante este proceso y en todo momento de mi vida.

Jessica Carolina Gordón Núñez

AGRADECIMIENTO

A Dios, por fortalecer mi fe y por darme cada día una razón que me ha impulsado a seguir adelante y a cumplir mis objetivos.

A mis padres, Franklin y Gladys, mi mayor ejemplo de vida, quienes me han dado la motivación necesaria para tomar decisiones acertadas y han sido mi apoyo incondicional durante todo momento transcurrido.

A mis hermanos, Jacqui y Frank, por ser mi razón de vivir y por siempre apoyarme en mis triunfos y en mis caídas. A mi Kerly, por ser mi refugio y la perfecta distracción.

A mis tíos Aidita, Julito y Nelson; mis primos Stefy, Juli, Pao y Nella; mi abuelita Emma, por ser la alegría en mi vida y por hacer de mi familia el mejor ejemplo de unión y soporte. A mi Pascualito, quien ha estado a mi lado incondicionalmente, por creer en mí, no darse por vencido nunca y por hacerme muy feliz cada día.

A Fer Loayza por siempre estar dispuesta a darme una mano y a mis queridas amigas y amigos por su cariño y apoyo, de modo especial a Alexita, Elius y Javi. A mi angelito preferido, Gabriel, porque siempre me cuidó en vida y hoy lo hace desde el cielo.

A la Ing. Tatiana Páez y al Ing. Jaime Gía, por sus valiosas sugerencias, asesoramiento constante y por su tiempo invertido. Al Ing. Cristian Reyes, por abrirme las puertas del laboratorio para llevar a cabo este proyecto, a la Ing. Lorena Oña y a Andrea González, por transmitirme su conocimiento durante la elaboración de mi tesis.

Jessica Carolina Gordón Núñez

NOMENCLATURA

EPMMOP:	Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas
m.:	Metro
cm.:	Centímetro
mm.:	Milímetro
g.Kg ⁻¹ :	Gramo por kilogramo
g.L ⁻¹ :	Gramo por litro
mg.L ⁻¹ :	Miligramo por litro
mL.L ⁻¹ :	Mililitro por litro
mL:	Mililitro
°C:	Grado centígrado
pH:	Potencial Hidrógeno
m.s.n.m.:	Metros sobre el nivel del mar
h:	Hora
s:	Segundos
MS:	Formulación Murashige y Skoog
MS ½:	Formulación Murashige y Skoog a la mitad de su concentración
MSVG:	Formulación Murashige y Skoog con vitaminas Gamborg
MSVG ½:	Formulación Murashige y Skoog con vitaminas Gamborg a la mitad de su concentración
ABA:	Ácido abscísico
AG ₃ :	Ácido giberélico
AIA:	Ácido indol acético
AIB:	Ácido indol butírico
ANA:	Ácido naftalen acético
BAP:	6-bencilaminopurina
KIN:	Kinetina
2,4-D:	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
NaClO:	Hipoclorito de sodio
IP:	Índice de propagación

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iv
AUTORIZACIÓN.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	vii
NOMENCLATURA	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	4
1.3 Objetivos de la investigación.....	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos.....	6
1.4 Marco teórico	7
1.4.1 Características de la especie	7
1.4.2 Cultivo de tejidos vegetales	13
1.4.3 Propagación vía organogénesis directa.....	18
1.4.4 Medio de cultivo.....	27
1.5 Sistema de hipótesis.....	33
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1 Participantes	34
2.1.1 Instituciones.....	34
2.2.2 Personas	34
2.2 Fase de campo	35
2.2.1 Ubicación geográfica del vivero	35
2.2.2 Plantas madre del vivero	35
2.2.3 Tratamiento preliminar.....	36
2.2.4 Recolección del material vegetal de partida	36
2.3 Fase de laboratorio.....	37

2.3.1 Ubicación geográfica del laboratorio.....	37
2.3.2 Periodo de investigación.....	37
2.3.3 Ensayos preliminares	37
2.3.4 Desinfección de los explantes	38
2.3.5 Establecimiento <i>in vitro</i> de los explantes	41
2.3.6 Multiplicación <i>in vitro</i> de los explantes.....	43
2.3.7 Enraizamiento de los explantes.....	46
2.3.8 Análisis de datos.....	48
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	49
3.1 Ensayos preliminares.....	49
3.2 Desinfección de los explantes	50
3.2.1 Contaminación y viabilidad de los explantes	50
3.2.2 Efecto del uso de cloro en el crecimiento de los explantes	52
3.2.3 Contaminación bacteriana y fúngica.....	54
3.3 Establecimiento <i>in vitro</i> de los explantes	55
3.3.1 Contaminación y viabilidad de los explantes	55
3.3.2 Longitud de los brotes	56
3.3.3 Morfología del material de partida	63
3.3.4 Coloración de las hojas de los explantes.....	64
3.4 Multiplicación <i>in vitro</i> de los explantes.....	65
3.4.1 Contaminación y viabilidad de los explantes	65
3.4.2 Número de brotes.....	66
3.4.3 Índice de propagación	67
3.4.4 Porcentaje de inducción de brotes múltiples	68
3.5 Enraizamiento de los explantes.....	70
3.5.1 Contaminación y viabilidad de los explantes	70
3.5.2 Porcentaje de plántulas enraizadas por cada tratamiento	70
3.5.3 Categorías según la aparición de raíz	71
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	73
4.1 Desinfección de los explantes	73
4.1.1 Contaminación y viabilidad	73
4.1.2 Efecto del uso del cloro en el crecimiento de los explantes.....	74
4.1.3 Contaminación bacteriana y fúngica.....	74

4.2 Establecimiento <i>in vitro</i> de los explantes	75
4.2.1 Longitud de los brotes	75
4.2.2 Morfología del material de partida	76
4.2.3 Coloración de las hojas de los explantes.....	77
4.3 Multiplicación <i>in vitro</i> de los explantes.....	78
4.3.1 Número de brotes.....	78
4.3.2 Índice de propagación	79
4.3.3 Porcentaje de inducción de brotes múltiples	80
4.4 Enraizamiento de los explantes.....	80
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	82
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	84
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Tratamientos realizados en la fase de desinfección de los explantes de cucarda	39
Tabla 2.2 Tratamientos realizados en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> de los explantes de cucarda.....	42
Tabla 2.3 Tratamientos realizados en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de los explantes de cucarda	44
Tabla 2.4 Tratamientos realizados en la fase de enraizamiento de los explantes de cucarda.....	46
Tabla 3.1 Resultados obtenidos en la fase de desinfección de los explantes de cucarda (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>)	50
Tabla 3.2 Medias de los crecimientos de los explantes de cucarda	52
Tabla 3.3 Porcentajes de contaminación y sobrevivencia en los tratamientos de establecimiento <i>in vitro</i> de cucarda	55
Tabla 3.4 Porcentajes de contaminación y sobrevivencia en los tratamientos de multiplicación <i>in vitro</i> de cucarda.....	65
Tabla 3.5 Valores de IP de los tratamientos de propagación de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	68
Tabla 3.6 Porcentaje de inducción de brotes múltiples de cucarda según el tratamiento	68
Tabla 3.7 Porcentajes de contaminación y sobrevivencia en los tratamientos de enraizamiento <i>in vitro</i> de cucarda.....	70

Tabla 3.8 Porcentaje de plántulas enraizadas por cada tratamiento 71

Tabla 3.9 Aparición de raíces en los diferentes tratamientos 71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Hoja dentada y flor de pétalos dobles de cucarda	9
Figura 1.2 Descripción botánica de cucarda (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>)	11
Figura 2.1 Plantas madre de cucarda presentes en el vivero de la EPMMOP-Q	35
Figura 2.2 Forma y tamaño de los segmentos nodales para iniciar la etapa de desinfección	37
Figura 2.3 A. Tallos de cucarda B. Yema apical (YAP) y primer segmento nodal (PSN) descartados C. Segmentos nodales utilizados en el proyecto.....	38
Figura 2.4 A. Cultivo de segmentos nodales de cucarda en condiciones axénicas B. Segmentos nodales de cucarda en condiciones <i>in vitro</i>	40
Figura 2.5 A. Plántula establecida B. Remoción del explante inicial C. Incubación de plántulas establecidas en frascos de vidrio. Fase de multiplicación.....	44
Figura 2.6 A. Plántulas de cucarda obtenidas de la etapa de propagación B. Separación de las plántulas C. Plántulas en medio de enraizamiento	47
Figura 2.7 Categorías según la aparición de raíz A. Sin raíz B. Escasa raíz C. Moderada presencia de raíz D. Abundante raíz	47
Figura 3.1 Viabilidad y descarte de yemas axilares y segmentos nodales por oxidación.....	49
Figura 3.2 Porcentajes de contaminación, necrosis, oxidación y viabilidad de los explantes para cada tratamiento	51

Figura 3.3 Crecimiento de los brotes por tratamiento durante tres semanas	53
Figura 3.4 Efecto de la coloración de las hojas respecto al crecimiento de los brotes	54
Figura 3.5 Frecuencia de los agentes contaminantes para el descarte de explantes de cucarda.....	55
Figura 3.6 Análisis del crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de BAP en un medio MS por medio de gráfica de cajas	57
Figura 3.7 Análisis del crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de BAP en un medio MS ½ por medio de gráfica de cajas ...	58
Figura 3.8 Análisis del crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de BAP en un medio MSVG por medio de gráfica de cajas.....	59
Figura 3.9 Análisis del crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de BAP en un medio MSVG ½ por medio de gráfica de cajas.....	60
Figura 3.10 Análisis del crecimiento de los explantes en los diferentes medios de cultivo utilizados por medio de gráfico de puntos	62
Figura 3.11 Análisis del crecimiento de los explantes en los diferentes medios de cultivo utilizados por medio de gráfica de cajas.....	63
Figura 3.12 Análisis de la presencia de callo en los diferentes medios de cultivo utilizados por medio de gráfica de puntos.....	64

Figura 3.13 Análisis del número de brotes por tratamiento de propagación de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	67
Figura 3.14 Porcentaje de inducción de brotes múltiples por cada tratamiento	69
Figura 3.15 Categorías según la presencia o ausencia de raíz en los tratamientos	72

RESUMEN

Hibiscus rosa-sinensis, comúnmente conocido como cucarda, es un arbusto perenne, leñoso en la base, perteneciente a la familia Malvaceae. Sus características de resalte y su utilidad ornamental son de interés para ser producido masivamente. El presente proyecto tuvo como objetivo establecer un protocolo de propagación *in vitro* a partir de segmentos nodales de cucarda (*Hibiscus rosa-sinensis*), para ser utilizado como estrategia de reforestación del espacio público del Distrito Metropolitano de Quito. Para ello, se realizaron tratamientos de desinfección con diferentes concentraciones de cloro (25%, 30%, 40%, 50%, 60%); en el establecimiento se usaron los medios de cultivo MS, MS ½, MSVG y MSVG ½ adicionados con BAP (0; 0,1; 0,3 y 0,5 mg.L⁻¹). En la etapa de propagación se utilizaron varias concentraciones de BAP (0; 0,5; 0,8; 1; 1,5 mg.L⁻¹) y AIA (0; 0,01; 0,02; 0,03 mg.L⁻¹) y en el enraizamiento se probó AIB (0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg.L⁻¹) en un medio con 20 y 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 1 g.L⁻¹ de carbón activado. Los resultados indicaron que en la etapa de desinfección, al colocar 30% de cloro, se obtuvo un alto porcentaje de explantes viables; concentraciones mayores a ésta provocaron que las plántulas se vieran afectadas. De igual manera, el establecimiento se vio favorecido en un medio MS suplementado con 0,3 mg.L⁻¹ de BAP. Se demostró también un descenso de la viabilidad de los explantes al aumentar la concentración de esta citoquinina en los medios de ensayo. Para la etapa de multiplicación *in vitro* se utilizó un medio MS añadido con 1 mg.L⁻¹ BAP y 0,01 mg.L⁻¹ AIA, con lo cual se obtuvo hasta cuatro brotes por explante. Finalmente, en la etapa de enraizamiento, se utilizó un medio MS con 30 g.L⁻¹ de sacarosa. Los resultados sugieren que *Hibiscus rosa-sinensis* se adapta mejor con bajas concentraciones de fitohormonas para su óptimo crecimiento *in vitro*.

Palabras clave: *Hibiscus rosa-sinensis*, propagación *in vitro*, segmentos nodales

ABSTRACT

Hibiscus rosa-sinensis commonly known as cucarda is a perennial shrub, woody in the base that belongs to the Malvaceae family. Its outstanding characteristics and ornamental usefulness are of interest to be produced on a large scale. The objective of this project was to establish an *in vitro* propagation protocol from cucarda (*Hibiscus rosa-sinensis*) nodal segments, to be used as a reforestation strategy of the Metropolitan District of Quito public area. For this, disinfection treatments were performed with different chlorine concentrations (25%, 30%, 40%, 50%, 60%); for the establishment, the culture mediums used were MS, MS ½, MSVG y MSVG ½ supplemented with BAP (0; 0,1; 0,3 y 0,5 mg.L⁻¹). In the propagation phase, several concentrations of BAP (0; 0,5; 0,8; 1; 1,5 mg.L⁻¹) and AIA (0; 0,01; 0,02; 0,03 mg.L⁻¹) were used; and for the rooting, IBA was tested (0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg.L⁻¹) in a medium with 20 and 30 g.L⁻¹ sucrose and 1 g.L⁻¹ activated charcoal. Results showed that in the disinfection phase, when using 30% chlorine solution, a high percentage of viable explants was obtained; higher concentrations caused a negative effect on the seedlings. In the same way, a MS medium supplemented with 0,3 mg.L⁻¹ BAP was favorable for the establishment. It was also demonstrated a decline of the explants viability by increasing the concentration of this cytokinin on the essay mediums. For the *in vitro* propagation phase a MS medium with 1 mg.L⁻¹ BAP and 0,01 mg.L⁻¹ AIA was used in order to obtain up to four buds per explant. Finally, in the rooting phase, a MS medium with 30 g.L⁻¹ sucrose was used. Results suggest that *Hibiscus rosa-sinensis* better adapts with phytohormones low concentrations for optimum *in vitro* growth.

Key words: *Hibiscus rosa-sinensis*, *in vitro* propagation, nodal explant

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

En la actualidad, diversas actividades antropogénicas y fenómenos naturales, han dado paso a la pérdida de áreas verdes alrededor del mundo, es decir, todos aquellos espacios ocupados por árboles, arbustos o plantas con diferentes usos ya sean recreativos, de ornamentación, así como de protección y recuperación del ambiente. Se conoce que las consecuencias de estas actividades han provocado la deforestación del 50% del planeta, lo cual ha conllevado a la destrucción de los recursos hídricos, una acelerada desertificación y la acumulación de excedentes no biodegradables (Ministerio de Educación del Ecuador, 2010).

La falta de planes de manejo forestal y el poco compromiso en el cuidado de parques y de jardines, ha provocado la necesidad de aumentar zonas urbanas y servicios públicos. La reducción de dichas áreas y su pérdida ha traído como consecuencia un daño permanente a la biodiversidad, la erosión de suelos y una baja capacidad de generación de oxígeno por parte de la cobertura vegetal (Bird & Molinelli, 2001).

Según el CLIRSEN (Centro de Levantamientos Integrados de Recursos Naturales por Sensores Remotos) el Ecuador registra una de las tasas más altas de deforestación de Latinoamérica, ya que existe una pérdida anual de entre 60 mil a 200 mil hectáreas de bosques nativos. Esto ha sido provocado por la tala ilegal, la expansión de cultivos, el desarrollo de proyectos agroindustriales, la explotación de madera y otro tipo de recursos. Todas estas actividades provocan que cada año en el Ecuador exista una disminución del 1,8% de bosques primarios (Rioseco, 2010).

Existe información que afirma que durante el periodo de 1991 al 2000 se deforestaron 1'782.832 hectáreas y que en el periodo del 2000 al 2008 se perdieron 80.000 hectáreas más; afectando directamente a los recursos

naturales existentes en el país. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se requiere de 9 m² de área verde por habitante. Es evidente que se carece de esta cantidad de recursos naturales en el país y consecuentemente de otro tipo de recursos como la regulación hídrica; además se ha provocado un desequilibrio biológico que ha causado un pobre reciclamiento de nutrientes y el funcionamiento inadecuado de los ciclos de los ecosistemas naturales (Jácome, 2011).

Con el fin de fomentar la recuperación de los ecosistemas en el Ecuador, se han realizado diversos macroproyectos mediante fundaciones tal como “Bio Tropical”, con la participación activa de varias parroquias, obteniendo resultados positivos y garantizando una sostenibilidad ambiental y un aumento en la disponibilidad de recursos alimenticios (Distrito Metropolitano de Quito, 2012).

Para lograr este propósito es necesario conocer de qué modo se puede optimizar el proceso de recuperación de dichas áreas ya que existen muchas maneras de llevarlo a cabo sin ser las mejores y como consecuencia no garantizarían una verdadera solución ante la situación que se vive actualmente en el país. Se conoce que el crecimiento de vegetación se puede lograr mediante el cultivo de semillas. Este método ha sido el más conocido y empleado en los últimos años; sin embargo, la disponibilidad de las mismas es limitada en muchos casos, tal como en la cucarda (Ayadi *et al.*, 2011).

La viabilidad de semillas decrece con el tiempo cuando se las almacena en condiciones conocidas de humedad y temperatura. Además, no ha sido recomendada debido a la heterogeneidad de la naturaleza de las plántulas obtenidas debido a la polinización cruzada (Ayadi *et al.*, 2011).

Por otro lado, también existe el logro de la reforestación mediante técnicas de reproducción asexual tal como las estacas. Si bien es cierto que es una manera más rápida de obtener plantas en relación a la obtención mediante semilla, no se puede garantizar una alta calidad de las mismas ya que este

método conlleva diversas mutaciones debido a la variabilidad genética (Tufiño, 2009).

Se ha cultivado especies ornamentales por diferentes métodos convencionales de propagación asexual; sin embargo, esto no ha satisfecho la demanda de las mismas ya que no son técnicas rápidas o eficientes. Esto ha motivado a que se lleven a cabo investigaciones sobre la factibilidad de usar el cultivo de tejidos tanto en plantas difíciles de propagar como en las que tienen un bajo porcentaje de multiplicación (Mogollón & Gil, 1992).

Las actividades de fomento a la reforestación de las áreas verdes del país requieren del desarrollo de nuevos métodos de producción que permitan el uso más racional y sostenido de los recursos naturales (Bolio, Lara, & Magaña, 2006).

Según Anderson (2007), la manera más adecuada de preservar y perpetuar la especie *Hibiscus rosa-sinensis* es mediante la propagación vegetativa *in vitro*, ya que existen semillas establecidas muy raramente y la reproducción sexual no contribuye a la evolución.

Diferentes estudios se han desarrollado a nivel internacional ya que esta tecnología es importante para los países en desarrollo con vistas a la producción de material vegetal de calidad elevada y libre de enfermedades. Hasta la actualidad, se ha practicado el cultivo *in vitro* de especies hortícolas, ornamentales y leñosas. Su importancia radica en la utilidad que han podido brindar al entorno (FAO, 1999).

Para dar continuidad a los resultados de los estudios de este tipo en el Ecuador, se han llevado a cabo proyectos de investigación de especies vegetales en el Laboratorio de Micropropagación de la Unidad de Espacio Público del Municipio de Quito. Mediante dichos proyectos se busca la conservación de la biodiversidad y el desarrollo del espacio público.

En el Vivero de Cununyacu de la Unidad de Espacio Público no se cuenta con semillas de cucarda y cuando se han encontrado en existencia generalmente no tienen un alto porcentaje de germinación. Este factor es relevante ya que influye directamente sobre el número de plántulas que se pueden obtener. Las plantas de cucarda existentes en las vías públicas no son de alta calidad ya que no resisten condiciones ambientales adversas por lo cual pierden su follaje característico, es por esto que su obtención es importante debido a la necesidad de generar cultivares mejorados y resistentes (Yang, Makoto, Haruhiko, & Takeshi, 1995)

1.2 Justificación del problema

El crecimiento constante de la población mundial ha generado consecuencias a lo largo del tiempo, provocando presión sobre el espacio físico donde se han desarrollado diversas actividades para la producción de bienes de consumo y causando un deterioro permanente de diferentes zonas urbanas. Estos bienes de consumo han sido desde el principio de la humanidad de tipo vegetal principalmente, por lo cual es necesario crear posibilidades de mantenimiento de éstas especies mediante técnicas sustentables que permitan mantener una constante producción de los mismos (H. Municipalidad de Cochabamba, Bolivia, 2010).

Por esta razón, varios investigadores se han apoyado en las técnicas de cultivo *in vitro* con el objetivo de mantener la biodiversidad y a la vez de mejorar la producción masiva de especies vegetales, debido a la necesidad de este tipo de recursos y a la disponibilidad de tierras (Silva & Souza, 2010).

La aplicación del cultivo de tejidos se ha convertido en una tecnología importante que ofrece ventajas adicionales como un alto porcentaje de multiplicación y garantiza la obtención de plantas de alta calidad que son más resistentes a diversas condiciones ambientales (Ayadi *et al.*, 2011).

Otra ventaja del cultivo *in vitro* de plantas es que se puede lograr la clonación de individuos con las mejores características genéticas, útiles para el campo agronómico; además de la obtención de metabolitos secundarios, entre otros. Por estas razones se ha convertido en una alternativa económicamente rentable relacionado con los métodos de multiplicación clásicos como el de reproducción sexual y asexual (Segretín, 2009; Norman, 2010)

La multiplicación de especies ornamentales ha sido la técnica de mayor rentabilidad económica en el cultivo de tejidos vegetales ya que la reforestación con las mismas, ya sean nativas o introducidas, ha sido considerada como una alternativa para aquellas áreas de baja capacidad productiva en zonas rurales (Silva & Souza, 2010).

Adicionalmente, se puede llevar a cabo una reforestación con especies como la cucarda, ya que estas plantas se caracterizan por su abundante floración con diversidad de colores y su facilidad de cultivo en suelos por su adaptación a diferentes condiciones ambientales (Alonso, 2002).

El beneficio de este proceso es que una vez que se hayan obtenido suficientes plantas para reforestar el espacio público, tendrán éxito al ser variedades ornamentales libres de enfermedades y de características llamativas como el tamaño del tallo o la flor (Quintero, 1993).

Las plantas obtenidas tras un proceso riguroso de asepsia en laboratorio son resistentes a diversos factores; por lo cual presentarán un mejor manejo a ciertas condiciones ambientales tales como la temperatura, la humedad, el flujo de aire, entre otros. De este modo, estas vitroplantas llegarán a ser de mejor calidad y durabilidad para el entorno (Almodóvar, 1998).

Un beneficio adicional de la cucarda son sus bondades medicinales, lo que la hacen de importancia para ser propagada masivamente. Así, se da apertura a la investigación de los beneficios que podemos obtener al proporcionar productos y servicios a partir de un sinnúmero de especies vegetales (Abedini, 2002).

Debido al desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro*, se ha podido ofrecer alternativas de gran potencial económico mediante el aumento de la producción de las cosechas, la disminución de los costos de producción, la mejora de la calidad alimenticia, la seguridad de los productos y la calidad ambiental; además de desarrollar proyectos investigativos con el fin de conservar la foresta urbana (Abedini, 2002).

Esto se logra mediante procesos de innovación tecnológica interdisciplinaria en beneficio del desarrollo limpio (Centro de Investigación Ambiental Cununyacu, 2008).

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones acerca de la propagación *in vitro* de especies de la familia Malvaceae tal como *Hibiscus cannabinus* o *Hibiscus sabdariffa* en diversos países; mas no se han obtenido resultados concretos acerca de *Hibiscus rosa-sinensis*.

En el Ecuador tampoco se han llevado a cabo investigaciones de la respuesta que podrían tener estas plantas al ser introducidas en condiciones de laboratorio; por lo cual es interesante desarrollar una técnica de micropropagación vegetal efectiva para el cultivo de la cucarda, que además de ser una especie de interés ornamental, es de interés medicinal.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Establecer un protocolo de propagación *in vitro* a partir de segmentos nodales de cucarda (*Hibiscus rosa-sinensis*), como estrategia de reforestación del espacio público del Distrito Metropolitano de Quito.

1.3.2 Objetivos específicos

Encontrar fuentes y tipos de explantes adecuados para el cultivo *in vitro* de *Hibiscus rosa-sinensis*.

Estandarizar el protocolo de desinfección adecuado para segmentos nodales de *Hibiscus rosa-sinensis*.

Determinar la composición adecuada del medio de cultivo para lograr el establecimiento de la cucarda.

Encontrar las concentraciones necesarias de reguladores de crecimiento para la multiplicación *in vitro* de *Hibiscus rosa-sinensis* en el medio de cultivo.

Determinar la composición óptima de un medio de cultivo para el enraizamiento de cucarda.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Características de la especie

1.4.1.1 Generalidades

Hibiscus rosa-sinensis, comúnmente conocido como cucarda, es un arbusto perenne, herbáceo o leñoso, cuyo origen es en Asia tropical, por lo cual es una planta introducida. Pertenece a la familia Malvaceae que está compuesta por 82 géneros; *Hibiscus* es el más amplio dentro de la misma, con más de 200 especies de arbustos, árboles, plantas herbáceas anuales y perennes. Se adapta de mejor manera a lugares abiertos (exterior) y resiste temperaturas no muy altas, entre 16 y 18 °C. El aumento de la temperatura puede significar un alargamiento de brotes que posteriormente lignificarán inadecuadamente (Vidalie, 2001; Warner & Erwin, 2001; Zaragoza, 2007).

Su característica de resalte son sus flores al ser de variados colores (Figura 1.1). *Hibiscus* necesita de veranos largos y calientes para que se de una buena floración (Brickell & Zuk, 1997; Montiel, 1999).

En cultivos, necesita un sustrato rico en nutrientes e iluminación hasta antes del medio día. Esta es una característica muy importante ya que se ha

descrito que los invernaderos deben ser transparentes y el sombreado (30%) solo es necesario en épocas de verano. Es necesario mantenerla a bajas humedades (menor al 50%) ya que de esta manera se puede evitar la podredumbre de las raíces. Si la temperatura crece, también es muy importante que la humedad se aumente, caso contrario puede sufrir accidentes fisiológicos como la caída de las yemas florales (Vidalie, 2001; Zaragoza, 2007).

Puede presentar enfermedades ya que es propensa a la oxidación, lo más común son las manchas foliares por antracnosis, cercospora, botrytis; podredumbre de la corola y marchitamiento de la flor debido a la presencia de hongos, bacterias y virus. Entre otras plagas comunes se puede mencionar a las moscas blancas, pulgones, ácaros, escarabajos y orugas. Por estas razones es necesario tratarlas con fungicidas o bactericidas según sea el caso (Daughtrey, 2001; De la Torre *et al.*, 2008).

Su época de floración, en climas continentales, es en verano y en los trópicos durante todo el año; mientras que su época de plantación o siembra es en primavera si se lo hace a través de semillas, y en verano si se siembran por medio de estacas. Por lo general las estacas son sembradas con una longitud de 20 a 30 cm y se la trata con hormonas de enraizamiento (Interagency Taxonomic Information System ITIS, 2012).

Los cultivares tradicionales son más resistentes ya que han sido expuestos a pleno sol o con poca sombra, alcanzando condiciones adecuadas a los 3 o 4 metros de altura. El sustrato requerido para su introducción en maceta debe tener el suelo bien drenado con un pH entre 5,5 a 6,5 (Ortiz, 2009).

Se ha reportado que esta especie tiene un contenido de $0,21 \text{ g.kg}^{-1}$ de fenoles y ausencia de taninos, en cuanto a los metabolitos secundarios. Además contiene $6,64 \text{ g.kg}^{-1}$ de calcio y $3,31 \text{ g.kg}^{-1}$ de fósforo en sus hojas (Bolio, Lara, & Magaña, 2006).

Se la conoce con una variedad de nombres comunes dependiendo del lugar en el que se ha introducido. Por ejemplo, en Venezuela se la conoce como pacífico, en Panamá como papo; otros nombres son cucarda, cayena, rosa de China, hibisco, San Joaquín, cardenales, flor del beso, flor de betún, flor del rey, peregrina, entre otros (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008; Hermida, 2010).

Este género ha traído múltiples beneficios dependiendo de la especie ya sea comercial, alimenticia, ornamental o medicinal. *Hibiscus rosa-sinensis* ha sido conocida en diversos países por ser la más representativa (Warner & Erwin, 2001; Anderson, 2007)



Figura 1.1 Hoja dentada y flor de pétalos dobles de cucarda

1.4.1.2 Taxonomía

La taxonomía de *Hibiscus rosa-sinensis*, según la ITIS (2012), se detalla a continuación.

REINO	Plantae
SUBREINO	Tracheobionta
FILO	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Dilleniidae
ORDEN	Malvales

FAMILIA	Malvaceae
SUBFAMILIA	Malvoideae
GÉNERO	<i>Hibiscus</i>
ESPECIE	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>

1.4.1.3 Descripción botánica

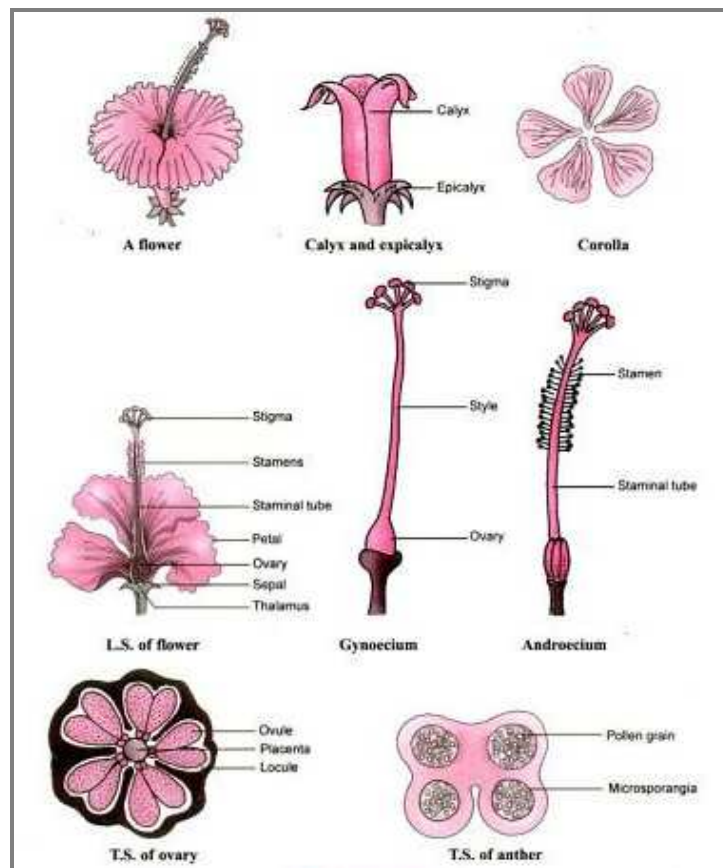
Hibiscus rosa-sinensis es un arbusto leñoso en la base, perenne, muy ramificado con hojas simples, alternas, de márgenes dentados, pecioladas, verde oscuro en su cara superior (haz) y verde más claro en la parte posterior (envés), de 15 cm de longitud. La clasificación de sus hojas es simple, pueden ser alternas y ovaladas aunque pueden variar e incluso tener bordes dentados; por su ápice es agudo y por su base es cuneiforme (Figura 1.1). Su coloración general es verde oscuro y son de aspecto brillante (Gobierno de Estado México, 2008; Bendre & Kumar, 2009)

Sus flores son solitarias axilares y tienen forma de embudo. Son pediceladas, actinomorfas y hermafroditas. Tienen cinco pétalos de color carmesí, aunque su coloración es bastante diversa, de 10 cm de ancho; tiene anteras de color amarillo y estambres rojos. El diámetro de la flor en cultivares perennes puede ser mayor a 30 cm. Crecen en temporadas de verano a otoño (Bendre & Kumar, 2009).

En el cultivo, el color de la flor es muy variable, en un rango de carmesí a anaranjado, amarillo o blanco; aunque se han creado híbridos con flores de varios colores y pétalos simples o dobles. Debido a la complejidad de la especie, no se ha logrado obtener mucha información en cuanto a sus características genéticas; sin embargo, se conoce que la flor de color rosado es dominante respecto a la de color rojo (Anderson, 2007; De la Torre *et al.*, 2008; Hermida, 2010).

Los híbridos del género *Hibiscus* son muy fáciles de identificar ya que tienden a mezclar las características fenotípicas y genotípicas de ambos padres, de tal manera que se hacen distinguibles (Anderson, 2007)

La altura del arbusto es de 5 m, posee un tallo leñoso, ramificado, glabro (ausencia de tricomas) y su reproducción es asexual por medio de estacas o de semillas. Su distancia de siembra es de 40 cm entre estacas y su crecimiento es favorecido a los 2100 m.s.n.m. en suelos con drenaje regular o bueno y de textura arcillosa (Leiva, López, Negrín, Pérez, & Marreno, 2010).



FUENTE: ORTIZ (2009)

Figura 1.2 Descripción botánica de cucarda (*Hibiscus rosa-sinensis*)

El perianto consta de cáliz, 5 sépalos libres o unidos, generalmente con epicáliz y pelos glandulares en la base. El epicáliz posee bractéolas (5-8) alrededor del cáliz; corola con 5 pétalos contortos (contorno retorcido), libres pero unidos en la base a un tubo estaminal. El androceo tiene filamentos unidos en varios cuerpos o en uno solo y anteras monotecas (dos sacos polínicos). El gineceo es pentacarpelario, sincárpico, pentalocular con muchos óvulos por lóculo, contiene carpelos, estilo en número igual o doble al de carpelos (Figura 1.2). El fruto se encuentra encapsulado, más conocido como esquizocarpo, por esta razón la cucarda se clasifica también como

angiosperma (Guía de Consultas Botánicas, 2007; Bendre & Kumar, 2009; Verma, 2011)

Al pertenecer a la clase Magnoliopsida, se la clasifica como dicotiledónea ya que posee dos cotiledones, las flores son pentámeras, tienen floema y xilema ordenado, raíz axonomorfa y poseen cambium. Es una planta fanerógama ya que posee flor y por lo tanto reproducción de tipo sexual. La semilla no tiene endosperma y el embrión tiene forma recta o curva (Guía de Consultas Botánicas, 2007; Rueda, 2007).

1.4.1.3.1 Etnobotánica de *Hibiscus rosa-sinensis*

Según la Enciclopedia de plantas de jardín (Brickell & Zuk, 1997), se puede describir a *Hibiscus rosa-sinensis* como sigue.

Hábito: Arbusto.

Origen: Introducida, Asia.

Nombres comunes: Cucarda, flor de betún, flor del rey, peregrina

Etnias: Tsa'Chi, Cofán, Siona, Mestiza.

Usos:

Apícola: Visitada por las abejas para su producción.

Materiales: Adornos personales (Cofán-Sucumbíos, otros-Amazonía).

Medicinal: Flor en infusión para tratar fiebre, tos (Siona-Sucumbíos).

Medioambiental: Se siembra como cerca viva.

1.4.1.4 Importancia de la especie

La cucarda se considera una planta útil desde el punto de vista ornamental por su facilidad de floración, permanente en climas tropicales, siendo muy llamativas debido a su tamaño, sus variados colores y su firmeza, pero carecen de fragancias. Estas plantas han sido utilizadas en jardines como cercas en el exterior, y también en el interior en macetas (Ferreira & Cerrate, 2000).

Por otro lado, cabe recalcar la importancia medicinal de la misma ya que desde tiempos ancestrales, se la ha utilizado en diferentes etnias con fines curativos. Así, sus raíces han sido usadas para enfermedades venéreas, además, el uso de sus hojas son de importancia en medicina natural como antiparasitarios, diurético, laxante suave, hipotensor y bactericida. Una infusión de esta planta puede ser apropiada para reducir la hipertensión y el colesterol (Brickell & Zuk, 1997).

También se la utiliza en el cuidado de la piel por su contenido de mucílagos, componentes azucarados que les confieren propiedades emolientes, es decir de hidratación y protección. Por esta razón se la puede usar en caso de quemaduras, heridas, grietas, entre otros (Ozmen, 2010).

Sirve como tratamiento para irritaciones o inflamaciones de mucosas del aparato digestivo. Por su medio se puede tratar la gastritis, malas digestiones o acidez estomacal. Además se ha reportado que las plantas del género *Hibiscus* tienen el potencial de proveer componentes biológicamente activos que actúan como antioxidantes, los cuales son protectores de las funciones cardiovasculares y son capaces de impedir la proliferación de células malignas o cancerosas, también han sido asociadas a la cura de la alopecia (Ozmen, 2010).

Es de mucha importancia mantener este tipo de material vegetal para la disponibilidad del hombre de modo que su permanencia sobre la superficie de la tierra sea sustentada gracias al conjunto de especies o alimentos que le permiten conservar su salud o recuperarla (Ferreira & Cerrate, 2000).

1.4.2 Cultivo de tejidos vegetales

1.4.2.1 Generalidades

El cultivo de tejidos se origina, a principios del siglo XX, gracias al enunciado del principio de *totipotencialidad celular* el cual explica que es posible regenerar una planta entera a partir de toda célula vegetal individual por

medio de técnicas de cultivo *in vitro* (Pérez, Alvarado, Gómez, Jiménez, & Orellana, 1998; Rivero, 2011).

Se puede definir al cultivo de tejidos como un conjunto de técnicas que consiste en aislar una porción de una planta, denominado explante, en condiciones asépticas, para ser cultivado en un medio cuya composición química sea variable, dependiendo de sus necesidades; para que las células, órganos, tejidos o protoplastos expresen su potencial intrínseco (Roca & Mogrinski, 1991).

Mediante el uso de estas técnicas, conocidas como *micropropagación* o *propagación* se puede llevar a cabo la regeneración *in vitro* de plantas completas, su multiplicación y adaptación a condiciones externas. En una *propagación vegetativa* no se da la participación de los órganos reproductores de las plantas, sino la inducción de yemas axilares que pueden dar lugar a la formación de brotes, que posteriormente, pueden formar una nueva planta. Cuando se habla de *propagación clonal*, se refiere a la producción de plantas genéticamente iguales a la planta madre u original; y es masiva ya que se puede obtener un gran número de plantas en menor tiempo (Marín & Moll, 1997).

Los aportes biotecnológicos que pueden ser obtenidos tras la aplicación del cultivo de tejidos vegetales abarcan desde estudios teóricos acerca de la fisiología y la bioquímica de diferentes especies vegetales; hasta la obtención en sí de los productos de interés como plantas libres de patógenos y la posterior producción de sus metabolitos secundarios. Esto también conlleva el mejoramiento genético mediante una selección *in vitro* (Pérez *et al.*, 1998).

1.4.2.2 Regeneración de plantas

Los métodos existentes tradicionales mediante los cuales se puede llevar a cabo la regeneración de plantas son la *organogénesis* y la *embriogénesis* (Pérez *et al.*, 1998).

La organogénesis es un método de regeneración de plantas, conocido como evento morfogénético caracterizado por el desarrollo o formación de un primordio unipolar (órgano rudimentario en formación) a partir de una yema para su posterior desarrollo en un brote vegetativo. Se puede dar la formación de órganos nuevos, como vástagos, raíces, flores, hojas, entre otros, los cuales van a conservar su función y mantendrán una conexión permanente entre los nuevos brotes y el tejido original o materno (Alva, Menéndez, Oropeza, & Vargas, 2010).

La formación de estos brotes puede darse de forma directa, a partir del explante que es una porción de planta que ha sido aislado en condiciones asépticas para ser cultivado en un medio. En este caso se conoce como *organogénesis directa*; o por el contrario, se puede dar a partir de un callo que es un tejido poco diferenciado y que no está organizado, mediante *organogénesis indirecta* (Roca & Mogrinski, 1991; Pérez *et al.*, 1998)

La vía organogénica exige una secuencia de medios de cultivo para formar una planta completa ya que la formación de brotes tendrá diferentes requerimientos respecto a la formación de raíces (Pérez *et al.*, 1998).

Así, se promueve el desarrollo de una estructura morfológica; mediante la condición del medio de cultivo ya sea en el aspecto nutricional u hormonal. Esta técnica ha sido útil para el estudio de los diversos mecanismos reguladores del crecimiento y del desarrollo de las plantas (Quintero, 1993; Gómez & García, 2006).

Además, dentro de la vía organogénica se puede diferenciar la *formación de yemas axilares* y la *formación de yemas adventicias*. La primera se trata de la formación o generación de brotes utilizando como explante a las yemas ubicadas en las axilas de las hojas. Su mayor ventaja es la estabilidad genética que ofrece en las plantas regeneradas, además es una técnica por la cual se han establecido la mayoría de especies. Esta técnica ofrece bajos coeficientes de multiplicación, respecto a otros existentes. En cuanto a las yemas adventicias, la formación a partir de meristemas preexistentes puede

generar variación genética debido al origen unicelular de las mismas (Pérez *et al.*, 1998; Toledo, Espinoza, & Golmirzaie, 1998).

Por otro lado, la embriogénesis somática es un evento mediante el cual células somáticas haploides o diploides se desarrollan con el fin de formar un embrión, que no son el producto de la fusión de gametos. Los embriones somáticos se pueden definir como estructuras o plantas que se encuentran en una etapa inicial de desarrollo, que se caracteriza por presentar una estructura bipolar, es decir, con raíz y vástago en polos opuestos de un mismo eje. A diferencia de lo ocurrido en los explantes provenientes de la organogénesis, éstos no tienen conexión vascular con los tejidos maternos y su origen es unicelular o multicelular (Pérez *et al.*, 1998; Alva *et al.*, 2010).

Dentro de esta vía de propagación, se puede diferenciar a la *embriogénesis somática directa*, en la cual los embriones se originan a partir de un tejido, sin previa formación de callo; y la *embriogénesis somática indirecta*, en donde es necesaria la proliferación de callo para el desarrollo posterior del embrión. La mayor ventaja de este método consiste en la obtención de altos coeficientes de multiplicación en menor tiempo, aunque es necesario conocer en que tipo de especies se desarrolla favorablemente (Alva *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 1998).

En general, la obtención de vitroplantas se puede dar mediante el uso de brotes, meristemas o embriones como explante, o a partir de un brote que crezca dentro de un callo. Diferentes partes de una planta pueden tener diversas respuestas fisiológicas a las mismas condiciones de cultivo ya que el estado de la fuente de explante es variable (Roca & Mogrinski, 1991; Abdelnour & Escalant, 1994).

1.4.2.3 Factores de influencia

El éxito de un cultivo *in vitro* radica en el control de los factores que pueden afectar el crecimiento de las plantas. Estos factores pueden ser físicos o químicos (Calva, 2005).

Dentro de los factores físicos es importante nombrar el control de la luz, la temperatura y la humedad relativa, principalmente. La luz interviene en el fotoperiodo de las plantas y para que se dé una adecuada fotomorfogénesis (crecimiento dependiente de la luz e independiente de la fotosíntesis) con el fin de obtener brotes de aspecto normal. Para lograr estas condiciones, las plantas deben ser ubicadas en estanterías con iluminación artificial (1000 a 3000 lux) en la cual a la vez, se establece un rango de temperatura adecuado que puede oscilar entre 21 y 23 °C. La humedad relativa debe mantenerse alta con el fin de mantener la asepsia al realizarse un bajo intercambio gaseoso (Marín & Moll, 1997; Castillo, 2004).

En cuanto a los factores químicos, los componentes del medio de cultivo son críticos para el crecimiento y desarrollo de los explantes (Abdelnour & Escalant, 1994).

En primer lugar el pH de los medios de cultivo es importante y específico para cada especie. Esto no es un factor desconocido ya que en el suelo las plantas también deben mantenerlo para poder sobrevivir. El rango adecuado es de 5.8 ± 0.2 (Abdelnour & Escalant, 1994).

La composición de los medios de cultivo variará dependiendo de las necesidades del explante y también de las condiciones de cada laboratorio. Es indispensable que los medios de cultivo cumplan con los requerimientos de las plantas con el fin de que las células crezcan y se dividan rápidamente y además para que expresen su capacidad de diferenciación y biosíntesis para una o varias sustancias de interés (Abdelnour & Escalant, 1994; Calva, 2005).

1.4.2.4 Aplicaciones del cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos ha tenido muchas aplicaciones en la ciencia para su desarrollo y progresiva evolución, entre las más importantes se puede nombrar a las siguientes.

La propagación masiva de plantas es una de las aplicaciones más importantes ya que mediante la misma se ha establecido una verdadera industria de micropropagación. La principal ventaja que se pueden lograr a través de este sistema es la obtención de un alto coeficiente de multiplicación en cortos periodos de tiempo. Esto se aplica también para aquellas especies que son de difícil propagación o que se encuentran en vías de extinción. Además, mediante la propagación masiva se puede introducir clones de individuos que posean características deseables en algún campo de aplicación tal como la agronomía (Segretín, 2009).

La conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal) se ha convertido en una necesidad para los programas de mejoramiento genético. De esta forma se puede obtener plantas de características deseadas en cualquier momento y además se las puede mantener libres de enfermedades una vez que el material haya sido saneado. La conservación *in vitro* se puede dar mediante la *crioconservación*, que es la técnica más eficiente ya que mediante ella se puede detener los procesos biológicos de tal modo que se eliminan los factores de variabilidad por tiempo indefinido. Además con esta técnica se puede hacer uso de todo tipo de material vegetal tal como callos, suspensiones, meristemos, ápices, anteras y polen (Pérez *et al.*, 1998).

También se pueden obtener metabolitos secundarios mediante el empleo de biorreactores. Entre otras aplicaciones se puede nombrar a la producción de nuevos híbridos, la germinación de semillas, la realización de estudios fisiológicos diversos y la obtención de plantas libres de patógenos (Segretín, 2009).

1.4.3 Propagación vía organogénesis directa

Esta fase es de vital importancia para el cultivo de tejidos vegetales, ya que en ella se puede definir el número de plantas o propágulos que se pueden obtener tras el proceso de micropropagación. Es muy importante conocer las variantes somaclonales que se pueden dar en el proceso, ya que representan a

la variación genética que se da dentro del cultivo *in vitro* de las plantas (Roca & Mogrinski, 1991).

La producción del mayor número posible de propágulos se puede dar a partir de yemas axilares o apicales y a través de embriogénesis somática. Para esta etapa es indispensable el uso de reguladores de crecimiento como componentes principales del medio de cultivo ya que los mismos permitirán una fácil proliferación de nuevos brotes. Este proceso se repite las veces que sea necesario, tomando en cuenta que mientras más ciclos se desarrollen más es la probabilidad de generar mutaciones, hasta conseguir el número de plantas deseadas que estén listas para pasar a la etapa de enraizamiento en la cual los requerimientos de fitohormonas será distinto al de propagación. (Quintero, 1993).

La proliferación de yemas axilares proporciona la mayor estabilidad genética el momento de realizar los diversos ciclos de propagación. El progreso en plantas perennes ha sido más lento debido al desconocimiento de la genética de estas especies (Pérez *et al.*, 1998).

Es importante conocer el ciclo de propagación hasta el cual es adecuado obtener propágulos y de igual manera si el número de ellos es alto pero no conservan las características de la planta madre, por lo general no son deseables en campos agronómicos ni en plantas ornamentales (Kumari & Pandey, 2011).

1.4.3.1 Multiplicación vegetativa

La multiplicación vegetativa llevada a cabo mediante el cultivo de yemas axilares, por vía de organogénesis directa se desarrolla con el objetivo de mantener diversas plantas en cultivos asépticos para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos. Es importante que las plantas que se van a obtener posteriormente provengan de un material sano y previamente tratado. Para su efecto, se han desarrollado las diversas fases de micropropagación,

críticas por las cuales debe pasar una planta madre para obtener los resultados deseados. (Roca & Mogrinski, 1991).

1.4.3.2 Etapas de la micropropagación

Dentro del proceso de micropropagación vegetal se puede diferenciar las etapas que abarcan el ciclo completo y que se pueden aplicar a diversas especies vegetales; aunque cada caso es diferente; en algunas se pueden suprimir algún paso, pero en términos generales son comunes para este proceso (Castillo, 2005).

Murashige (1974) propuso inicialmente tres pasos fundamentales por los cuales deberían pasar los explantes vegetales. La fase de establecimiento aséptico, la proliferación o multiplicación de los mismos y el enraizamiento. Estas etapas son básicas dentro del proceso de propagación *in vitro*; sin embargo, hoy en día han sido complementadas con etapas que permiten un mejor establecimiento de los explantes y que los prepara para su posterior adaptación al suelo (Jácome, 2011).

1.4.3.2.1 Fase 0: Selección de la fuente de explante

Como paso previo a la desinfección de los explantes, es de vital importancia conocer las condiciones en las que se ha mantenido a la planta madre de la cual se obtendrá el material vegetal para el cultivo *in vitro*, ya que las mismas deben tener un nivel nutricional alto y un grado de desarrollo adecuado. Para esto, es importante mantener a la planta madre, donadora de yemas, bajo condiciones controladas antes de utilizarla, durante un periodo de tiempo. De esta manera se puede obtener un crecimiento vigoroso y con menor cantidad de enfermedades. El tratamiento que se provea a la planta donadora puede ser continuo durante el proceso de micropropagación, dependiendo de las necesidades debido a la presencia de patógenos u otros factores de importancia (Castillo, 2005).

Si la planta madre no ha recibido un mantenimiento adecuado, es posible encontrarse con barreras en la etapa de desinfección de los explantes y en el establecimiento de los mismos ya que la fuente escogida puede provenir de condiciones poco favorables y arrojar resultados negativos en cuanto a la asepsia del material vegetal.

En algunos casos también se las puede escoger observando las características fenotípicas, de tal modo que le correspondan al clon que se va a obtener tras el proceso. Comúnmente se utilizan plantas que han sido propagadas anteriormente, es decir, que se encuentran controladas en un invernadero lo cual mejora el proceso de selección. Generalmente se escogen plantas en estado vigoroso y activo que demuestren un desarrollo sano (Pérez *et al.*, 1998).

1.4.3.2.2 Fase 1: Desinfección de los explantes

En esta etapa se asegura que el explante, ya sea una porción de hoja, yema, segmento nodal o embrión, resista a la contaminación de hongos y bacterias que se encuentran naturalmente en el ambiente (Pérez *et al.*, 1998).

Los explantes deben ser desinfectados superficialmente mediante el uso de sustancias que generalmente han sido soluciones de hipoclorito de sodio y calcio, alcohol, nitrato de plata, peróxido de hidrógeno, entre otros, a diferentes concentraciones y por periodos de tiempo adecuados que se determinan experimentalmente por ensayo y error (Jácome, 2011).

En varias ocasiones la contaminación de los explantes puede persistir debido a la presencia de patógenos endógenos, generalmente se trata de bacterias. En este caso se ha establecido la utilización de antibióticos que aunque no elimine por completo la presencia de las mismas, al no producir su muerte ya que el antibiótico actúa como bacteriostático, puede impedir su reproducción. Una vez que se ha realizado una desinfección adecuada, se procede a procesar los explantes en una cámara que contiene flujo laminar y

mediante el uso de un mechero bunsen se puede ampliar el espectro de protección contra contaminantes ambientales. Es de vital importancia realizar un lavado final con agua estéril, tres o cuatro repeticiones según sea necesario para asegurar la vitalidad de los explantes y no permitir su necrosis por exposición a agentes químicos por tiempo prolongado. Así se asegura la obtención de un cultivo axénico (Castillo, 2005).

La sanidad y viabilidad del material vegetal introducido se puede controlar en un medio de cultivo con un medio de iniciación o medio basal (Pérez *et al.*, 1998).

1.4.3.2.3 Fase 2: Introducción *in vitro* de los explantes

Una vez que se ha logrado obtener explantes en condiciones asépticas, es decir, libres de contaminantes, es importante encontrar un medio de cultivo con la cantidad de nutrientes adecuado para lograr su establecimiento. En esta fase, por lo general, no se requiere de una gran cantidad de reguladores de crecimiento para que se establezca el explante (Castillo, 2005).

Es beneficioso que la planta no se acostumbre a tener nutrimentos innecesarios cuando puede obtenerlos de una formulación simple. Bhalla *et al.*, (2009) han utilizado medios sin fitohormonas en su composición y han logrado el establecimiento adecuado de sus explantes.

Una vez que se tenga a disposición un medio de cultivo adecuado, se procede a realizar cortes del explante hasta obtenerlo de un tamaño y forma deseada para su siembra y posterior desarrollo (Ayala, 2011).

En un periodo de siete a quince días se puede observar el inicio del desarrollo de una nueva planta la cual debe alcanzar características adecuadas, tal como el crecimiento y su coloración para poder pasar a la etapa de multiplicación de brotes (Castillo, 2005).

1.4.3.2.4 Fase 3: Multiplicación de los brotes

En esta fase se determina el número de brotes que se puede obtener una vez que el explante haya sido introducido en un medio de propagación que le brinde todos los nutrientes necesarios para aquello. Además, es en esta fase donde se define la variación somaclonal de los propágulos que se obtienen, es decir, su calidad genética (Pérez *et al.*, 1998).

Una vez que la planta sea transferida a un nuevo medio de cultivo, debe mantener sus condiciones asépticas, de tal modo que se asegura que la planta no presente ningún tipo de contaminación exógena o endógena (Jácome, 2011).

Los brotes en esta fase se pueden obtener a través de yemas axilares, adventicias y también a través de embriogénesis somática. La proliferación de los explantes que fueron establecidos *in vitro* se logra por medio del uso de diferentes reguladores de crecimiento como principal componente del mismo. Al inducir nuevos brotes se obtiene una mayor cantidad de plantas, proceso que se repite hasta que se obtenga la cantidad de propágulos deseados para pasar a la siguiente fase de enraizamiento (Pérez *et al.*, 1998).

El número de subdivisiones que se puede obtener en este proceso, depende de la especie que se está propagando. Es recomendable no realizar demasiados subcultivos ya que puede traer como consecuencia cambios genéticos por acción de las hormonas presentes en el medio (Jácome, 2011).

Por lo general, en esta fase el balance de los reguladores de crecimiento favorece a las citoquininas ya que son necesarias para el proceso de organogénesis. En algunos casos se utiliza pequeñas cantidades de auxinas para estimular el crecimiento del explante (Castillo, 2005).

Este proceso ha sido un poco demorado y con más dificultades en especies perennes por sus características recalcitrantes. La respuesta que se

puede obtener en la fase de multiplicación, depende mucho de la especie y de sus requerimientos, algunas de ellas toman más tiempo para lograr obtener brotes, en otros casos, se los obtiene fácilmente (Pérez *et al.*, 1998).

1.4.3.2.5 Fase 4: Enraizamiento

En esta fase cada brote que fue obtenido en la etapa de multiplicación debe ser manipulado *in vitro* para que desarrolle una o varias raíces que le permitan comenzar con el proceso de obtención de nutrientes para su posterior aclimatización; en esta fase además debe formar un pseudotallo y seguir con su desarrollo en cuanto a crecimiento (Pérez *et al.*, 1998).

En este proceso, las auxinas son necesarias ya que estas hormonas estimulan del desarrollo de raíces. En algunos casos, este proceso se da naturalmente en el medio de multiplicación que se ha establecido en el paso anterior, es por esto que muchas veces se considera estas etapas como simultáneas. En otros casos se pueden desarrollar raíces en un medio de cultivo simple sin necesidad de reguladores de crecimiento, al igual que en la etapa de establecimiento. En algunas experiencias se ha utilizado carbón activado con el fin de proporcionar a la planta un ambiente oscuro simulando las características de la tierra, donde deberán ser establecidas posteriormente; además, las auxinas actúan de mejor manera en oscuridad (Castillo, 2005; Ayala, 2011).

1.4.3.2.6 Fase 5: Aclimatización

En esta fase se adapta a las plantas a un ambiente exterior, con una menor humedad relativa, mayor intensidad luminosa; aunque esto depende de las necesidades de cada especie. En el proceso de aclimatización, la nueva planta pasa de un estado heterótrofo a uno autótrofo. Inicialmente se las puede mantener en contenedores plásticos para evitar la desecación. Así, se estimula las adaptaciones fisiológicas de las plantas necesarias para controlar los factores externos como la pérdida de agua (Marín & Moll, 1997).

Para lograr una adecuada aclimatización se debe tomar en cuenta factores como la carencia de la capacidad fotosintética de las plantas obtenidas *in vitro*, por lo cual a más de manejar la humedad y la iluminación, es necesario tomar en cuenta el tipo de sustrato en el cual será establecido la planta; este debe ser poroso y estéril para fomentar su crecimiento. Adicionalmente el suelo se mezcla con turba, cascarilla de arroz quemado, arena, entre otros, con el fin de permitir la especialización de sus raíces. Estas mezclas suelen variar dependiendo de la especie con la que se esté trabajando (Ayala, 2011).

Una vez que las plantas hayan alcanzado un desarrollo adecuado, se las puede llevar a condiciones de invernadero o campo, tomando en cuenta que aún se pueden encontrar frágiles y que necesitan de un cuidado especial para fortalecerse (Pérez *et al.*, 1998).

Cuando las plantas pasan a ser aclimatizadas se presentan ciertas diferencias respecto al estado en el que se encontraban cuando se manipulaban en laboratorio. *In vivo* las plantas realizan fotosíntesis, crecen en condiciones no controladas, están expuestas a patógenos y gérmenes propios del ambiente, tienen una humedad relativa variable, estomas funcionales (estructuras responsables de regular la transpiración y la pérdida de agua), presentan pelos radiculares y cera en la cutícula. Los cambios que se vayan realizando en esta etapa deben ser graduales de modo que se minimice el estrés y se obtenga una mayor tasa de sobrevivencia (Castillo, 2005).

1.4.3.3 Factores que influyen en la micropropagación

Los factores que influyen en la micropropagación son el explante, la planta donadora y la composición de los medios de cultivo. Existen también factores físicos que afectan en general al proceso del cultivo *in vitro* de las especies vegetales como la temperatura, la luz y la humedad relativa, mencionados anteriormente (Recalde, 2007).

1.4.3.3.1 El explante

Un explante se define como una porción de una planta que será utilizado para iniciar el cultivo de tejidos y pueden ser hojas, segmentos nodales, segmentos apicales, anteras, brotes de yemas, embriones, entre otros (Castillo, 2005).

Su procedencia puede delimitar tanto su disponibilidad como su manipulación. En la mayoría de los casos, se utiliza yemas o meristemos como material de partida. Esto se debe a que, en primer lugar, los meristemos proveen material vegetal libre de virus; sin embargo, a veces su utilización se limita debido a la dificultad de manipulación que pueden presentar por su tamaño (0,2-1 mm), además requiere de un largo periodo de tiempo para desarrollarse. Las yemas o segmentos nodales se utilizan más a menudo por su facilidad de establecimiento y su adecuado crecimiento (Jácome, 2011).

Aparentemente el tamaño del explante no tiene mayor influencia. Si se trata de segmentos nodales, puede realizarse cortes largos o pequeños y se puede obtener la misma respuesta dependiendo de la especie. Un factor de importancia dentro del explante es su edad fisiológica, ya que si el tejido que se va a cultivar se encuentra menos diferenciado va a obtenerse una mejor respuesta *in vitro* (Recalde, 2007; Roca & Mogrinski, 1991).

1.4.3.3.2 La planta donadora o planta madre

La capacidad morfogénica del explante está limitado por el estado fisiológico de la planta madre; los requerimientos nutricionales y hormonales que puede necesitar, dependerán del mismo (Roca & Mogrinski, 1991).

También es importante tomar en cuenta de que porción se toma el explante, ya que se ha encontrado que, en cultivos de rosa, las yemas axilares tomadas de la parte media del tallo se desarrolla con mayor rapidez y vigorosidad que aquellas tomadas de la base o de la porción apical. En

general, si el estado de la planta madre es sano y con características fisiológicas funcionales, se obtendrán plantas genéticamente iguales en buen estado en un corto periodo de tiempo (Jácome, 2011; Recalde, 2007).

1.4.4 Medio de cultivo

1.4.4.1 Generalidades

Las plantas que crecen en la naturaleza tienen tres fuentes esenciales para su nutrición. Los nutrientes minerales los obtienen, junto con el agua, desde el suelo a través del sistema radical. El dióxido de carbono atmosférico es utilizado en el proceso de la fotosíntesis para proveer carbono como fuente básica de energía; por último, el cuerpo de la planta utiliza los carbohidratos y nutrientes para sintetizar las vitaminas y sustancias esenciales para su crecimiento y desarrollo normal (Alva, Menéndez, Oropeza, & Vargas, 2010).

Se han descrito diversas formulaciones de medios de cultivo vegetales que varían en su composición. La más utilizada es la formulación de Murashige y Skoog (1962) -MS- que contiene una cantidad de vitaminas, minerales, carbohidratos y demás sales con el fin de acelerar el crecimiento del explante (ver anexo A). Adicionalmente se han descrito diversos medios que responden a las necesidades de otros tipos de tejidos tal como el Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd and McCown, 1980) que resulta óptimo para las especies leñosas (Roca & Mogrinski, 1991; Marín & Moll, 1997; Castillo, 2005).

1.4.4.2 Composición de los medios de cultivo vegetal

La composición del medio de cultivo variará dependiendo de la especie que se desee propagar *in vitro*. Esto dependerá de sus requerimientos y de las condiciones que se manejan en diferentes laboratorios que de alguna manera pueden dificultarse en su reproducción (Jácome, 2011).

Las sales inorgánicas o elementos minerales son importantes ya que forman parte de moléculas indispensables para su vida, tal como el magnesio,

parte integral de la molécula de clorofila; el calcio es constituyente de la pared celular, el nitrógeno forma parte de las proteínas y ácidos nucleicos. Estas sales minerales pueden requerirse a nivel macro y micro. Los macroelementos indispensables para el desarrollo de las plantas son carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, potasio y magnesio; y los microelementos son hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno (Recalde, 2007).

Es importante tomar en cuenta el objetivo que se desea lograr con una formulación de medio adecuada. Para esto existen medios ricos en sales y pobres en sales que pueden estimular el crecimiento de mejor manera que con el medio preparado de modo convencional (Roca & Mogrinski, 1991).

En los medios, existe además la presencia de vitaminas como el inositol o la tiamina para que se dé un crecimiento normal de la planta. Si bien es cierto que la mayoría de plantas pueden sintetizar casi todas las vitaminas que requieren para su desarrollo, lo hacen en cantidades mínimas. La tiamina (B1) es la vitamina considerada como esencial; entre otras como la piridoxina, pantotenato cálcico, etc. De igual manera, los aminoácidos también son sintetizados por las células vegetales; sin embargo, la adición de una mezcla de los mismos puede resultar beneficiosa. Este aspecto es de relevante importancia para el cultivo de protoplastos (Agrobiotecnología, 2011).

Es indispensable la utilización de una fuente de carbohidratos en el medio ya que muy pocos cultivos son autótrofos. Para esto se coloca sacarosa, generalmente en altas cantidades (30 g.L^{-1}) y representa la fuente de energía y carbono. Puede ser remplazada por el uso de glucosa y en pocas ocasiones por fructosa ya que son menos eficientes (Recalde, 2007).

El pH del medio de cultivo además de regular ciertas reacciones bioquímicas que se dan en las células vegetales en cultivo, determina la disponibilidad de compuestos osmóticos, aunque el mismo puede variar una vez que el medio se haya esterilizado en autoclave (Jácome, 2011).

Los medios de cultivo pueden tener consistencia sólida, semisólida o líquida, esto depende de la adición de un agente gelificante al medio. En el primer caso es común el uso de agar-agar que es soluble en agua a 90 °C y es importante por su grado de pureza. Su concentración, para medios sólidos es de 0,6% a 1,0%. Según la necesidad, se pueden utilizar otros agentes gelificantes como el phytigel que por su característica coloración transparente, permite observar con mayor facilidad la presencia de patógenos, sobretodo bacterias endógenas. En muchos casos, se utiliza medios de cultivo líquidos, en donde el agente gelificante se suprime y en su lugar se colocan puentes de papel filtro para lograr la estabilidad del explante en el mismo (Marín & Moll, 1997; Agrobiotecnología, 2011).

1.4.4.3 Reguladores de crecimiento

La diferencia esencial entre los medios de cultivo consiste en los reguladores de crecimiento que se adicionan al mismo y que en general, son metabolitos secundarios específicos de cada especie que están involucrados en diferentes procesos de desarrollo. Estas fitohormonas actúan a bajas concentraciones e interactúan unas con otras ya que están involucrados en diversos procesos fisiológicos (Agrobiotecnología, 2011; Rivero, 2011).

Los reguladores de crecimiento, como su nombre lo indica, juegan un papel principal en el control del crecimiento tanto a nivel de plantas como a nivel de órganos, tejidos y células. Actúan en los tejidos por medio del transporte a través de vasos xilemáticos o floemáticos. De ellas también depende la caída de las hojas, la floración, la formación de fruto y la germinación (Jácome, 2011).

Los tipos de reguladores de crecimiento que se conocen se dividen en tres grupos principales. En el primero se encuentran los promotores del crecimiento que son las auxinas, las citoquininas y las giberelinas, en el segundo grupo se encuentran los inhibidores de crecimiento que es el ácido abscísico y por último el etileno que interviene en fenómenos como la inducción de la floración (Lozano, 2011).

1.4.4.3.1 Auxinas

Las *auxinas* son el grupo de reguladores de crecimiento más conocido, derivadas del aminoácido triptófano que se sintetizan en los ápices de los brotes y en las raíces y se transportan por medio del floema. Cuando se adicionan en cantidades adecuadas, pueden regular la elongación celular, la división celular, la formación de raíces adventicias y puede inducir a la embriogénesis. También son las responsables de los tropismos (Calva, 2005; Agrobiotecnología, 2011; Rivero, 2011).

Aún se desconoce como actúan realmente las auxinas en la formación de raíces laterales y adventicias, aunque se sabe que puede darse debido a la intervención de factores vinculados con la nutrición. (Pérez *et al.*, 1998).

Las auxinas más utilizadas en los medios de cultivo vegetales pueden ser sintéticas como el ácido indol butírico (AIB), ácido naftalen acético (ANA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); o naturales como el ácido indol acético (AIA) y sus derivados como el ácido fenil acético. (Agrobiotecnología, 2011; Rivero, 2011).

Generalmente se utiliza una auxina por ensayo, en cantidades variables dependiendo de la especie vegetal; sin embargo, se ha reportado el uso de dos auxinas simultáneamente, resultando comportamientos positivos debido al lugar de acción de las mismas (Lozano, 2011).

1.4.4.3.2 Citoquininas

Las *citoquininas* son sustancias derivadas de las purinas que se sintetizan en los meristemos apicales de la raíz, hojas en desarrollo y en embriones jóvenes y se transportan a los brotes a través del xilema. Pueden regular la división celular, estimular la formación de brotes axilares y adventicios, regular la diferenciación, inhibir la formación de raíces y estimular la actividad de enzimas y proteínas. También regulan la formación y desarrollo

del tallo. Pueden regular la síntesis de pigmentos fotosintéticos, detienen la caída de hojas, retrasan el envejecimiento y la muerte de órganos (Lozano, 2011).

Las citoquininas más utilizadas son sintéticas como la kinetina (KIN) y la 6-bencilaminopurina (BAP), una de las citoquininas más activas; o naturales como la zeatina (ZEA) y la isopentiladenina (2iP) (Jácome, 2011).

El establecimiento del explante en un medio con concentraciones adecuadas de reguladores de crecimiento, especialmente auxinas y citoquininas, permitirá su desarrollo de forma directa y su posterior multiplicación obteniéndose como resultado plantas vigorosas (Quintero, 1993; Toledo *et al.*, 1998; Gómez & García, 2006).

El equilibrio entre las auxinas y las citoquininas rigen la diferenciación de un tejido *in vitro*. Así, al mantener más concentración de auxinas predominará la formación de raíces y, por el contrario, si se mantienen altas las concentraciones de citoquininas respecto a las auxinas, se dará lugar a la formación de brotes. (Marín & Moll, 1997; Calva, 2005; Agrobiotecnología, 2011).

1.4.4.3.3 Giberelinas

Las *giberelinas* se forman por diterpenos y son utilizadas raramente en el cultivo de tejidos. Son producidas en los ápices de los tallos y son conducidos por medio del floema. Se utilizan para promover la floración, romper la dormancia de semillas, yemas y bulbos; y para la elongación celular. Por lo general inhiben la formación de raíces y vástagos adventicios. Pueden inducir la actividad del cambium en algunos árboles de climas templados para que broten en primavera. También son responsables de la geminación de semillas ya que cuando estas toman agua estimulan la acción de la amilasa que forma la glucosa, su aumento provoca la síntesis de giberelina y el consecuente desarrollo de un embrión para dar lugar a una nueva planta. Las

giberelinas más comunes son AG₁, AG₃, AG₄, AG₇ y AG₉ (Jácome, 2011; Rivero, 2011).

1.4.4.3.4 Etileno y ácido abscísico

El *etileno* estimula la maduración de frutos y la senescencia de flores y hojas. También promueve el crecimiento lateral, importante durante la germinación aunque reduce la velocidad de elongación de las células (Rivero, 2011).

El *ácido abscísico* (ABA) en la mayoría de los casos, produce un efecto negativo en el cultivo de tejidos ya que puede inhibir la acción de las auxinas, giberelinas y citoquininas actuando como una defensa natural contra el estrés fisiológico. Esto se puede dar debido a que su acción provoca el cierre de estomas. En algunos casos promueve la maduración de embriones y cuando se realizan suspensiones facilita la sincronización celular (Recalde, 2007).

1.4.4.4 Condiciones de cultivo

El establecimiento y crecimiento exitoso de un tejido vegetal *in vitro*, generalmente esta determinado por la naturaleza del explante, la composición del medio nutritivo y varios factores ambientales (luz, temperatura, humedad); sin embargo existen pasos primordiales que hay que tomar en cuenta para producir una planta por métodos de propagación *in vitro* (Pérez *et al.*, 1998).

El medio de cultivo permite que la planta obtenga los nutrientes necesarios para su crecimiento, las condiciones físicas y químicas lo mantienen bajo entornos óptimos, no obstante esto no se puede lograr si no se ha establecido un cultivo aséptico libre de contaminación de todo tipo. Es por esto que la obtención de un tejido libre de patógenos es el paso principal como condición de cultivo a ser tomado en cuenta (Pérez *et al.*, 1998).

1.4.4.4.1 Obtención de plantas libres de patógenos

La obtención de plantas libres de patógenos ha sido considerada como la primera aplicación práctica que se le ha dado al cultivo de tejidos. Esto se demostró mediante el cultivo de meristemos de diversas plantas ya que son tejidos que al estar en la parte interna de la misma no sufre de las infecciones que puede tener la planta en general. La presencia de este tipo de enfermedades puede afectar seriamente a la producción, por lo cual ha sido un avance para aumentar el rendimiento en cuanto a explotación comercial. Además se puede decir que la descontaminación del material vegetal es la base de la práctica del cultivo ya que mediante esto se permite el posterior establecimiento sano de los explantes en los medios de cultivo adecuados (Segretín, 2009).

Muchas veces no se puede lograr una desinfección completa de una planta por lo cual se debe recurrir a otro tipo de saneamientos tal como el uso de antibióticos o termoterapias (Pérez *et al.*, 1998).

Se considera a este hecho como una condición importante para el desarrollo del cultivo de tejidos ya que si no se obtuvieran plantas sanas, no existiría una real aplicación de la propagación masiva, de modo que sea rentable para una biofábrica o para comercialización de las mismas (Pérez *et al.*, 1998).

1.5 Sistema de hipótesis

Existe un protocolo de propagación *in vitro* de cucarda (*Hibiscus rosa-sinensis*) a partir de segmentos nodales, a ser utilizado como parte de la estrategia de reforestación del espacio público del Distrito Metropolitano de Quito.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El desarrollo del presente proyecto de investigación contó con el apoyo de las siguientes instituciones y personas.

2.1.1 Instituciones

Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas del Distrito Metropolitano de Quito EPMMOP-Q.

Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Unidad de Espacio Público (UEP) del Municipio de Quito.

Escuela Politécnica del Ejército

2.2.2 Personas

Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Unidad de Espacio Público (UEP) del Municipio de Quito

Ing. Cristian Reyes, MSc. Jefe del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Unidad de Espacio Público

Ing. Lorena Oña. Asistente de investigación

Andrea González. Encargada del área de producción

Escuela Politécnica del Ejército

Ing. Tatiana Páez, MC. Directora de Tesis

Jaime F. Gía, MSc. Codirector de Tesis

2.2 Fase de campo

2.2.1 Ubicación geográfica del vivero

En las instalaciones de la EPMMOP-Q se cuenta con un vivero situado al nororiente del Distrito Metropolitano de Quito, sector Cununyacu con latitud $0^{\circ} 17' 44''$ S y longitud $78^{\circ} 27' 85''$ W a una altura de 2300 m.s.n.m. La zona tiene temperaturas medias anuales de 17.7°C y se encuentra al costado del Río San Pedro. Cuenta además con un banco de semillas y un reservorio para el agua de riego (Ayala, 2011, Cárdenas, 2011).

2.2.2 Plantas madre del vivero

Las plantas “madre” de cucarda que se escogieron para llevar a cabo el presente estudio, pertenecen al vivero de Cununyacu de la EPMMOP-Q y son especies de alrededor de tres años de edad (Figura 2.1).

Estas plantas ubicadas por lotes son protegidas de ciertas condiciones ambientales tal como lluvia, vientos y sequía mediante una malla de sombreado. El material plástico utilizado se denomina sarán cuyo espesor permitía el paso del 50 al 60% de intensidad de luz.

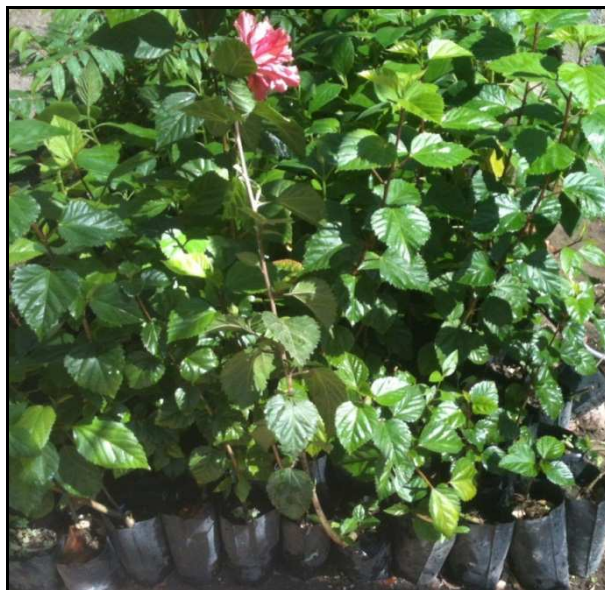


Figura 2.1 Plantas madre de cucarda presentes en el vivero de la EPMMOP-Q

2.2.3 Tratamiento preliminar

Con el fin de obtener material de partida óptimo, se realizó un tratamiento de las plantas donadoras de explantes. Los tratamientos fitosanitarios se realizaron durante el primer mes, cada semana, con un compuesto denominado Talón, un fungicida agrícola cuyos ingredientes activos son mancozeb y metalaxyl, y su dosis es de 1 g.L^{-1} .

Se eliminó la presencia de la mayoría de agentes patógenos durante los siguientes meses mediante el uso del fungicida Fegadazin, su ingrediente activo es carbendazim y se lo coloca a razón de 1 mL.L^{-1} . La aplicación del mismo se realizó cada 15 días mediante aspersion entre las 8 y las 9 de la mañana.

2.2.4 Recolección del material vegetal de partida

La recolección del material vegetal se realizó según la metodología mencionada por Bhalla *et al.* (2009); se escogieron plantas maduras, no adultas, de alrededor de tres años de edad, que presentan características fenotípicas similares como la vigorosidad en sus flores de pétalos dobles y en sus hojas. La escisión de los explantes se realizó cuando el tallo presentaba coloración café clara, en su etapa de maduración menos lignificada.

2.2.4.1 Procesamiento de los explantes

Una vez recogido el material vegetal de partida, se procedió al procesamiento de los explantes mediante cortes de tamaños adecuados con el fin de que resistan el posterior proceso de desinfección.

En primer lugar se cortó todas las hojas presentes incluyendo aquellas que estaban por crecer alrededor de las yemas axilares; sin embargo, no se cortó completamente el peciolo ya que este permitió una mejor resistencia de los explantes al proceso de desinfección. Los segmentos nodales fueron separados mediante cortes transversales en la parte superior e inferior de

modo que presentaban un tamaño de 3 cm (Figura 2.2). En este proceso se utilizó tijeras de disección sumergidas previamente en alcohol al 70% para evitar contaminación debida a diferentes fuentes externas.



Figura 2.2 Forma y tamaño de los segmentos nodales para iniciar la etapa de desinfección

2.3 Fase de laboratorio

2.3.1 Ubicación geográfica del laboratorio

El proyecto de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Unidad de Espacio Público del Municipio de Quito, ubicado en la provincia de Pichincha, Distrito Metropolitano de Quito, parroquia Cumbayá, sector Cununyacu, vía Intervalles Km 2 ½; a una altitud de 2300 m.s.n.m., en las coordenadas 0° 13' 59" S de latitud y 78° 25' 70" W de longitud.

2.3.2 Periodo de investigación

Fecha de inicio: 1 de febrero de 2012

Fecha de término: 10 de noviembre de 2012

2.3.3 Ensayos preliminares

Para iniciar el protocolo de propagación *in vitro* de cucarda, se llevó a cabo ensayos preliminares que permitieron escoger el tipo de explante con el

que se trabajó durante toda la investigación; así como también se determinaron las limitantes de la especie *Hibiscus rosa-sinensis* (Figura 2.3).

Se tomó 10 segmentos apicales y 10 segmentos nodales, los cuales fueron cultivados en un medio MS sin reguladores de crecimiento con el fin de observar su respuesta fisiológica.

Una vez escogido el mejor tipo de explante, se realizó un análisis del crecimiento de los segmentos ubicados en las partes altas y bajas de cada tallo de cucarda, así se pudo conocer cuales de ellos poseen mejor respuesta al cultivo *in vitro*.

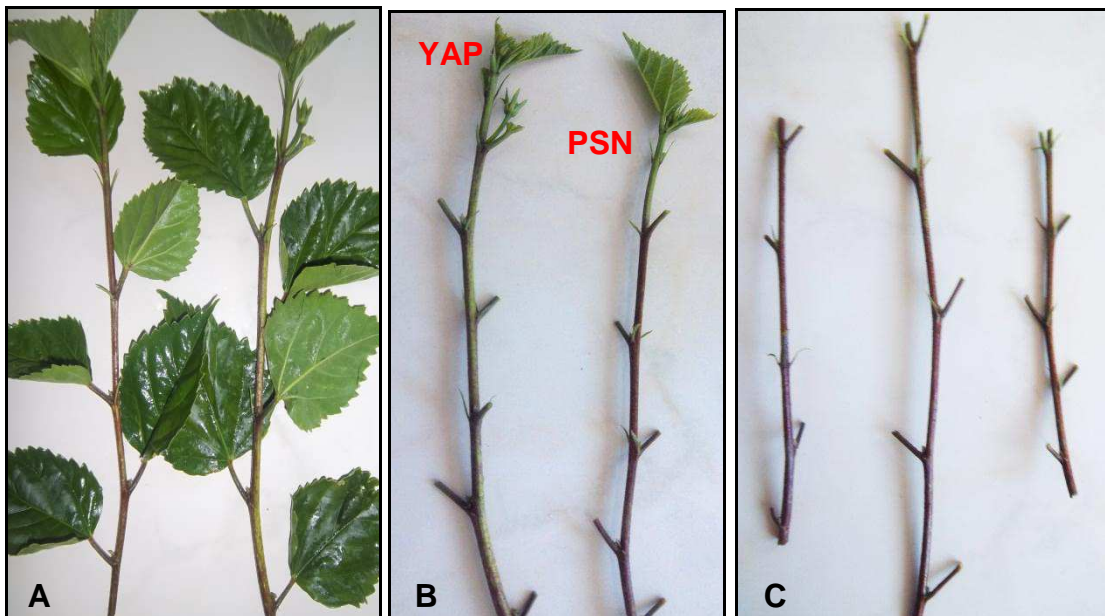


Figura 2. 3 A. Tallos de cucarda **B.** Yema apical (YAP) y primer segmento nodal (PSN) descartados **C.** Segmentos nodales utilizados en el proyecto

2.3.4 Desinfección de los explantes

Para iniciar el protocolo de propagación *in vitro* de cucarda, se estableció el método óptimo de desinfección para sus explantes. Se depositaron alrededor de 20 a 25 segmentos nodales en vasos de precipitación (Fisherbrand). Se utilizó una solución con tres gramos de detergente y tres gotas de Tween 20 (SIGMA ULTRA) disueltos en agua potable y fueron mantenidos en agitación

durante treinta minutos en un agitador magnético (Innova 2100). Esto se realizó con el fin de retirar todas las impurezas externas como polvo y tierra.

Posteriormente, se eliminó el detergente con agua corriente y, en la cámara de flujo laminar (STREAMLINE®), se realizó un primer lavado con cloro, cuyo contenido de hipoclorito de sodio (NaClO) es del 5%, a diferentes concentraciones durante 10 minutos. Los tratamientos realizados se detallan en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Tratamientos realizados en la fase de desinfección de los explantes de cucarda

Tratamiento	Concentración cloro (%)
T1	25
T2	30
T3	40
T4	50
T5	60

Luego se llevó a cabo un lavado con alcohol al 70% durante 30 segundos (Christensen, Sriskandarajah, Serek, & Muller, 2008; Bhalla, Abdullah, Sreeramanan, & Karuthan, 2009).

Para eliminar la mayor cantidad de contaminantes bacterianos y fúngicos, se realizó un segundo lavado en las mismas concentraciones de cloro realizadas anteriormente, detalladas en la tabla 2.1 durante 10 minutos.

Para finalizar la etapa de desinfección de los explantes de cucarda, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, cada lavado en agua se efectuó durante cinco minutos (Ayadi *et al.*, 2011).

En esta etapa los explantes fueron sembrados en un medio de cultivo con las sales y vitaminas descritas por Murashige y Skoog (1962) -MS- suplementado con 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 7 g.L⁻¹ de agar (SIGMA).

Posteriormente, los medios de cultivo fueron ajustados a un pH de 5.8 ± 0.2 (pH-Meter JENWAY) y luego fueron dispensados en tubos de ensayo (IVA) de 16 x 1.6 cm. Finalmente, fueron esterilizados en autoclave horizontal (Tuttnauer 2540M) a 121°C durante 25 minutos (Jácome, 2011)

De forma aséptica, dichos explantes fueron sembrados en una cámara de flujo laminar con material esterilizado previamente en autoclave horizontal (Figura 2.4). Para este propósito, pinzas y mangos de bisturí fueron envueltos en papel aluminio junto con papel servilleta y papel Kraft.

Los explantes cultivados fueron mantenidos en un cuarto de cultivo que se encontraba a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante 21 días (Roca & Mogrinski, 1991).

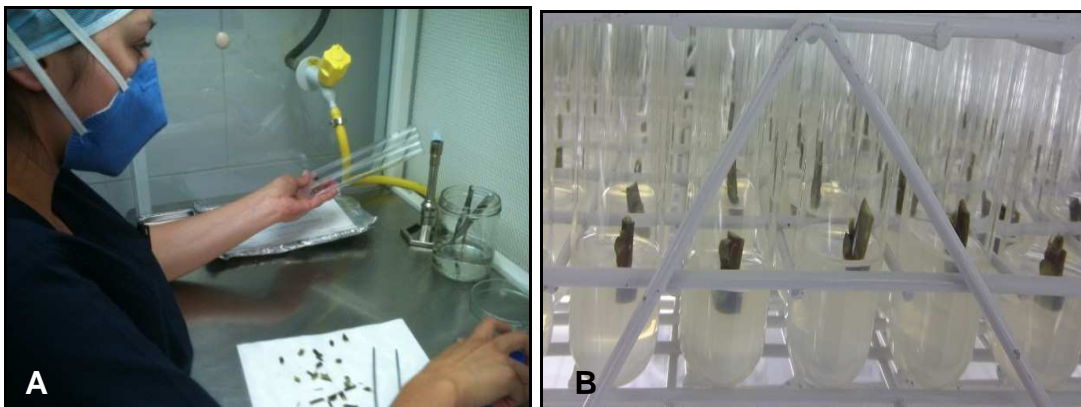


Figura 2.4 A. Cultivo de segmentos nodales de cucarda en condiciones axénicas **B.** Segmentos nodales de cucarda en condiciones *in vitro*

Para esta fase del protocolo de propagación *in vitro* de cucarda se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de contaminación, porcentaje de necrosamiento, porcentaje de oxidación y porcentaje de viabilidad. Estas variables fueron analizadas cada siete días y se presentaron sus valores porcentuales de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Contaminación} = \frac{\text{Explantes contaminados} * 100}{\text{Total de explantes}}$$

$$\% \text{ Necrosamiento} = \frac{\text{Explantos necrosados} * 100}{\text{Total de explantes}}$$

$$\% \text{ Oxidación} = \frac{\text{Explantos oxidados} * 100}{\text{Total de explantes}}$$

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Explantos viables} * 100}{\text{Total de explantes}}$$

El mejor tratamiento fue seleccionado en base a los resultados obtenidos y se realizó en el marco de un *diseño experimental completamente al azar* (DCA) en el cual se consideraron diez repeticiones. Se realizaron gráficas y tablas de frecuencias para las variables mencionadas anteriormente, además gráficas de crecimiento debido a la concentración de cloro utilizada.

2.3.5 Establecimiento *in vitro* de los explantes

Una vez que se determinó el mejor tratamiento de desinfección de explantes de cucarda, de acuerdo al mayor porcentaje de viabilidad, se determinó el mejor medio de cultivo para su establecimiento. En esta etapa se utilizaron diferentes concentraciones de citoquinina BAP.

Dentro de la cámara de flujo laminar, en condiciones asépticas, se llevó a cabo el corte de los explantes y la desinfección más apropiada para los mismos.

Se probó el efecto de diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento de explantes de cucarda; los medios que se ensayaron fueron: medio con las sales y vitaminas MS, medio con las sales y vitaminas MS a la mitad de su concentración normal, medio con las sales MS más las vitaminas de Gamborg y un medio con las sales MS más las vitaminas de Gamborg a la mitad de su concentración normal (MSVG - 1968).

Se tomó como control del ensayo de establecimiento, el medio MS sin reguladores de crecimiento. Las concentraciones de BAP, en mg.L^{-1} , que se utilizó se detallan en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Tratamientos realizados en la fase de establecimiento *in vitro* de los explantes de cucarda

Medio de cultivo	Concentración de BAP (mg.L ⁻¹)			
	0	0,1	0,3	0,5
MS	T1	T2	T3	T4
MS ½	T5	T6	T7	T8
MSVG	T9	T10	T11	T12
MSVG ½	T13	T14	T15	T16

De este modo, se evaluó el mejor medio de cultivo de introducción y el efecto del BAP sobre el crecimiento de los segmentos nodales de cucarda.

Para la preparación de los medios de cultivo en esta fase se utilizaron las sales y vitaminas que correspondían a cada tratamiento, más diferentes concentraciones de BAP (Tabla 2.2), 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 7 g.L⁻¹ de agar. Los medios de cultivo fueron ajustados a un pH de 5.8 ± 0.2. Se dispensó el medio de cultivo en tubos de ensayo de 16 x 1.6 cm. Finalmente, fueron esterilizados en autoclave horizontal a 121 °C durante 25 minutos (Jácome, 2011).

Los explantes cultivados fueron mantenidos en un cuarto de cultivo que se encontraba a 25 °C ± 2 °C y con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad durante 21 días (Roca & Mogrinski, 1991)

Todos los materiales utilizados durante esta fase fueron esterilizados en autoclave horizontal a 121 °C durante 25 minutos.

Las variables que se evaluaron en esta fase fueron: longitud de brotes basales por explante, porcentaje de viabilidad de los explantes, además se analizó la coloración de las hojas nuevas obtenidas y los cambios del explante inicial que dio lugar a la formación del tallo de la planta nueva.

La longitud de los brotes fue medida con una regla milimetrada desde la inserción de los brotes hasta su base. Este procedimiento se llevó a cabo cada

siete días con el fin de observar los cambios graduales que se dan por cada tratamiento.

La selección del mejor tratamiento se realizó en base a los resultados obtenidos en un *diseño experimental de bloques completamente al azar* (DBCA) en el cual se consideraron diez repeticiones por tratamiento. Se llevó a cabo gráficas de crecimiento de los brotes y análisis de varianzas de las variables mencionadas. Además se realizó un análisis acerca de la coloración de las hojas, la formación de callo y una comparación, mediante análisis de varianza y modelos mixtos (LSD Fisher), de todos los medios de cultivo utilizados.

2.3.6 Multiplicación *in vitro* de los explantes

Para llevar a cabo la fase de multiplicación, se tomó cada explante que se encontraba en los tubos de ensayo de 16 x 1.6 cm, bajo condiciones asépticas, dentro de la cámara de flujo laminar.

Se obtuvieron brotes apicales de hasta 3 cm que fueron inoculados en los diferentes medios de cultivo (Figura 2.5 A, B). Los brotes fueron sumergidos en una solución de alcohol al 70% durante 10 s, para evitar la contaminación por manipulación y la pérdida de material.

Para la preparación de los medios de cultivo en esta fase se utilizó medio MS adicionado con vitaminas MS, reguladores de crecimiento BAP y AIA en diferentes concentraciones (Tabla 2.3), 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 7 g.L⁻¹ de agar; además los medios de cultivo fueron suplementados con concentraciones constantes de AG₃ (6,67 mg.L⁻¹) y de carbón activado (0,2 g.L⁻¹) como se muestra en la tabla 2.3.

Los medios de cultivo utilizados fueron ajustados a un pH de 5.8 ± 0.2 y posteriormente fueron esterilizados en autoclave vertical (TRIDENT EA-632) a 121 °C durante 25 minutos (Jácome, 2011).

La adición de AG₃ al medio de cultivo se realizó en cámara de flujo laminar una vez que éstos fueron desinfectados en autoclave ya que se trata de un regulador de crecimiento termolábil por lo que su efecto podía inhibirse en el proceso de esterilización. Para lograr la esterilidad del AG₃ se lo filtró dos veces con filtros (Whatman) de 0,2 µm y se almacenó en una refrigeradora (Milgusvac) a 4 °C.

Tabla 2.3 Tratamientos realizados en la fase de multiplicación *in vitro* de los explantes de cucarda

Medio de cultivo	Concentración de BAP (mg.L ⁻¹)	Concentración de AIA (mg.L ⁻¹)			
		0	0,01	0,02	0,03
MS + Vitaminas MS	0	T1	T2	T3	T4
	0,5	T5	T6	T7	T8
	0,8	T9	T10	T11	T12
	1	T13	T14	T15	T16
	1,5	T17	T18	T19	T20

Para cada tratamiento se agregó 6,67 mg.L⁻¹ de AG₃ y 0,2 g.L⁻¹ de carbón activado

Bajo condiciones asépticas, se colocó las yemas axilares obtenidas en la etapa de establecimiento en dichos frascos con el fin de obtener más brotes de cada uno de ellos.

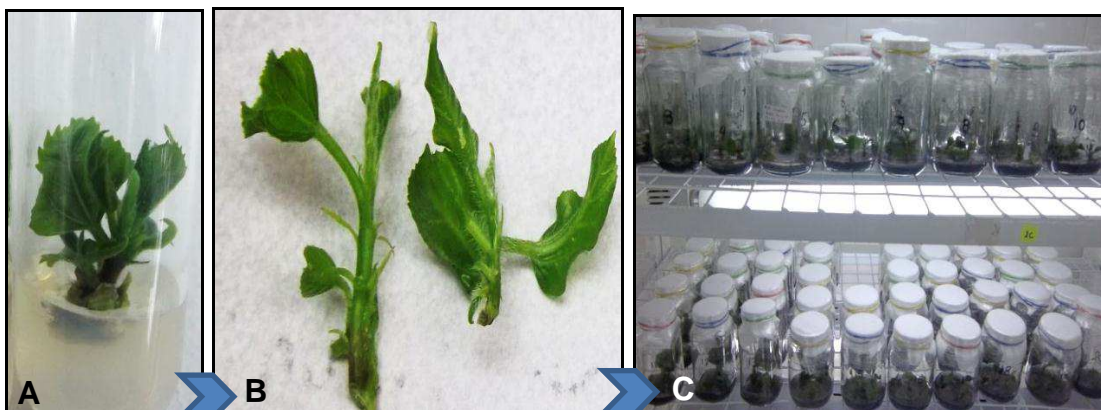


Figura 2.5 A. Plántula establecida B. Remoción del explante inicial C. Incubación de plántulas establecidas en frascos de vidrio. Fase de multiplicación

Los frascos fueron sellados mediante el uso de una capa fina de plástico con pequeños agujeros y cuatro capas de gasa. Luego fueron sujetados con el uso de bandas elásticas y plástico alrededor (Figura 2.5 C). Este procedimiento se siguió como método físico de eliminación de etileno de la planta para evitar su necrosamiento. Tradicionalmente se utiliza papel aluminio para sellar los frascos (ver anexo N parte E).

Los explantes cultivados fueron mantenidos en un cuarto de cultivo que se encontraba a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad durante 30 días (Roca & Mogrinski, 1991).

Todos los materiales utilizados para trabajar en la cámara de flujo durante esta fase fueron esterilizados en autoclave horizontal a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 25 minutos.

Las variables que se evaluaron en esta fase fueron: número de brotes obtenidos, índice de propagación y porcentaje de inducción de brotes múltiples. El índice de propagación y el porcentaje de inducción de brotes múltiples se determinaron con las siguientes fórmulas:

$$\text{Índice de propagación} = \frac{\sum \text{No. de brotes totales}}{\text{No. exp. iniciales}}$$

$$\% \text{ de inducción de brotes múltiples} = \frac{\text{No. exp. con brotes}}{\text{Todos los exp.}} * 100$$

También se analizó el aspecto físico de las plantas nuevas tal como su coloración y morfología. El mejor tratamiento fue seleccionado en base a los resultados obtenidos y se realizó dentro del marco de un *diseño experimental factorial mixto* con dos factores y diez repeticiones $(5 \times 4) + 10$. Además se llevó a cabo un estudio del número de brotes obtenidos mediante un análisis de varianza de Kruskal Wallis.

De esta forma se investigó el efecto de los reguladores de crecimiento que favorecieron a la propagación *in vitro* adecuada de *Hibiscus rosa-sinensis*, para su posterior enraizamiento.

2.3.7 Enraizamiento de los explantes

Dentro de la cámara de flujo laminar, de forma aséptica, se tomó cada uno de las plántulas regeneradas que se encontraban en cada frasco y se las cortó en sus bases con el fin de separarlas del explante inicial (Figura 2.6 A, B). Al igual que en la etapa anterior, se los sumergió en una solución de alcohol al 70% durante 10 s y posteriormente fueron transferidos a un medio de cultivo apto para el enraizamiento.

Dichas plántulas fueron cultivadas en un medio de cultivo MS adicionado con vitaminas MS, 30 g.L⁻¹ de sacarosa en el primer caso, y 20 g.L⁻¹ de sacarosa en el segundo caso. Además los medios contenían 7 g.L⁻¹ de agar (Figura 2.6). Estos medios fueron suplementados con diferentes concentraciones de AIB y una cantidad constante de carbón activado (1 g.L⁻¹) como se muestra a continuación en la tabla 2.4.

Tabla 2.4 Tratamientos realizados en la fase de enraizamiento de los explantes de cucarda

Medio de cultivo	Concentración de AIB (mg.L ⁻¹)				
	0	0,5	1	1,5	2
MS + 30 g.L ⁻¹ sacarosa	T1	T2	T3	T4	T5
MS + 20 g.L ⁻¹ sacarosa	T6	T7	T8	T9	T10

Para cada tratamiento se agregó 1 g.L⁻¹ de carbón activado

Los medios de cultivo utilizados fueron ajustados a un pH de 5.8 ± 0.2 y posteriormente dispensados en tubos de ensayo de 16 x 1.6 cm. Cada tubo de ensayo contenía 20 mL de medio de cultivo MS. Finalmente, fueron esterilizados en autoclave horizontal a 121 °C durante 40 minutos (Jácome, 2011).

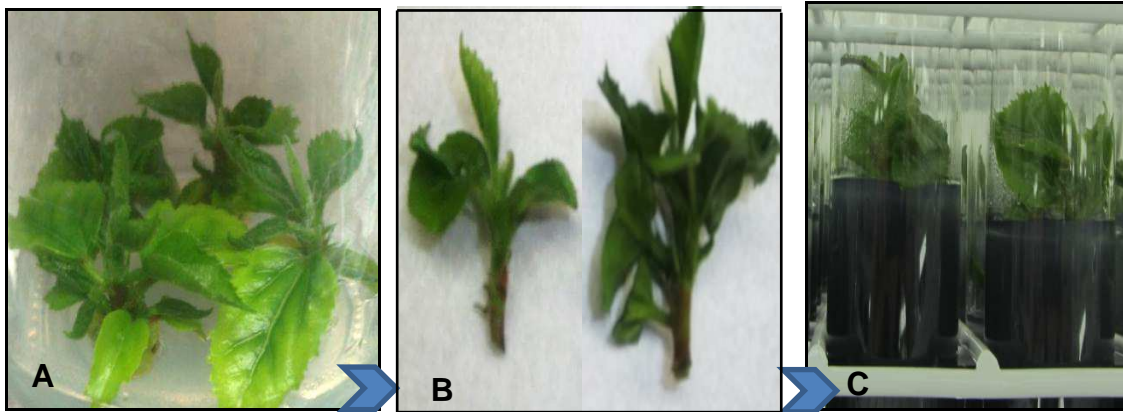


Figura 2.6 A. Plántulas de cucarda obtenidas de la etapa de propagación B. Separación de las plántulas C. Plántulas en medio de enraizamiento

Las variables analizadas en este proceso fueron: contaminación y viabilidad de los explantes, porcentaje de plántulas enraizadas en cada tratamiento, tiempo en el cual empezaron a enraizar. Finalmente se evaluó a los explantes mediante las categorías planteadas, como se puede observar en la figura 2.7.

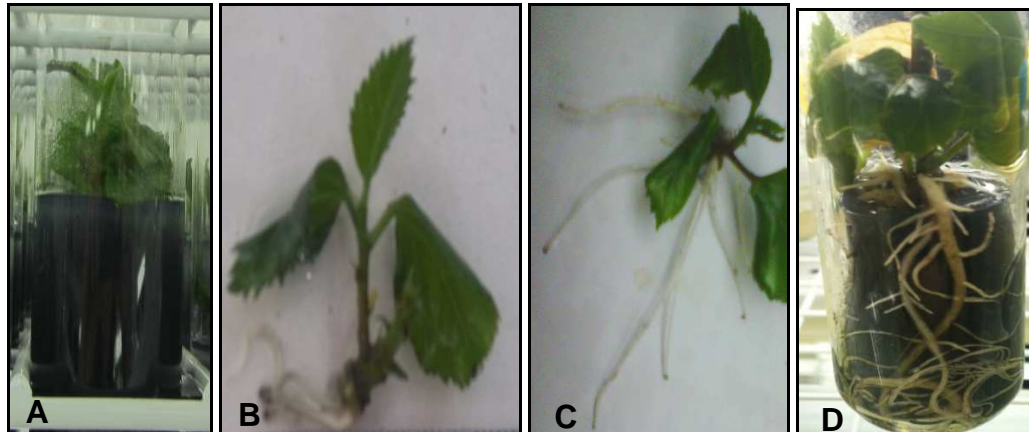


Figura 2.7 Categorías según la aparición de raíz A. Sin raíz B. Escasa raíz C. Moderada presencia de raíz D. Abundante raíz

El mejor tratamiento fue seleccionado en base a los resultados obtenidos y se realizó un *diseño experimental de bloques completamente al azar* con diez repeticiones. De esta forma se determinó el efecto de los reguladores de crecimiento que favorecieron al enraizamiento de las plántulas obtenidas de cucarda y el efecto del carbón activado en su desarrollo.

2.3.8 Análisis de datos

En cada uno de los análisis de variables categóricas y cuantitativas realizados en las etapas de la propagación *in vitro* de cucarda (*Hibiscus rosa-sinensis*), tal como la coloración y morfología de las hojas y del tallo, así como la longitud de los brotes obtenidos; se evaluaron mediante análisis de varianzas no paramétrico de Kruskal Wallis con el fin de determinar diferencias significativas entre los tratamientos ensayados. También se llevó a cabo análisis por modelos mixtos (LSD Fisher). Se realizó el análisis de varianzas para los casos presentados utilizando los paquetes estadísticos Infostat y R.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Ensayos preliminares

En esta etapa se determinó el tipo de explante a ser utilizado en el presente proyecto mediante un gráfico de frecuencias de los resultados obtenidos en cuanto a viabilidad de los mismos. Para su efecto, en primer lugar se evaluó segmentos nodales y segmentos apicales.

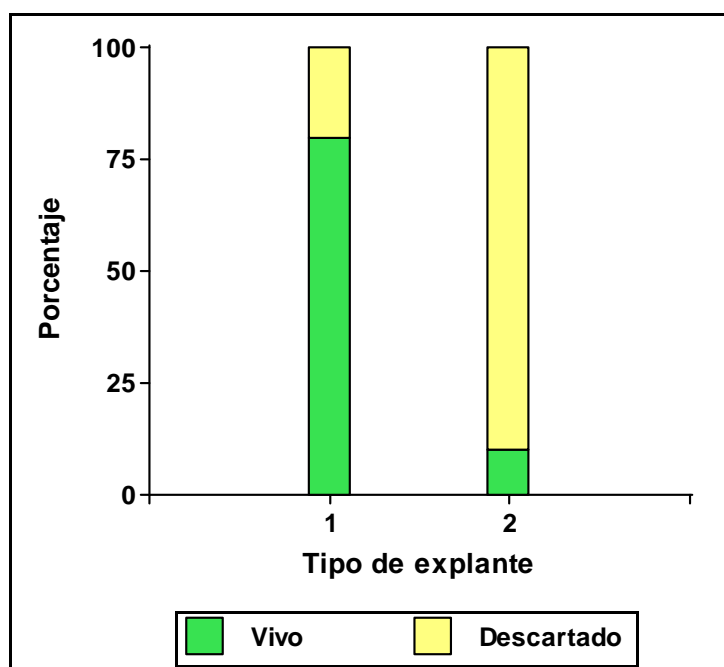


Figura 3.1 Viabilidad y descarte de yemas axilares y segmentos nodales por oxidación

En la figura 3.1, el tipo de explante 1 se refiere a los segmentos nodales y el tipo de explante 2 se refiere a las yemas apicales. Las últimas presentaron un alto porcentaje de oxidación (90%), razón por la cual fueron descartadas del presente estudio; por otro lado, los segmentos nodales presentan una alta viabilidad (80%), por lo tanto son aptos para continuar con el protocolo de propagación de *Hibiscus rosa-sinensis*.

En cuanto al crecimiento de los explantes, se escogió hasta el quinto segmento nodal, para ser introducidos *in vitro*, con el fin de obtener una población con menor asincronía celular ya que en estos segmentos existe una mayor actividad celular que en los segmentos ubicados en la parte más baja de cada tallo del arbusto. El 100% de los explantes ubicados en las partes más lignificadas del tallo del arbusto no tuvo un crecimiento adecuado y por consiguiente presentaron necrosis.

3.2 Desinfección de los explantes

3.2.1 Contaminación y viabilidad de los explantes

En la etapa de desinfección se evaluó la contaminación, necrosis, oxidación y viabilidad de los explantes mediante la aplicación de diferentes concentraciones de cloro (25%, 30%, 40%, 50%, 60%), dando lugar a cinco tratamientos diferentes (Tabla 3.1).

Mediante evaluaciones semanales, durante 21 días, se determinó las pérdidas por los factores mencionados anteriormente y consecuentemente el descarte de los explantes; así como la viabilidad para cada tratamiento (ver anexo M parte A).

Tabla 3.1 Resultados obtenidos en la fase de desinfección de los explantes de cucarda (*Hibiscus rosa-sinensis*)

Concentración de cloro	Frecuencia (%)			
	Explantes viables	Explantes contaminados	Explantes necrosados	Explantes oxidados
25% (T1)	70	30	0	0
30% (T2)	90	10	0	0
40% (T3)	60	30	10	0
50% (T4)	50	10	40	0
60% (T5)	40	10	20	30

Como se puede observar en la tabla 3.1, el mejor tratamiento para la desinfección de los explantes es la aplicación de cloro al 30% (T2) ya que

permite obtener un 90% de viabilidad de los explantes y no provoca necrosamiento ni oxidación de los mismos.

Los tratamientos T1 y T3 presentan el mayor porcentaje de contaminación. De igual manera, los tratamientos T4 y T5 presentan un bajo porcentaje de contaminación; sin embargo, sus porcentajes de necrosis y oxidación se incrementan respecto a los tratamientos anteriores.

En la figura 3.2 se puede observar los resultados obtenidos en cuanto a las variables evaluadas para cada tratamiento.

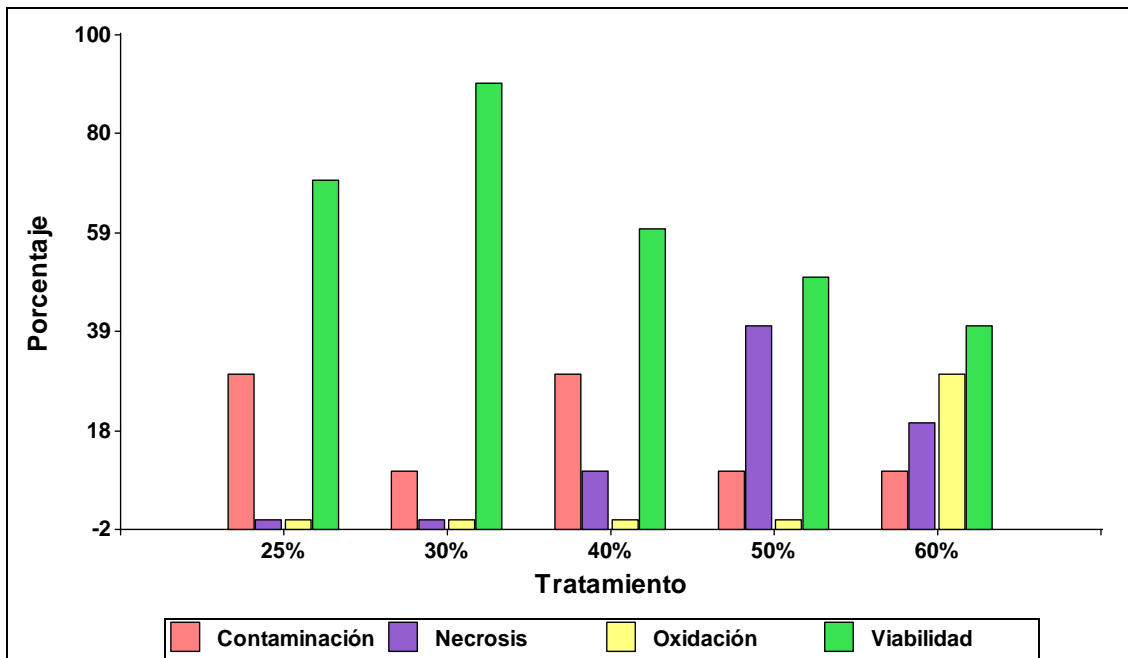


Figura 3.2 Porcentajes de contaminación, necrosis, oxidación y viabilidad de los explantes para cada tratamiento

Los resultados obtenidos de la respuesta *in vitro* de los explantes fueron evaluados mediante un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis ya que los datos no presentaron normalidad (ver anexo B). Para la variable de viabilidad el valor p de la prueba no resultó significativo (0,0896). Un resultado similar ocurrió para la variable de contaminación que tampoco presentó significancia (0,0667). Por otro lado, la variable de necrosis resultó ser

significativa para la desinfección de los explantes (0,0012) al igual que la variable de oxidación (0,0162).

3.2.2 Efecto del uso de cloro en el crecimiento de los explantes

Debido a que se obtuvieron resultados significativos para la necrosis de los explantes, se observó el efecto provocado por las concentraciones de cloro en el crecimiento de las plántulas. En la tabla 3.2 se puede observar las medias de los crecimientos de los explantes a lo largo de 21 días por cada tratamiento.

Tabla 3.2 Medias de los crecimientos de los explantes de cucarda

Tratamiento	Semanas		
	1	2	3
25% Cl	0,24	0,63	1,69
30% Cl	0,22	0,81	1,2
40% Cl	0,07	1,23	1,26
50% Cl	0,06	0,18	0,62
60% Cl	0,01	0,04	0,97

Para el primer tratamiento los explantes alcanzan el mayor crecimiento; para el segundo y el tercer tratamiento la longitud es similar y para el cuarto y quinto tratamiento se da un notable decrecimiento de los explantes; tal como se aprecia en la figura 3.3.

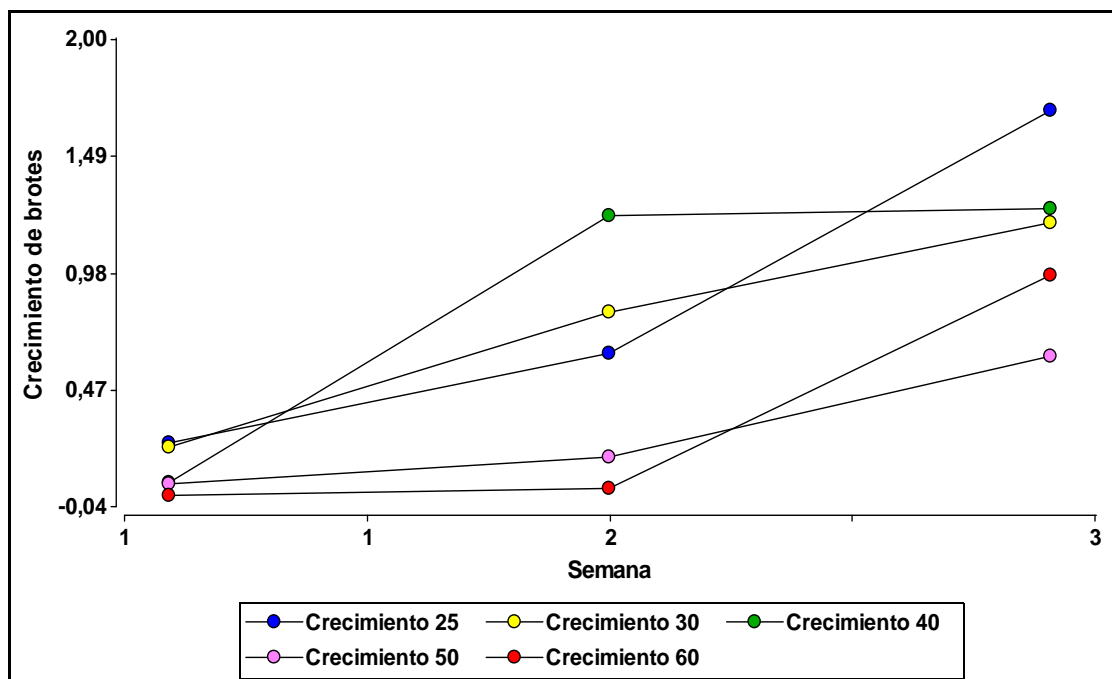


Figura 3.3 Crecimiento de los brotes por tratamiento durante tres semanas

Mediante un análisis de varianza de Kruskal Wallis se determinó que el tamaño es afectado por la concentración de cloro aplicada a los explantes ya que en la primera (0,0017) y segunda semana (0,0003) el valor de p resultó significativo (ver anexo C).

De igual manera se evaluó el efecto de la concentración de cloro en la coloración de las hojas de los explantes ya que se observó que cuando se presentaba un color verde claro no eran tan vitales como cuando presentaban un color verde oscuro y, consecuentemente, afectó al tamaño de los mismos.

En este caso, la prueba de Kruskal Wallis mostró un valor de $p < 0,05$ para las tres semanas (0,0113; 0,0002; 0,0014), es decir, cuando la concentración de cloro incrementó, la coloración de las hojas se tornó clara y por lo tanto se encontraban cloróticas (ver anexo D parte A).

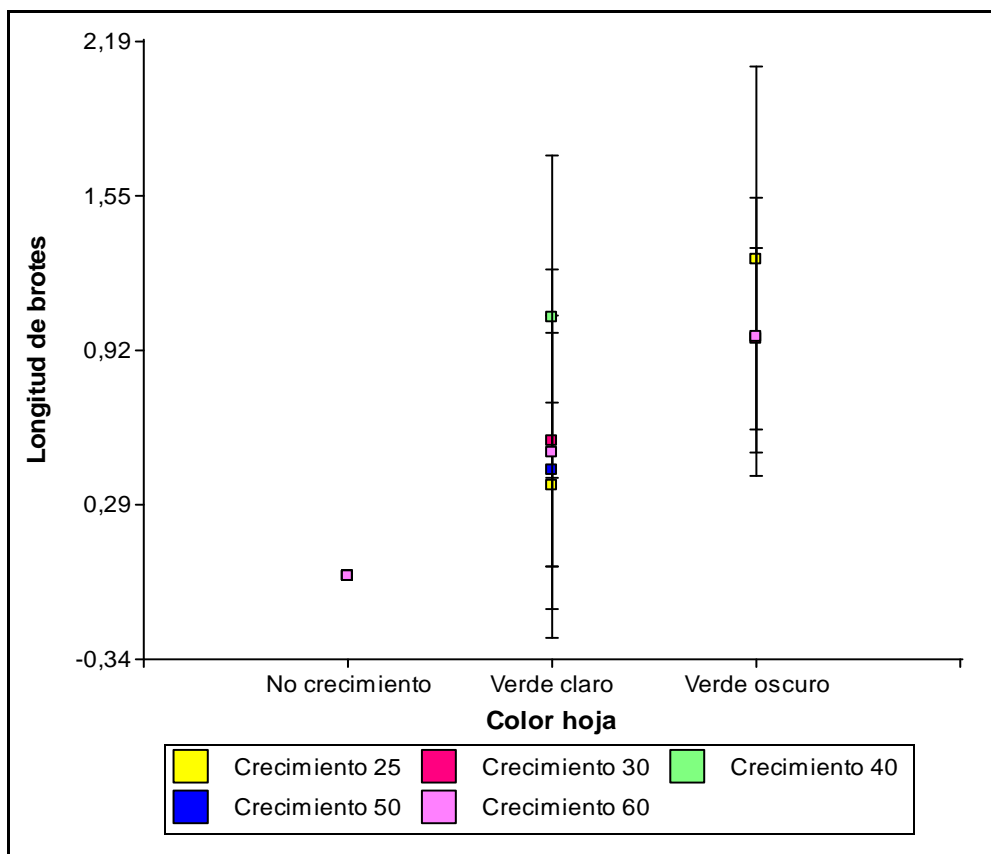


Figura 3.4 Efecto de la coloración de las hojas respecto al crecimiento de los brotes

Este último dato se reconfirmó al realizar un análisis de varianza de la coloración de la hoja de los explantes respecto su crecimiento. El valor de p (0,0001; 0,0005; 0,0166) fue significativo para las tres semanas evaluadas (ver anexo D parte B)

En la figura 3.4 se puede observar claramente que la concentración de cloro afecta a la coloración de las hojas y como consecuencia al tamaño. Cuando se colocó 25% de cloro para la etapa de desinfección (concentración más baja) existieron explantes de coloración verde claro que crecieron menos que aquellos cuya coloración es verde oscuro.

3.2.3 Contaminación bacteriana y fúngica

Se evaluó la aparición de hongos y bacterias, de forma global, para todos los tratamientos durante las tres semanas evaluadas.

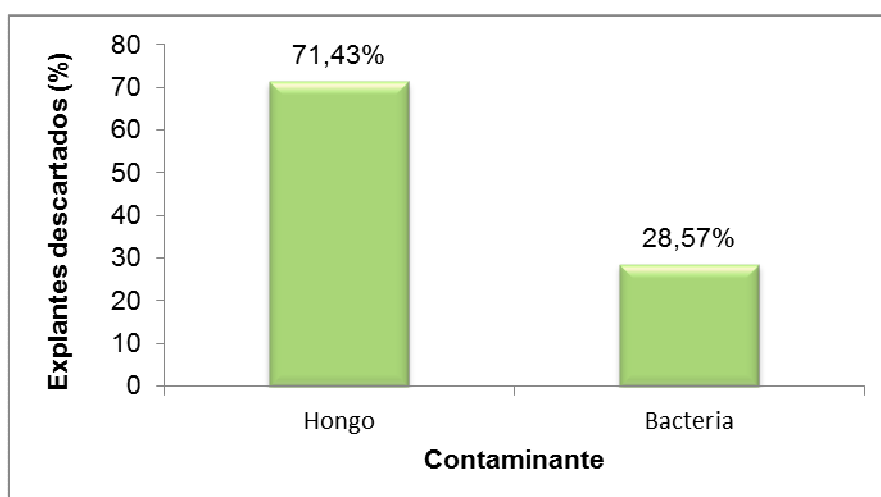


Figura 3.5 Frecuencia de los agentes contaminantes para el descarte de explantes de cucarda

Como se observa en la figura 3.5 del total de explantes descartados en todos los tratamientos, el 71,43% se debe a la presencia de hongos y el 28,57% fue debido a la presencia de bacterias. El agente contaminante más frecuente, de manera general, son los hongos, siendo las bacterias contaminantes secundarios de los explantes.

3.3 Establecimiento *in vitro* de los explantes

3.3.1 Contaminación y viabilidad de los explantes

Se evaluó la pérdida de explantes durante la fase de establecimiento en cuanto a contaminación o descarte, tal como se observa en la tabla 3.3

Tabla 3.3 Porcentajes de contaminación y sobrevivencia en los tratamientos de establecimiento *in vitro* de cucarda

Tratamiento	Total de explantes	Explantes contaminados	Explantes vivos	Contaminación (%)	Sobrevivencia (%)
MS T1-T4	40.0	0.0	40.0	0	100
MS ½ T5-T8	40.0	1.0	39.0	2.5	97.5
MSVG T9-T12	40.0	1.0	39.0	2.5	97.5

Tratamiento	Total de explantes	Explantos contaminados	Explantos vivos	Contaminación (%)	Sobrevivencia (%)
MSVG ¹ / ₂ T13-T16	40.0	2.0	38.0	5	95
TOTAL	160.0	4.0	156.0	2.5	97.5

La evaluación se llevó a cabo mediante grupos de tratamientos, debido a la naturaleza de diseño de bloques del mismo, dependiendo del medio de cultivo que fue utilizado para su efecto.

3.3.2 Longitud de los brotes

Con el fin de conocer la influencia del regulador de crecimiento BAP sobre el crecimiento de los explantes, se llevó a cabo análisis de varianzas de Kruskal Wallis, debido a que los datos no presentan normalidad, por grupos de tratamientos tomando en cuenta el medio de cultivo utilizado y la longitud de los brotes alcanzada en los mismos.

En primer lugar se utilizó el medio MS, a su concentración total, añadido con diferentes concentraciones de BAP. Al realizar el análisis de varianzas de Kruskal Wallis se puede observar que existen diferencias significativas en las tres semanas que se llevó a cabo la evaluación de los explantes obteniendo valores de p de 0,0009 a la primera semana y <0,0001 a la segunda y tercera semana (ver anexo E).

Según el valor obtenido de las medias se puede apreciar que en la primera semana se tienen grupos separados donde claramente se observa que los medios con 0,1 y 0,3 mg.L⁻¹ de BAP son mejores respecto a los otros dos en cuanto a crecimiento de los explantes; sin embargo, los valores de las medias divergen para la segunda y tercera semana, siendo la concentración de 0,3 mg.L⁻¹ de BAP mejor frente a las demás probadas.

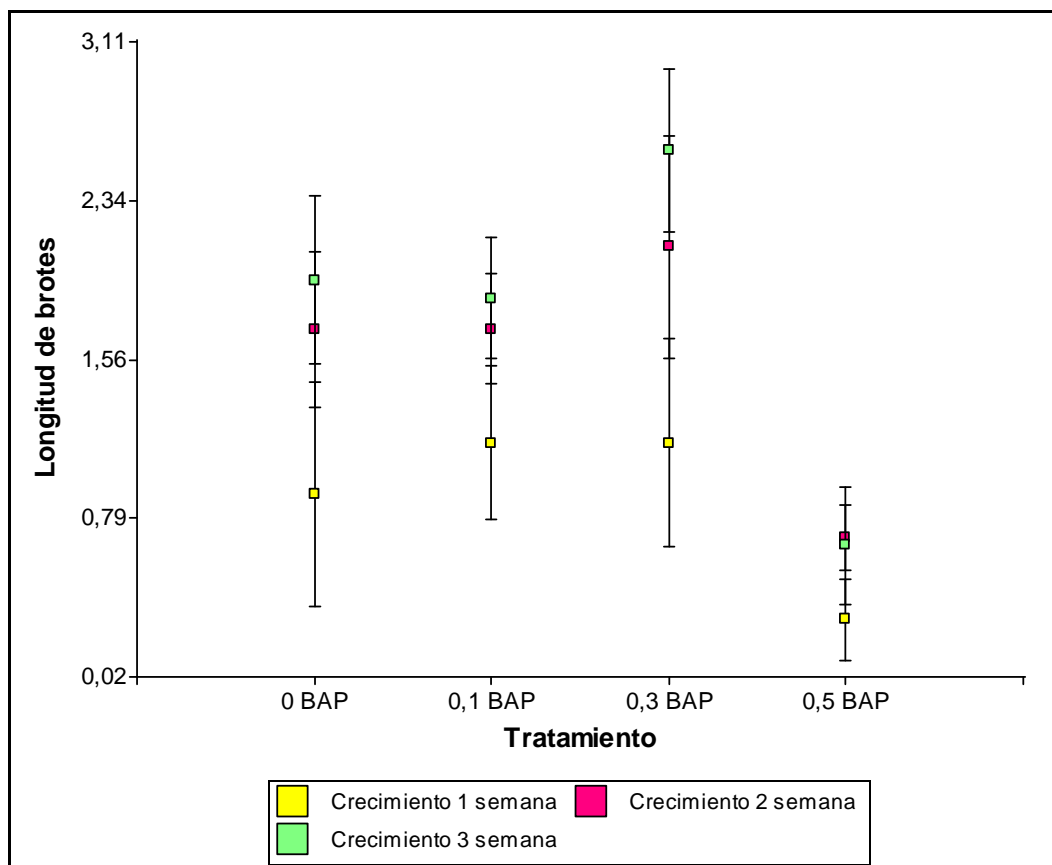


Figura 3.6 Análisis del crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de BAP en un medio MS por medio de gráfica de cajas

Como se puede observar en la figura 3.6, el medio de cultivo que contiene $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP es el que alcanza el mayor crecimiento de los explantes al cabo de tres semanas (ver anexo N parte A). Además, en este medio utilizado el crecimiento sigue siendo notorio a la tercera semana, y los otros medios probados permanecen constantes con el mismo valor de la semana anterior o con un crecimiento pobre.

El análisis de varianzas del medio MS a la mitad de su concentración ($\text{MS } \frac{1}{2}$) resultó ser significativo en cuanto al crecimiento de los explantes. Presentó un $p < 0,001$ para las tres semanas de evaluación (ver anexo F).

Se puede observar que a medida que incrementa la concentración de BAP el crecimiento es afectado negativamente, así, por análisis de sus medias se puede decir que a la primera semana el mejor tratamiento es aquel sin reguladores de crecimiento (T5), a la segunda semana los tratamientos T5 y T6

presentan los mejores desarrollos de explantes, siendo el tratamiento T5 mejor aun. Finalmente a la tercera semana, se puede observar que los tratamientos T5, T6 y T7 son similares en cuanto a crecimiento; sin embargo, los valores de las medias son favorables para el primero.

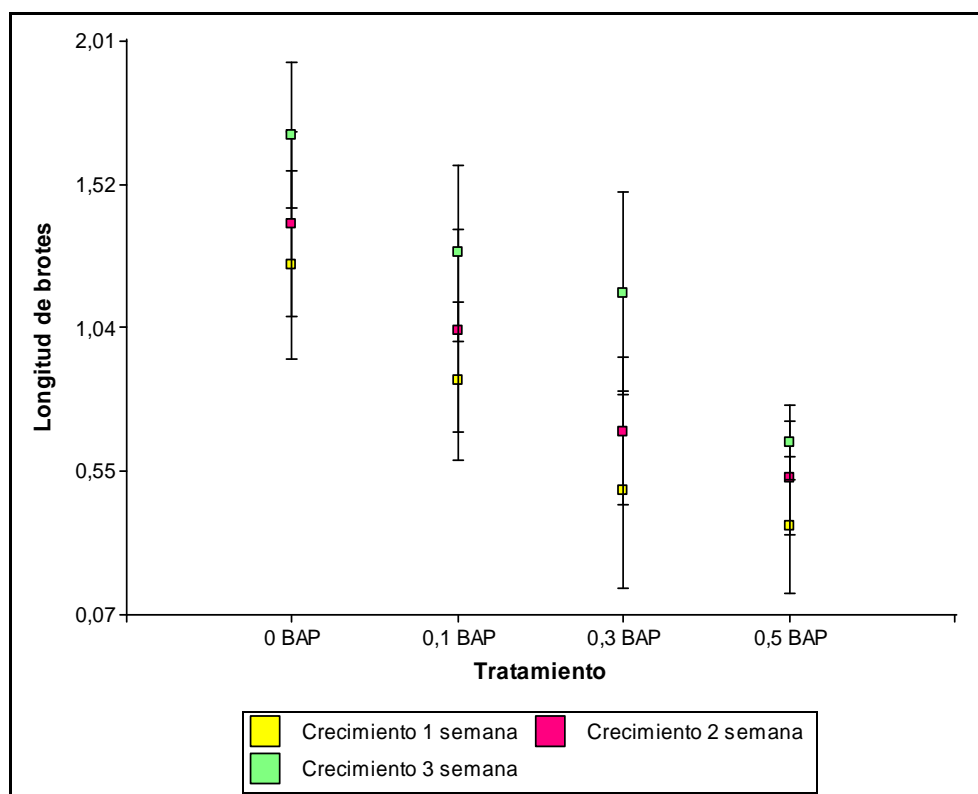


Figura 3.7 Análisis del crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de BAP en un medio MS ½ por medio de gráfica de cajas

Como se puede observar en la figura 3.7, la dispersión de los datos indica que los tratamientos T6 y T7 no presentan diferencias significativas, sin embargo; al analizar el tratamiento T5 respecto al T8 se puede inferir que si existen diferencias significativas las tres semanas que se llevó a cabo la evaluación.

El tratamiento T5 resulta ser el más efectivo para el medio MS ½ ya que la longitud de los brotes alcanza un mayor tamaño, desde la primera semana, y no tiene en su composición reguladores de crecimiento, por lo cual representa menores costos de producción.

Se llevó a cabo un análisis de varianza para el medio MSVG, tomando en cuenta sus diferentes tratamientos en cuanto a concentración de BAP.

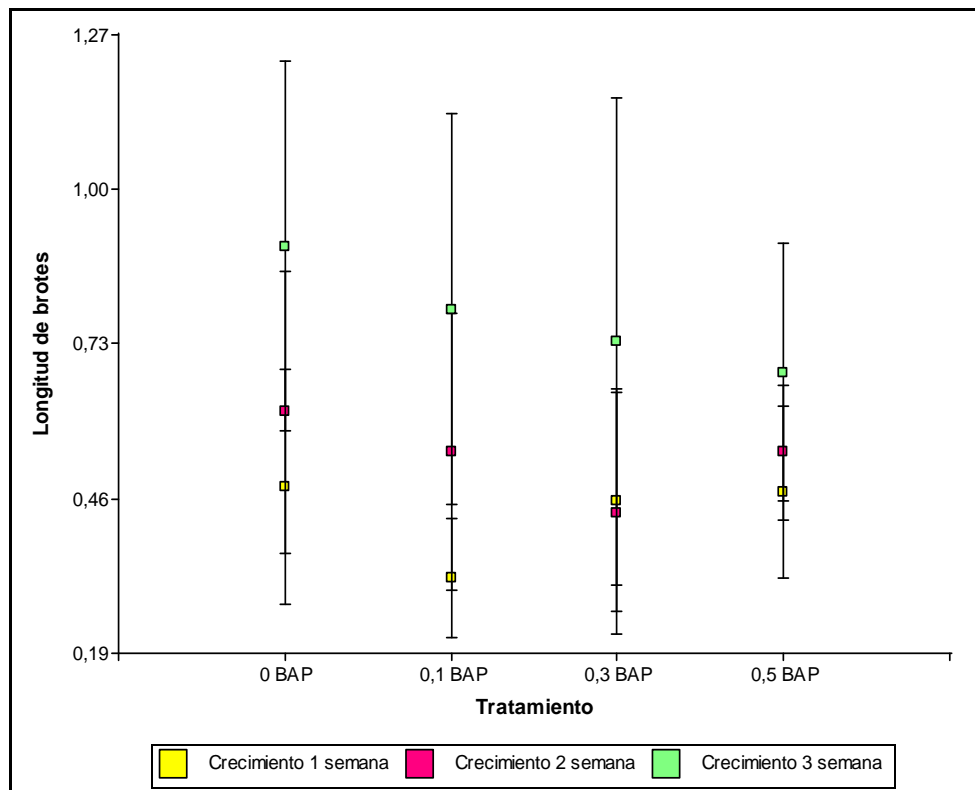


Figura 3.8 Análisis del crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de BAP en un medio MSVG por medio de gráfica de cajas

En este caso, el análisis de varianza de Kruskal Wallis resultó significativo la primera semana (0,0282) pero para la segunda y tercera semana no hubo significancia. Los valores de p obtenidos fueron 0,4375 y 0,4862 respectivamente. Mediante un análisis de las medias de cada tratamiento se puede observar que a la tercera semana, el tratamiento T9 es el mejor para el crecimiento de los brotes; los tratamientos T10 y T11 son similares en cuanto a crecimiento; y el tratamiento T12 es el de menor elongación de los explantes (ver anexo G).

Como se observa en la figura 3.8, el crecimiento es descendente a medida que aumenta la concentración de BAP en el medio MSVG; por lo tanto se confirma, al igual que el medio MS $\frac{1}{2}$, que la adición de BAP resulta

negativa para el crecimiento de los explantes, logrando así un mejor desarrollo cuando el medio de cultivo no presenta reguladores de crecimiento.

Evidentemente, en este tipo de medio de cultivo, las diferencias significativas son nulas a la segunda y tercera semana, es decir, los plántulas alcanzan un estado estacionario de crecimiento sin poder desarrollarse mucho más de lo que ya se desarrollaron a su primera semana de siembra.

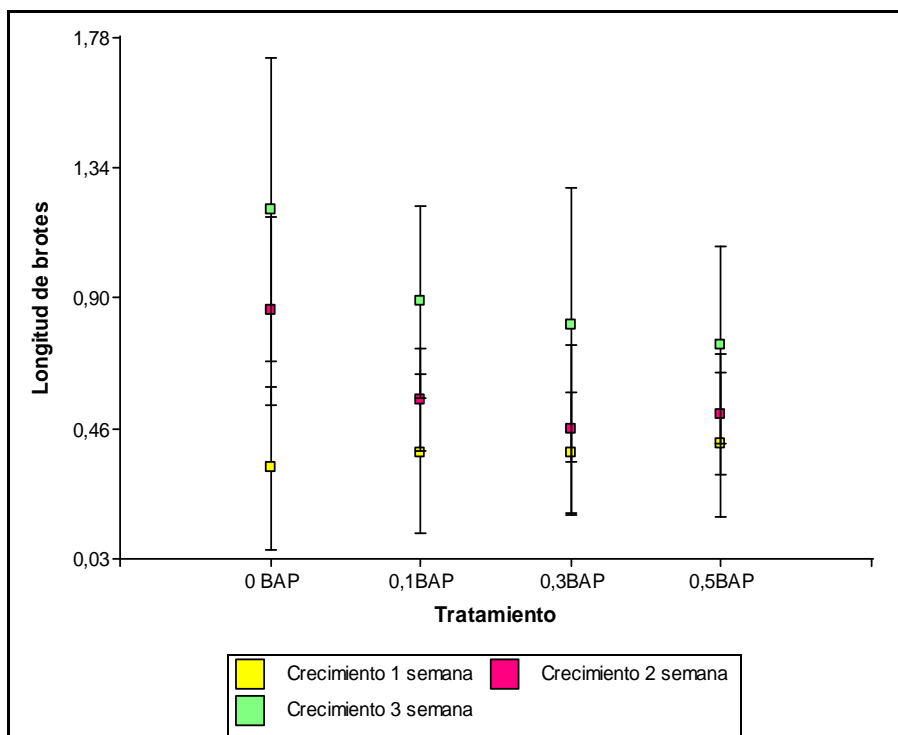


Figura 3.9 Análisis del crecimiento de los explantes con diferentes concentraciones de BAP en un medio MSVG $\frac{1}{2}$ por medio de gráfica de cajas

Finalmente, se realizó un análisis de varianza de Kruskal Wallis para el medio de cultivo MSVG $\frac{1}{2}$. En este caso, se presentan diferencias significativas a la segunda semana (0,0211) pero no a la primera y a la tercera (ver anexo H).

El comportamiento de los explantes para el medio de cultivo MSVG $\frac{1}{2}$ es de decrecimiento a medida que aumenta la concentración de BAP, como se observa en la figura 3.9.

Mediante un análisis de las medias obtenidas, se puede observar que la primera semana no existe diferencia significativa entre los tratamientos T13, T14 y T15 ya que sus longitudes son similares. En la tercera semana el tratamiento T13 es el que alcanza mayor desarrollo de los explantes, mientras que el tratamiento T14 y T15 se encuentran en condiciones similares. El último tratamiento obtiene el crecimiento más tardío y menos favorable.

3.3.2.1 Crecimiento de los brotes respecto al medio utilizado

Con el objetivo de conocer si existen diferencias significativas en cuanto a la utilización de un medio de cultivo MS, MS a la mitad de su concentración, MSVG y MSVG a la mitad de su concentración; se realizó un análisis de varianzas de Kruskal Wallis respecto al crecimiento alcanzado en la última semana de evaluación de los explantes.

El valor $p < 0,0001$ indica que si existen diferencias significativas del crecimiento de las plántulas respecto al medio de cultivo utilizado. El valor de la media (1,40) favorece al medio de cultivo MS respecto a los demás, seguido del valor obtenido para el medio MS $\frac{1}{2}$ (0,95). Los crecimientos alcanzados en los medios MSVG en su concentración a la mitad y total son similares en cuanto a sus medias; sin embargo, no son óptimos para el desarrollo y establecimiento adecuado de segmentos nodales de cucarda (ver anexo I parte A).

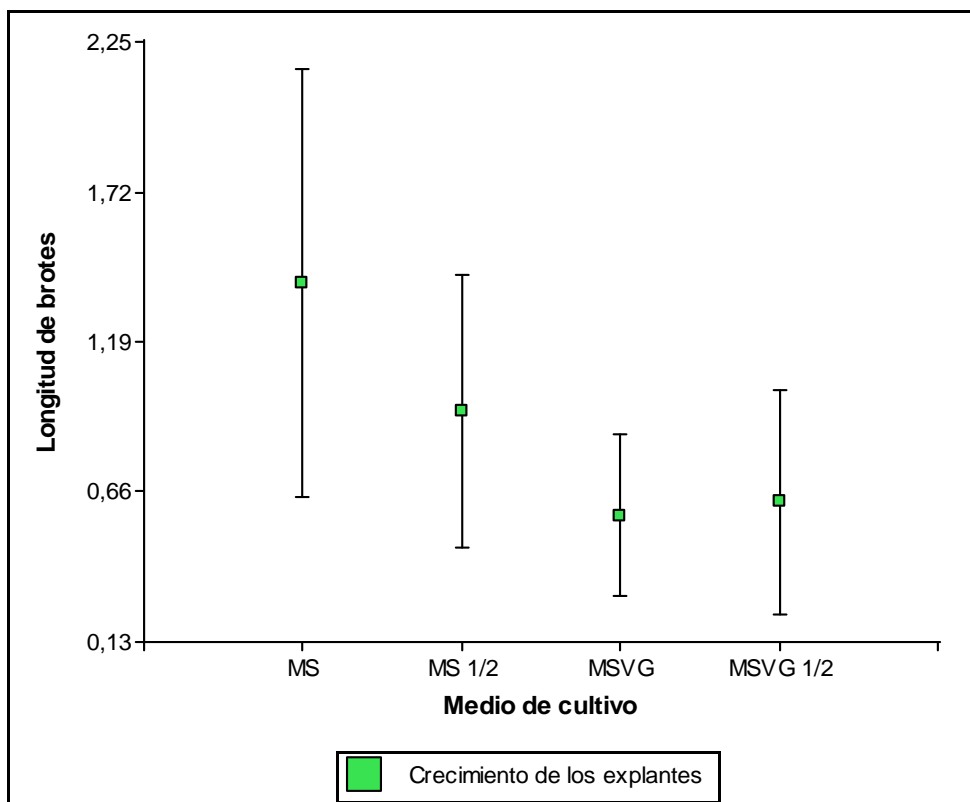


Figura 3.10 Análisis del crecimiento de los explantes en los diferentes medios de cultivo utilizados por medio de gráfico de puntos

En la figura 3.10, se puede observar que el crecimiento de los explantes es favorecido en el medio de cultivo MS ya que el crecimiento se da inicialmente de una manera rápida y termina, a la tercera semana, con la mayor longitud respecto a los demás medios de cultivo probados (ver anexo M parte B).

Al realizar un análisis por modelos mixtos (LSD Fisher), tomando en cuenta todos los parámetros estudiados, se puede observar que existe significancia para el tamaño de los explantes excepto por el color del medio (ver anexo J parte A).

En cuanto al medio de cultivo se pueden observar tres grupos diferenciados debido al valor de sus medias, en donde se confirma que el medio MS es el mejor para la longitud de los brotes, seguido por MS 1/2 y los medios MSVG y MSVG 1/2 se encuentran en el mismo grupo y son los menos favorables para los explantes de cucarda (ver anexo J parte B).

Al analizar los tratamientos utilizados para el establecimiento, existen dos grupos diferenciados por la cantidad de BAP utilizada. Se confirma que cuando se utiliza menor cantidad de citoquinina existe mejor desarrollo de las plántulas (ver anexo J parte D).

Finalmente, al realizar la interacción entre el tratamiento y el medio de cultivo para observar el efecto de los mismos en el tamaño de los explantes, se pueden observar seis grupos (ver anexo J parte H), en donde el primero refleja lo anteriormente concluido. El medio MS con una concentración de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP (T3) resulta ser el medio de cultivo más apropiado para el establecimiento de segmentos nodales de cucarda, tal como se observa en la figura 3.11.

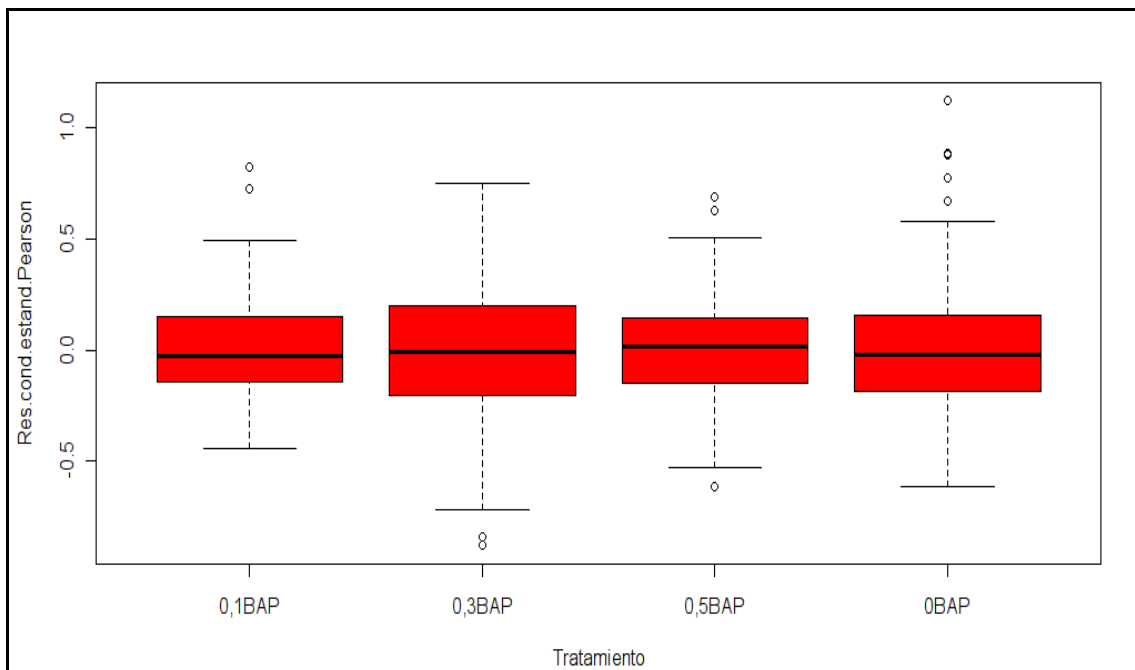


Figura 3.11 Análisis del crecimiento de los explantes en los diferentes medios de cultivo utilizados por medio de gráfica de cajas

3.3.3 Morfología del material de partida

Al realizar un análisis de varianza en cuanto a la morfología del explante inicial, se puede observar que la formación de callo es significativa ($p < 0,0001$) para los medios MSVG ya sea a su concentración total o a la mitad; sin embargo, es mucho mayor para el primero (ver anexo N parte C).

Esto no es favorable para el desarrollo posterior de la planta pues al formar callo se está perdiendo varios nutrientes del medio para la organogénesis. Lo contrario se puede observar en los medios MS utilizados ya que en estos se desarrolla por competo la planta en lugar de dar paso a embriogénesis (ver anexo I parte B).

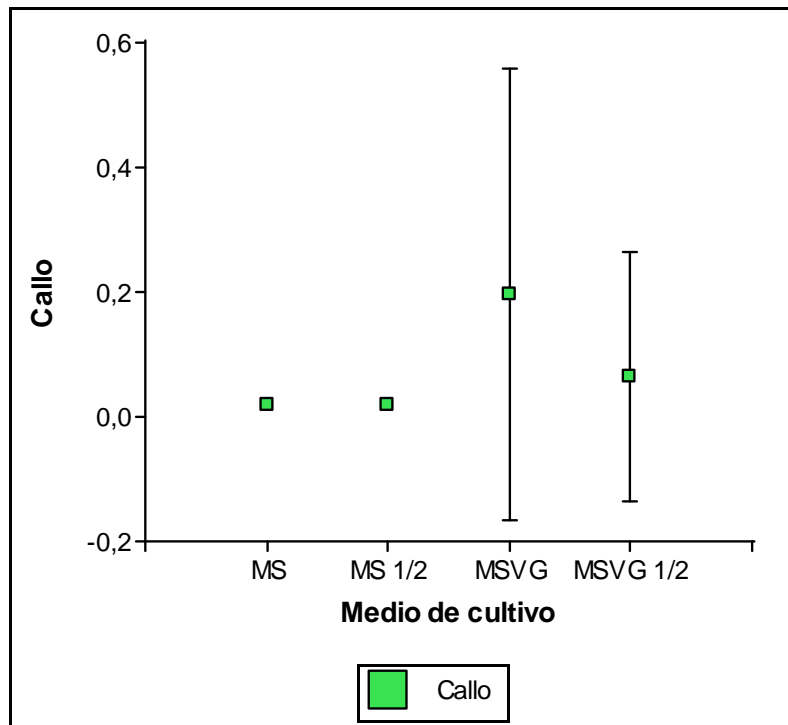


Figura 3.12 Análisis de la presencia de callo en los diferentes medios de cultivo utilizados por medio de gráfica de puntos

La figura 3.12 indica que el medio de cultivo con mayor formación de callo es el MSVG, seguido del MSVG $\frac{1}{2}$ por lo tanto no resultan favorables para el desarrollo del explante. En los medios MS no existe este problema y es óptimo utilizarlos para el establecimiento de cucarda.

3.3.4 Coloración de las hojas de los explantes

Como se concluyó en la fase de desinfección, es importante la coloración de las hojas de los explantes que se desarrollan ya que es indicativo de la vitalidad de las mismas. Cuando el medio de cultivo es adicionado con vitaminas Gamborg se observa que la mayoría de las plántulas se encuentran

cloróticas, es decir, no están recibiendo la cantidad de nutrientes que necesitan para su óptimo desarrollo. Mediante este análisis se puede observar que el medio MS es superior que el MSVG a sus dos concentraciones.

Además se puede observar que existen diferencias significativas ($p < 0,0001$) en cuanto al tamaño de los explantes respecto al medio de cultivo y al color de las hojas. Este análisis indica que en el medio MS con explantes cuya coloración de hojas es verde oscuro, el tamaño es mayor, por análisis de sus medias (ver anexo I parte C).

Según el análisis por modelos mixtos (LSD Fisher) existen tres grupos diferenciados por el color de la hoja respecto al tamaño de los brotes, siendo el color verde oscuro el mejor. Los colores de hoja marrón y verde claro no se diferencian por lo cual se conoce que tienen menos vigorosidad respecto a los ya analizados (ver anexo J parte E).

Por lo tanto el tratamiento T3 es el mejor para el establecimiento de los explantes de cucarda (*Hibiscus rosa sinensis*).

3.4 Multiplicación *in vitro* de los explantes

3.4.1 Contaminación y viabilidad de los explantes

Se evaluó la pérdida de explantes debido a la contaminación bacteriana o fúngica, como se muestra en la tabla 3.4.

Tabla 3.4 Porcentajes de contaminación y sobrevivencia en los tratamientos de multiplicación *in vitro* de cucarda

Tratamiento	Total de explantes	Explantes contaminados	Explantes vivos	Contaminación (%)	Sobrevivencia (%)
T1-T4	40.0	4.0	36.0	10	90
T5-T8	40.0	3.0	37.0	7.5	92.5
T9-T12	40.0	3.0	37.0	7.5	92.5

Tratamiento	Total de explantes	Explantos contaminados	Explantos vivos	Contaminación (%)	Sobrevivencia (%)
T13-T16	40.0	4.0	36.0	10	90
T17-T20	40.0	0.0	40.0	0	100
TOTAL	200.0	14.0	186.0	7.0	93.0

Al igual que en el ensayo de establecimiento, esta evaluación se llevó a cabo por grupos de tratamientos tomando en cuenta los distintos factores del diseño planteado.

3.4.2 Número de brotes

Se llevó a cabo un análisis de varianza de Kruskal Wallis debido a que los datos presentados eran no paramétricos. No existieron diferencias significativas (0,0509) en cuanto a los tratamientos utilizados para la formación de brotes; sin embargo, existen tres tratamientos que resultaron ser mejores para esta etapa (ver anexo K).

El tratamiento T14 (1 mg.L⁻¹ BAP; 0,01 mg.L⁻¹ AIA) resultó ser óptimo para la propagación de cucarda ya que se obtuvieron hasta cuatro brotes por cada plántula. El valor de su media (2,67) lo destaca de los demás tratamientos probados (ver anexo M parte C).

Existen también otros tratamientos que presentaron hasta tres brotes por cada plántula, tal como el T3 (0 mg.L⁻¹ BAP; 0,02 mg.L⁻¹ AIA) y el T15 (1 mg.L⁻¹ BAP; 0,02 mg.L⁻¹ AIA) que por sus medias de 2,00 y 1,90 respectivamente sobresalen respecto a los demás tratamientos probados en cuanto a brotación. Cabe recalcar que a cada medio de cultivo de 30 mL se le agregó 200 µL de AG₃; esto resultó positivo para la elongación del tallo principal de los explantes y consecuentemente el desarrollo de pequeñas yemas axilares.

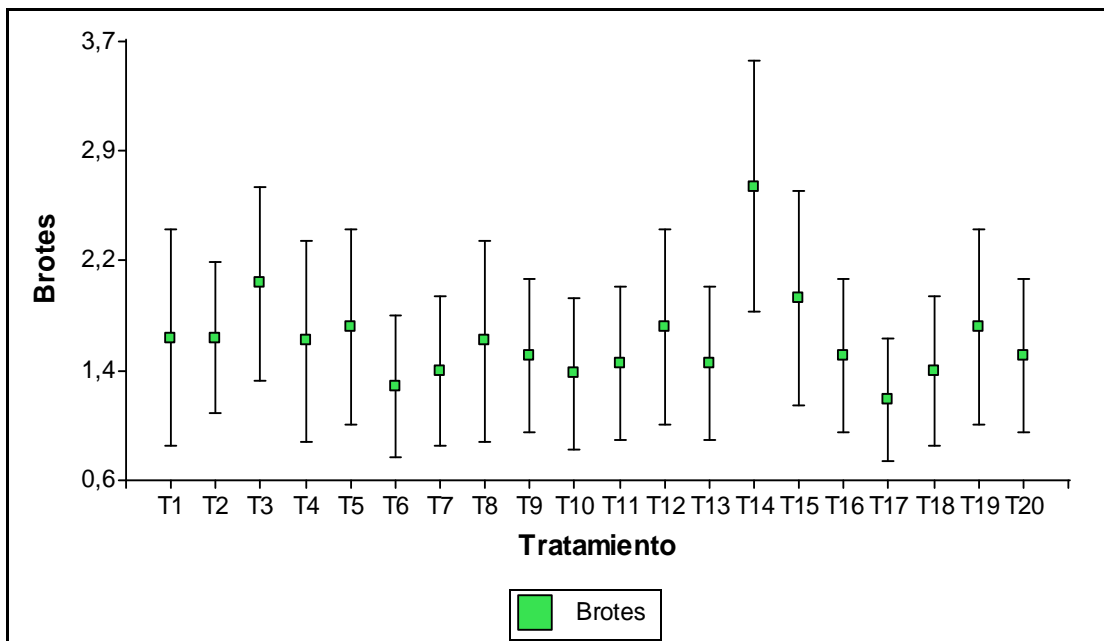


Figura 3.13 Análisis del número de brotes por tratamiento de propagación de *Hibiscus rosa-sinensis*

En la figura 3.13 se puede observar que el número de brotes que se obtuvo en los diferentes tratamientos no difieren entre ellos, a excepción del tratamiento T14. El medio de cultivo perteneciente al mismo será el que de lugar a los mejores resultados de propagación de cucarda.

3.4.3 Índice de propagación

El IP representa el número total de brotes que se han formado por explante; mientras mayor sea este valor mejor es el tratamiento que se ha probado para la propagación de *Hibiscus rosa-sinensis*.

En el análisis de varianza de Kruskal Wallis, realizado previamente, se obtuvo que el tratamiento T14, con un valor de su media de 2,67; es el mejor para la fase de multiplicación de cucarda. En la tabla 3.5 se puede observar los valores de IP obtenidos para cada tratamiento.

Tabla 3.5 Valores de IP de los tratamientos de propagación de *Hibiscus rosa-sinensis*

Concentración de BAP (mg.L ⁻¹)	Concentración de AIA (mg.L ⁻¹)			
	0	0,01	0,02	0,03
	Índice de propagación			
0	1,63	1,63	<u>2,00</u>	1,60
0,5	1,70	1,29	1,40	1,60
0,8	1,50	1,38	1,44	1,70
1	1,44	2,67	<u>1,90</u>	1,50
1,5	1,20	1,40	1,70	1,50

El tratamiento T1 tiene un valor de IP de 1,63; que a pesar de no tener ningún tipo de regulador de crecimiento resulta ser mejor que otros que si han sido suplementados con BAP y AIA tal como el tratamiento T10 cuyo IP es de 1,38. El balance hormonal en esta etapa es muy importante ya que afecta directamente a los resultados que se pueden obtener en cuanto a propagación.

3.4.4 Porcentaje de inducción de brotes múltiples

Mediante este análisis se puede obtener el porcentaje de explantes que desarrollaron brotación en cada tratamiento respecto a un número de plántulas evaluadas; así, existieron ensayos en los cuales el porcentaje de inducción de brotes múltiples no fue adecuado y aquellos en los cuales la propagación se vio favorecida según el medio de cultivo utilizado.

Tabla 3.6 Porcentaje de inducción de brotes múltiples de cucarda según el tratamiento

Concentración de BAP (mg.L ⁻¹)	Concentración de AIA (mg.L ⁻¹)			
	0	0,01	0,02	0,03
	% inducción de brotes múltiples			
0	50	62.5	<u>70</u>	50
0,5	60	29	40	50
0,8	50	37.5	44.4	60

Concentración de BAP (mg.L ⁻¹)	Concentración de AIA (mg.L ⁻¹)			
	0	0,01	0,02	0,03
	% inducción de brotes múltiples			
1	44.4	80	70	50
1,5	20	40	60	50

En la tabla 3.6 se puede observar que el tratamiento T14 posee un 80% de inducción de brotes múltiples, es decir, que se obtiene un alto índice de producción de plántulas por cada explante. Los tratamientos T3 y T15 tienen un 70% de inducción de brotes. De igual manera, estos ensayos demuestran que también pueden producir un alto número de plántulas al realizar la propagación de los explantes. Este parámetro está relacionado con el IP ya que el porcentaje de propagación dependerá del número de brotes obtenidos por tratamiento. En la figura 3.14 se puede observar los resultados obtenidos.

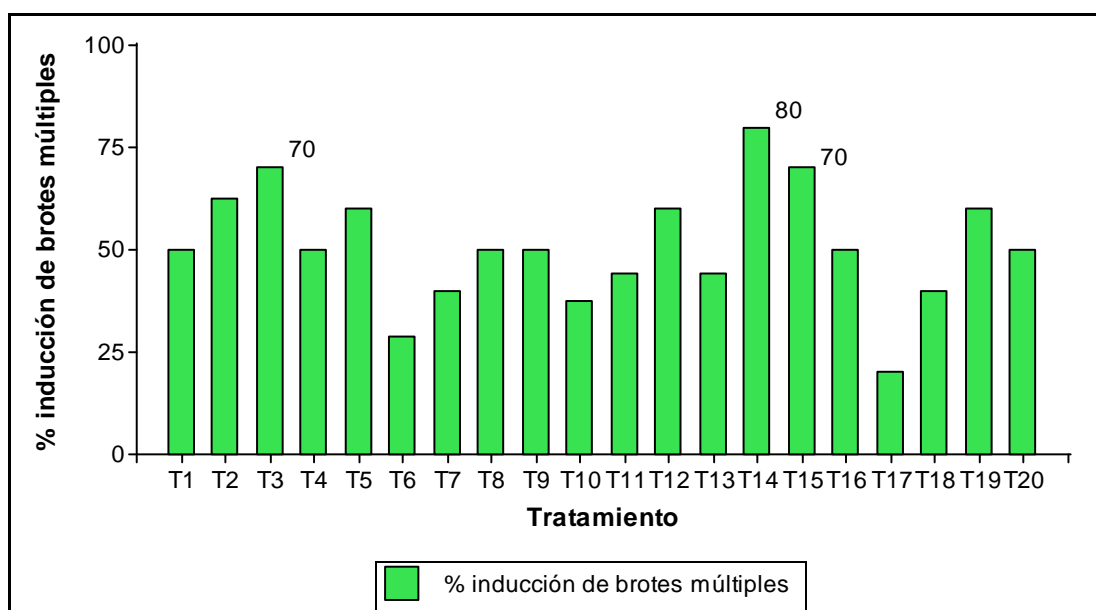


Figura 3.14 Porcentaje de inducción de brotes múltiples por cada tratamiento

Se puede observar además que los tratamientos T11 y T13 tienen un porcentaje igual pero no es propicio para llevar a cabo una propagación masiva. Existen también muchos tratamientos que han obtenido un 50% de explantes con brotación. Los tratamientos T6 y T17 son los menos apropiados para llevar a cabo la multiplicación de brotes de cucarda.

Por lo tanto el tratamiento T13 es el mejor para la propagación de los explantes de *Hibiscus rosa-sinensis*.

3.5 Enraizamiento de los explantes

3.5.1 Contaminación y viabilidad de los explantes

Se evaluó la pérdida de explantes por tratamiento debida a la contaminación bacteriana o fúngica, tal como se detalla en la tabla 3.7.

Tabla 3.7 Porcentajes de contaminación y sobrevivencia en los tratamientos de enraizamiento *in vitro* de cucarda

Tratamiento	Total de explantes	Explantes contaminados	Explantes vivos	Contaminación (%)	Sobrevivencia (%)
T1	10.0	1.0	9.0	10	90
T2	10.0	0.0	10.0	0	100
T3	10.0	1.0	9.0	10	90
T4	10.0	2.0	8.0	20	80
T5	10.0	3.0	7.0	30	70
T6	10.0	0.0	10.0	0	100
T7	10.0	0.0	10.0	0	100
T8	10.0	0.0	10.0	0	100
T9	10.0	0.0	10.0	0	100
T10	10.0	0.0	10.0	0	100
TOTAL	100.0	7.0	93.0	7.0	93.0

3.5.2 Porcentaje de plántulas enraizadas por cada tratamiento

Se observó el número de plántulas que enraizaron en cada tratamiento, 60 días después de haber llevado a cabo la incubación en los medios de cultivo respectivos.

Tabla 3.8 Porcentaje de plántulas enraizadas por cada tratamiento

Medio de cultivo	Concentración de AIB (mg.L ⁻¹)				
	0	0,5	1	1,5	2
	% explantes enraizados				
MS + 30 g.L ⁻¹ sacarosa	90%	60%	33,3%	87,5%	14,29%
MS + 20 g.L ⁻¹ sacarosa	0%	10%	20%	0%	0%

Como se puede observar en la tabla 3.8, el tratamiento T1 (MS + 30 g.L⁻¹ sacarosa + 1 g.L⁻¹ CA) posee el mayor porcentaje de plántulas enraizadas. El tratamiento T4 (MS + 30 g.L⁻¹ sacarosa + 1,5 mg.L⁻¹ AIB + 1 g.L⁻¹ CA) también presenta un alto porcentaje de enraizamiento; sin embargo, los explantes enraizaron al cabo de 60 días, mientras que con el tratamiento T1, las plántulas lo hicieron al cabo de 40 días. Los resultados obtenidos en los tratamientos T5 al T10, sugieren que la disminución de la cantidad de sacarosa en el medio de cultivo afecta negativamente al enraizamiento de la cucarda. Además se puede observar que a medida que se aumenta el regulador de crecimiento AIB, se obtiene una respuesta de modo más tardío, tal como se puede apreciar en la tabla 3.9.

Tabla 3.9 Aparición de raíces en los diferentes tratamientos

Tratamiento (30 g.L ⁻¹ sacarosa)	Aparición raíz	Tratamiento (20 g.L ⁻¹ sacarosa)	Aparición raíz
T1	30-40 días	T6	Ausencia raíz
T2	44-58 días	T7	60 días
T3	44-58 días	T8	60 días
T4	37-58 días	T9	Ausencia raíz
T5	37-58 días	T10	Ausencia raíz

3.5.3 Categorías según la aparición de raíz

Se llevó a cabo un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis según las categorías por presencia de raíz en cada tratamiento. Existieron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre los ensayos llevados a cabo (ver anexo L).

El primer tratamiento (T1) resulta ser el mejor para la etapa de enraizamiento de los explantes de cucarda ya que además de poseer el mayor porcentaje de explantes enraizados y optimizar el tiempo de su aparición, también posee plántulas que han sido categorizadas con el mayor ranking respecto a aquellos presentes en otros tratamientos (ver anexo L). Este factor es importante ya que cuando las plantas de cucarda son aclimatizadas tienen la capacidad de adaptarse fácilmente a condiciones *ex vitro*.

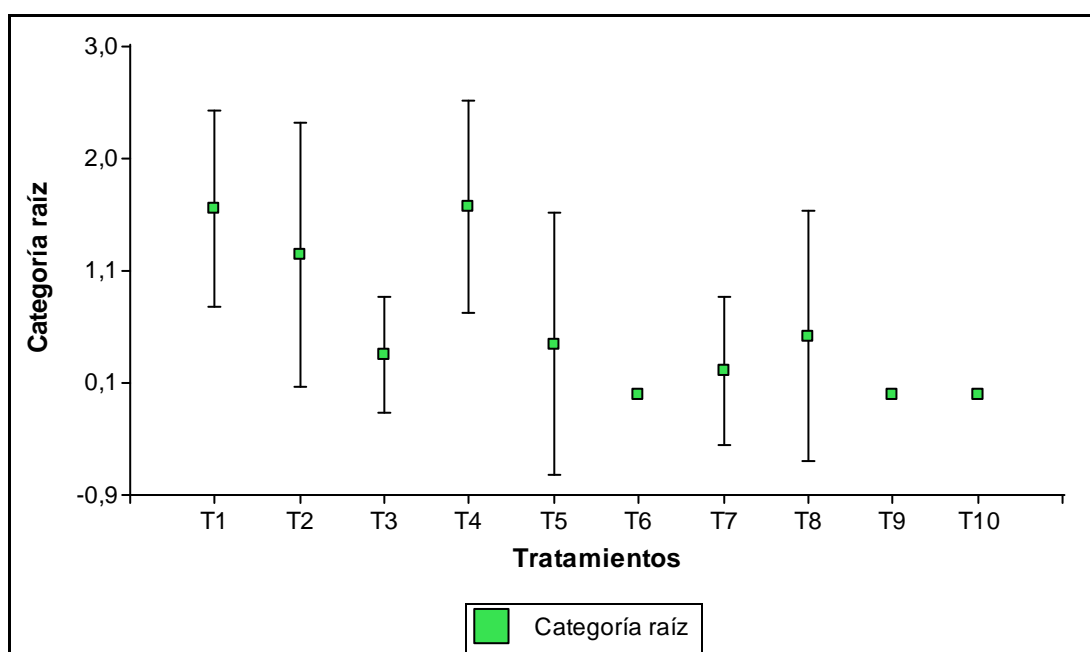


Figura 3.15 Categorías según la presencia o ausencia de raíz en los tratamientos

Los tratamientos T2 y T4 también son aptos para esta fase ya que, de igual manera dan a lugar resultados positivos, tal como se puede observar en la figura 3.15; sin embargo, al utilizar cierta cantidad de AIB, generan mayores costos de producción respecto al T1 que no posee reguladores de crecimiento (ver anexo M parte D).

Los resultados sugieren que *Hibiscus rosa-sinensis* se adapta mejor con bajas concentraciones de fitohormonas para su óptimo crecimiento *in vitro*.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Desinfección de los explantes

4.1.1 Contaminación y viabilidad

En la etapa de desinfección de los explantes de cucarda se llevó a cabo diferentes tratamientos que consistieron en la variación de la concentración de cloro a utilizarse. En estudios anteriores, donde se ha llevado a cabo la desinfección de explantes de *Hibiscus*, se ha utilizado otro tipo de compuestos como el cloruro de mercurio (HgCl_2) al 1% (Ayadi *et al.*, 2011; Kumari & Pandey, 2011).

La variación en el tiempo y la concentración de dicho compuesto ha sido exitosa para la eliminación de patógenos presentes en sus explantes; sin embargo, se conoce que el HgCl_2 es perjudicial debido a su alta toxicidad, además puede ser ingerido por el hombre por medio de inhalación afectando al sistema nervioso central y provocando lesiones renales (Ramírez, 2008).

Como alternativa para la desinfección de diversas plantas, se ha utilizado cloro con contenido de hipoclorito de sodio (NaClO) del 5%. Los porcentajes de viabilidad obtenidos son altos para muchas especies vegetales; sin embargo, existen aquellas en donde los patógenos bacterianos y fúngicos persisten a pesar de esto. *Hibiscus rosa-sinensis* es uno de ellos, por esta razón se realizó una desinfección rigurosa que consistió en dos lavados con cloro y uno con alcohol al 70%. Al analizar los resultados obtenidos tras los diferentes tratamientos, se pudo observar que los porcentajes de descontaminación fueron altos para concentraciones de 25 y 30% de cloro.

Ambos tratamientos difieren en un 20% de mortalidad de explantes, siendo el tratamiento T2 (30% de cloro) el mejor. Al obtener un resultado de viabilidad y de contaminación no significativo, se puede concluir que debido al tamaño de la muestra no se puede apreciar a escala real la pérdida de

explantes al utilizar cualquiera de los dos tratamientos, no obstante, al llevar a cabo una producción masiva de cucarda, este hecho significaría altas pérdidas por lo cual sería mucho más rentable realizar un lavado de cloro al 30% y asumir una pérdida del 10% de plántulas.

4.1.2 Efecto del uso del cloro en el crecimiento de los explantes

En cuanto a los parámetros de necrosis y oxidación evaluados después de llevar a cabo los tratamientos de desinfección, se pudo observar que a medida que la concentración de cloro fue aumentando, resultaba perjudicial para los explantes. Esto se debe a que el cloro resulta ser tóxico en altas concentraciones y en largos tiempos de inmersión, ya que en presencia de agua puede formar ácido hipocloroso, de modo que el cloro liberado tras esta reacción resulta ser un oxidante muy fuerte (Jácome, 2011; Sánchez & Salaverría, 2004).

Como consecuencia de esto, el crecimiento de los explantes también se vio afectado. Cuando se utilizó bajas concentraciones de cloro (hasta 40%) la elongación de las plántulas se dio de manera normal consiguiéndose tamaños favorables para la etapa en la que se encontraban. Los tratamientos de 50 y 60% de cloro resultaron altamente perjudiciales pues además de obtenerse plántulas de características desfavorables, no se daba el crecimiento esperado. La principal característica fenotípica que se vio afectada por este hecho fue la coloración de las hojas. Cuando una planta se encuentra clorótica, quiere decir que no tiene los nutrientes necesarios para crecer y ser apta para la propagación, esto además es resultado de intoxicación. Mediante análisis nutricional de plántulas se ha determinado que la clorosis se da debido a deficiencia de nitrógeno metabólico y además de magnesio (Prehn, Serrano, & Berrios, 2003).

4.1.3 Contaminación bacteriana y fúngica

En general, se puede decir que la aparición de un tipo de contaminante depende de la fuente de explante, es por esto que es necesario realizar un

tratamiento fitosanitario de las plantas madre que posteriormente darán lugar a la obtención de más plántulas que tendrán sus mismas características.

En este caso la presencia de hongos es mayor (71,43%) respecto a las bacterias (28,57%). Estas últimas se deben principalmente a una manipulación inadecuada en la cámara de flujo o por desinfección no apta para los explantes. La contaminación fúngica se puede combatir en la mayoría de los casos con fungicidas por determinados periodos de tiempo, aunque esto depende de las características de la especie que se trate. La cucarda requirió de un tratamiento preliminar riguroso antes de ser cultivado *in vitro*. A pesar de esto fue necesario además realizar una desinfección con cloro y alcohol, como se detalló anteriormente.

La presencia de los contaminantes mencionados produce pérdida de material vegetal para ser propagado pues existen plantas que a pesar de que se han desarrollado bacterias en el medio se logran establecer, sin embargo, al pasar a la siguiente etapa de propagación, no se obtienen plantas saludables ya que la contaminación es persistente.

4.2 Establecimiento *in vitro* de los explantes

4.2.1 Longitud de los brotes

En la etapa de establecimiento de los explantes de cucarda se probó cuatro medios de cultivo con diferentes concentraciones de BAP. Se utilizó esta fitohormona, que es sintética y una de las más activas, ya que las citoquininas pueden regular la división celular y estimular la formación de brotes axilares y adventicios (Lozano, 2011).

Al realizar el diseño experimental de bloques completamente al azar se pudo observar la eficiencia de los medios de cultivo diferentes en cuanto al desarrollo longitudinal de plántulas de cucarda. El medio de Murashige y Skoog (MS) a su concentración total resultó ser el mejor para el desarrollo de los explantes. Este medio de cultivo tiene los componentes nutritivos

necesarios para obtener una plántula vigorosa apta para pasar a la etapa de propagación. Esto se concluyó ya que el medio de cultivo MS ½ no le proveía los componentes necesarios para que la planta se elongue lo suficiente.

El medio MS efectivo contenía una concentración de 0,3 mg.L⁻¹ de BAP. A medida que esta concentración incrementaba, el crecimiento de las plantas se veía afectado. Este comportamiento se repitió para los medios MS ½, MSVG y MSVG ½, de modo que los tratamientos T5, T9 y T13 resultaron como los mejores al no poseer ningún regulador de crecimiento. Solamente en el medio MS resultó efectiva una concentración baja de BAP (T1); sin embargo, con los tratamientos T2 y T3 también se consiguió tamaños adecuados.

Es importante tomar en cuenta que en el medio MS sin fitohormonas el crecimiento también es significativo y adecuado; sin embargo, mediante el análisis de LSD Fisher (Figura 3.11) se pudo observar que cuando el medio no contenía BAP en su composición existió mayor cantidad de datos que se encontraban fuera del rango de crecimiento de todos los individuos evaluados (outliers). El crecimiento de este grupo de explantes se puede deber a las características genóticas propias de una planta que le pudieron dar ventaja evolutiva sobre las otras y no depende de la cantidad de BAP que se agregue. Para confirmar esto sería necesario realizar un estudio genético de las plantas evaluadas.

Esta experiencia se ha repetido en investigaciones anteriores donde se ha estudiado el comportamiento *in vitro* de *Hibiscus rosa-sinensis*. Bhalla *et al.* (2009) concluyó que los medios de cultivo MS a la mitad y al cuarto de su concentración son efectivos siempre y cuando no posean reguladores de crecimiento y que un medio MS con bajas concentraciones de fitohormonas resulta ser el mejor para el establecimiento de *Hibiscus*.

4.2.2 Morfología del material de partida

Los tratamientos llevados a cabo en medios de cultivo MS añadido con vitaminas Gamborg resultaron negativos para la organogénesis de los

explantes de cucarda ya que los resultados indicaron que con este tipo de medio se desarrollaba callo a partir de los segmentos nodales tomados como explantes. A pesar de que se realizó diferentes cortes de dichos segmentos, ya sean pequeños o de mayor tamaño, al cabo de tres semanas se pudo observar un desarrollo amorfo. Al producirse esta formación el crecimiento de la planta se vio afectado en este medio respecto a los otros utilizados. Debido a que los nutrientes se concentraron en el tallo de los explantes, la planta perdía vitalidad y consecuentemente no se lograba establecer de la manera más óptima.

Cuando se utilizaron los medios de cultivo MS, el segmento nodal tomado como explante inicial permanecía del tamaño original y se desarrollaba claramente el crecimiento de los órganos de la planta. Muy pocas ocasiones se dio la formación de callo pero en pequeñas cantidades.

Por esta razón también fue positivo utilizar este tipo de medio que dio lugar a los mejores resultados de establecimiento.

4.2.3 Coloración de las hojas de los explantes

Al igual que en la etapa de desinfección, las plantas se presentaron cloróticas cuando no recibieron los nutrientes necesarios para desarrollarse, pero no fueron afectadas por la concentración de cloro aplicada inicialmente.

Cuando las hojas se presentaron de coloración verde oscuro, se pudo concluir que el medio de cultivo era apto para su desarrollo. Las hojas de color marrón y verde claro se encontraron clasificadas dentro de un mismo grupo ya que la presencia de las mismas fue muestra de poco crecimiento y senescencia de la plántula.

En algunos casos al pasar las tres semanas de establecimiento, las hojas tendían al decaimiento, razón por la cual esta etapa no podía prolongarse por más tiempo del ensayado.

4.3 Multiplicación *in vitro* de los explantes

4.3.1 Número de brotes

Para lograr una exitosa multiplicación *in vitro* de los explantes, se probó diferentes medios de cultivo con concentraciones bajas y altas de citoquinina BAP y pequeñas concentraciones de auxina AIA. El mejor tratamiento T14 (1 mg.L⁻¹ BAP; 0,01 mg.L⁻¹ AIA) produjo resultados positivos para la propagación de cucarda, tomando en cuenta la etilación de las mismas y el método utilizado para evitar su necrosamiento.

El mayor número de brotes obtenidos fue de cuatro por explante aunque también existieron medios probados con los cuales se obtuvo tres brotes por cada plántula. Este número fue el más común en los tratamientos T3, T14 y T15.

El éxito en esta etapa fue determinado por el intercambio gaseoso dentro de los recipientes en los cuales se colocaron los individuos evaluados. En algunos casos éstos se sellan con un film de polietileno para posibilitar la respiración celular debido a que la regeneración de brotes puede verse inhibida por la acumulación de etileno (Rivero, 2011).

Con el fin de evitar la pérdida de explantes debido a este factor, se utilizó gasas y plástico para sellar los recipientes que contenían las unidades experimentales tratadas. Esto a su vez provocó, al cabo de una semana, el cuarteamiento del medio de cultivo ya que al haber un intercambio gaseoso constante también se perdió la cantidad de agua presente en su composición lo cual trajo como consecuencia un incremento en la concentración de sus nutrientes, de tal modo que las plántulas ya no los absorbían de manera favorable sino que se intoxicaban con los mismos.

Es por esto que los factores físicos como la atmósfera gaseosa y la humedad relativa son determinantes en la morfogénesis de las plantas *in vitro*. La atmósfera gaseosa esta condicionada por el tipo de envase y cobertura

seleccionado para el cultivo. La cantidad de etileno presente en cada cultivo puede variar dependiendo de las concentraciones de citoquininas utilizadas así como el tipo de agar y del explante, la luz y la especie estudiada. Por otro lado, la humedad relativa es una medida de la cantidad de vapor de agua contenida en la atmósfera gaseosa y depende del sello del recipiente empleado; así, si el cierre es hermético como en el caso del uso de papel aluminio la humedad interior será del 100%. Si existe un intercambio gaseoso como el caso del uso de gasas, la humedad interior puede descender al 50% lo cual puede dar paso a la pérdida veloz del agua en el medio de cultivo (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mogrinski, 2010).

En la atmósfera gaseosa *in vitro* se encuentra además de otros compuestos como el nitrógeno, el oxígeno y el dióxido de carbono; al etileno que parece actuar como desencadenante de una respuesta vegetal en forma de pérdida foliar (Almudena, 2010).

Por estas razones se realizó subcultivos en esta etapa con los cuales se evitó la pérdida total del medio de cultivo y por ende la intoxicación de las plántulas a un tiempo considerado como óptimo, dependiendo del grosor de las capas de gasa utilizadas y la funcionalidad de las mismas.

4.3.2 Índice de propagación

Mediante este análisis se puede apreciar el número de plántulas de cucarda que se obtendrán por cada ciclo de propagación que se lleve a cabo. En esta etapa es importante el balance hormonal, proporcionado por el medio de cultivo, ya que de esto dependerá el número de brotes que se pueden producir. El IP puede variar dependiendo del ciclo en el cual se encuentre y por lo general dependerá de la vigorosidad de la planta. Este parámetro puede verse afectado por la producción de etileno de la cucarda, por esta razón se ha planteado que cada ciclo de propagación debe durar dos semanas ya que al cabo de este tiempo se logra obtener un número de brotes similar por cada ciclo y además se evita la pérdida de plantas por las razones anteriormente

mencionadas. En el medio de cultivo adecuado se logró obtener un IP de 2,67 en el primer ciclo de propagación

4.3.3 Porcentaje de inducción de brotes múltiples

Mediante este parámetro de estudio, se obtuvo el porcentaje de plántulas que se propagaron en cada medio de cultivo. En algunos casos fue bajo debido a que los nutrientes y reguladores de crecimiento presentes no fueron los adecuados para llevar a cabo la fase de propagación de los explantes de tal modo que hubo aquellos que no presentaron propágulos, sin embargo, existieron otros en los cuales cada plántula presentaba diferente número de brotes. De todas las unidades experimentales ensayadas en los tratamientos T3, T14 y T15, la mayoría desarrolló brotes alcanzando un porcentaje de inducción de brotes múltiples de hasta el 80%.

4.4 Enraizamiento de los explantes

En esta etapa se pudo observar que cuando existió mayor cantidad de sacarosa en el medio (30 g.L^{-1}) se dio de manera más rápida la aparición de raíces. Los resultados se pudieron observar al haber transcurrido un mes después del paso de la etapa de propagación a la etapa de enraizamiento. A pesar de que existieron algunos medios en los cuales se dio este resultado de manera óptima, también hubo aquellos en los cuales no se dio el enraizamiento fácilmente. En los tratamientos del T1 al T5 se observaron los resultados hasta dos meses después de haber sido cambiados de medio, a pesar de que la mayoría se observó al primer mes. Algunos de ellos no enraizaron debido a que el medio utilizado no fue el adecuado. Se concluyó que a mayor concentración de AIB, los explantes no enraizaban. El tratamiento T1 ($\text{MS} + 30 \text{ g.L}^{-1}$ sacarosa + 1 g.L^{-1} CA) fue el mejor para los explantes de cucarda.

En los medios de cultivo que contenían 20 g.L^{-1} de sacarosa no se dio enraizamiento al cabo de un mes. No hubo explantes que mostraron cambio alguno por lo cual se infirió que la cantidad de sacarosa les afectaba negativamente a los explantes de cucarda.

Al llevar a cabo un estudio respecto al número de raíces y su longitud se pudo observar que el medio de cultivo utilizado no influye en estos parámetros ya que el éxito en esta etapa está determinado por el número de plántulas que enraízan y el tiempo en el cual lo hacen. Esto es necesario para pasar a la siguiente etapa de aclimatización.

Además se pudo observar que en esta etapa el problema de etilación en las plantas ya no fue persistente. Esto se observó debido a los diferentes mecanismos de respuesta al estrés. El principal es el cambio de actividad hormonal; en esta etapa se busca el desarrollo de raíces adventicias y no de la formación de brotes por lo cual los explantes tuvieron una modificación de sus niveles hormonales lo cual les confirió una mayor resistencia al estrés (Almudena, 2010).

A pesar de este hecho, los recipientes que contenían los explantes no fueron sellados herméticamente sino con tapas plásticas que permitirían un bajo intercambio gaseoso, menor al que ocurre con tapas de gasa, probados en la etapa anterior.

Una vez que las plántulas desarrollaron diferentes raíces pasaron a la etapa de aclimatización, concluyendo así el ciclo de la propagación *in vitro* de los explantes de cucarda (*Hibiscus rosa-sinensis*).

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. En el protocolo de propagación *in vitro* de cucarda (*Hibiscus-rosa sinensis*), se logró la exitosa desinfección de los explantes mediante la utilización de segmentos nodales y su posterior establecimiento, obteniéndose plántulas vigorosas en estas primeras fases.
2. Con el tratamiento T2 (30% Cl, 5% NaClO) se logró un alto porcentaje de desinfección de los segmentos nodales (90%) sin presentar oxidación o necrosis en ninguno de ellos. Además, debido a que el tratamiento no es agresivo respecto a aquellos con mayores concentraciones de cloro, los explantes se desarrollaron en menor tiempo y con mejores resultados.
3. La coloración de las hojas de las plántulas generadas son un factor importante ya que indican su vigorosidad, es decir, si los nutrientes del medio son adecuados para su crecimiento o, por otro lado, si la desinfección fue demasiado agresiva. Cuando se encontró coloración verde oscuro, se pudo concluir que las plántulas se encontraban saludables, y cuando se presentó coloración verde claro, se concluyó que los explantes estaban cloróticos.
4. El tiempo en el que se mantuvo los explantes en la fase de establecimiento antes de pasar a la etapa de la propagación *in vitro* fue de tres semanas, debido a que a medida que el tiempo se prolongaba, la coloración de las hojas se fue tornando a marrón. Se concluyó que debido a que el medio de cultivo se iba agotando en cuanto a presencia de nutrientes, la planta entraba en estrés por lo cual comenzaba a producir etileno provocando la consecuente senescencia de las plántulas generadas.
5. En la etapa de establecimiento de los explantes, mediante el mejor tratamiento T3 (MS + 0,3 mg.L⁻¹ BAP) se logró obtener plántulas de hasta 3 cm de longitud, hojas de coloración verde oscuro y no se dio lugar a la formación de callo; lo cual lo destaca respecto a los medios MSVG en sus

concentraciones probadas ya que en estos últimos la planta no se desarrollaba y daba lugar a una estructura amorfa a partir del segmento nodal.

6. El tratamiento más eficiente para la propagación *in vitro* de cucarda fue el T14 (1 mg.L⁻¹ BAP; 0,01 mg.L⁻¹ AIA) con el cual se obtuvo hasta cuatro brotes por explante y un 80% de inducción de brotes múltiples. Este índice de propagación se vio afectado por la presencia de etileno y el método de eliminación utilizado para el mismo.
7. En la etapa de multiplicación *in vitro* de los explantes, la utilización de gasas permitió la salida del etileno generado por las mismas debido a las condiciones de estrés a las cuales se encontraban sometidas; sin embargo, fue necesario realizar dos subcultivos, a pesar de la presencia de la fina capa de plástico con agujeros ya que esto solo retrasó la deshidratación del medio de cultivo.
8. Para la etapa de enraizamiento el mejor tratamiento fue el T1 (MS + 1 g.L⁻¹ CA + 30 g.L⁻¹ sacarosa) con el cual se logró un mayor número de explantes enraizados en un menor tiempo, respecto a los demás ensayados.
9. Al aumentar la cantidad de sacarosa en el medio de cultivo para la etapa de enraizamiento se favorece al desarrollo más temprano de raíces de cucarda.
10. La utilización de tapas plásticas en lugar de gasas permite un bajo intercambio gaseoso por lo cual fueron utilizadas en la etapa de enraizamiento en donde los niveles hormonales de las plántulas disminuyen el estrés fisiológico y por ende la producción de etileno.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Con el fin de obtener plántulas de cucarda libres de contaminación, es recomendable realizar un pre tratamiento de las plantas donadoras de explantes con un fungicida adecuado dependiendo de las enfermedades que se puedan observar en las mismas.

Para obtener un grupo homogéneo de plántulas generadas, es necesario tomar en cuenta los segmentos nodales de la parte media de cada tallo del arbusto (hasta el quinto segmento nodal) ya que las primeras porciones tienden a la oxidación y las porciones finales no dan lugar a plantas vigorosas y con buen aspecto.

En la etapa de propagación de cucarda, es necesario utilizar gasas para la salida del etileno, y para evitar la intoxicación y muerte de los explantes es recomendable realizar un subcultivo a la segunda semana.

Recomiendo realizar un estudio exhaustivo que se centre en la micropropagación de cucarda ya que es muy interesante su comportamiento debido a la presencia del etileno y es posible que mediante la utilización de diferentes técnicas tal como el método químico de eliminación del mismo, con ácido salicílico; o a su vez, la utilización de un medio de Murashige y Skoog con la modificación de Van der Salm, de lugar a mejores resultados respecto al método físico probado.

Para posteriores ensayos de multiplicación *in vitro* de cucarda, sería recomendable utilizar altos y bajos rangos de BAP, acompañado del ácido salicílico ya que este puede cambiar la absorción de los nutrientes presentes en el medio de cultivo.

Para evitar la presencia excesiva de outliers en los análisis estadísticos que se realicen, es recomendable realizar un estudio de las plantas *in vitro* de mejores características para llevar a cabo su producción masiva.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Abdelnour, A., & Escalant, J. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Costa Rica: Biblioteca Orton IICA/CATIE.

Abedini, W. (2002). Biología aplicada a la producción vegetal.

Alcorcés, N. (2009). *Estudios citogenéticos de Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae)*. Monogras: Universidad de Oriente.

Almodóvar, W. (1998). *Enfermedades de los hidropónicos*. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

Almudena, V. (2010). Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico, aspectos comunes y específicos. Castellón de la Plana: Universitat Jaume I.

Alonso, M. (2002). Biología aplicada a la mejora de Pelargonium. Madrid.

Alva, S., Menéndez, A., Oropeza, M., & Vargas, T. (2010). Guía de Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Central de Venezuela.

Anderson, N. (2007). Flower breeding and genetics. Springer.

Ayadi, R., Hamrounia, L., Hananac, M., Bouzidb, S., Trifib, M., & Khoujaa, M. (2011). *In vitro propagation and regeneration of an industrial plant kenaf (Hibiscus cannabinus L.)*. Industrial crops and products, 33, 474-480.

Ayala, A. (2011). Establecimiento de cultivo in vitro de Molle (Schinus molle L.) a partir de yemas axilares tomadas de plantas madre como una herramienta para la propagación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito. Quito: ESPE.

Bendre, A., & Kumar, A. (2009). *Practical Botany*. Rastogi Publications.

Bhalla, S., Abdullah, J., Sreeramanan, S., & Karuthan, C. (2009). *Shoots induction from Hibiscus rosa-sinensis nodal explant using N6-benzylaminopurine (BAP)*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 5(4), 403-410.

Bird, L., & Molinelli, J. (2001). Cuidado y protección de bosques y áreas verdes. Agencia de Protección al Ambiente y Desarrollo Sustentable del Municipio de Puebla.

Bolio, R., Lara, P., & Magaña, M. S. (2006). *Producción forrajera del tulipán (Hibiscus rosa-sinensis) según intervalo de corte y densidad de siembra*. Técnica Pecuaria en México, 44(3), 379-388.

Brickell, C., & Zuk, J. (1997). Encyclopedia of garden plants (Primera ed.). USA: DK Publishing Book.

Cárdenas, M. (2011). Determinación del protocolo de establecimiento y multiplicación in vitro de Quishuar (Buddleja incana), a partir de yemas axilares de plantas madre, como una herramienta para la preservación de esta especie dentro del Distrito Metropolitano de Quito. Quito: ESPE.

Castillo, A. (2005). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas.

Centro de Investigación Ambiental Cununyacu. (2008). *EMMOP-Q Proyecto CIAC*. Distrito Metropolitano de Quito: Alcaldía Metropolitana.

Daughtrey, M. (2001). Plagas y enfermedades de plantas de maceta con flores. The American Phytopathological Society .

Distrito Metropolitano de Quito. (2012). Personal Municipal participa en campaña de reforestación. *Agencia pública de noticias de Quito*.

De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador (Primera ed.). Herbario QCA.

FAO. (1999). *Comité de agricultura*. Roma.

Ferreira, R., & Cerrate, E. (2000). Botánica. Manual de fitoterapia. *Museo de historia natural de la UNMSM*.

Gobierno de Estado México. (2008). *Árboles forrajeros de Chiapas*. Bib. Orton IICA / CATIE.

Guía de Consultas Botánicas. (2007). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE).

H. Municipalidad de Cochabamba, Bolivia. (2010). *Repoblamiento forestal urbano*.

Hermida, M. (2010). *Conocer, valorar, preservar*. Verde Chaco.

Interagency Taxonomic Information System ITIS. (2012). *Catalogue of Life*. Retrieved julio 21, 2012, from www.catalogueoflife.org/

Jácome, A. (2011). *Microporpagación in vitro de la especie endémica Jiquerón (Aegiphila ferruginea) para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción*. Quito: ESPE.

Kumari, S., & Pandey, K. (2011). In vitro plant regeneration from shoot tip explants of *Hibiscus syriacus* (L.). *The Bioscan*, 6(4), 647-648.

Leiva, L., López, J., Negrín, A., Pérez, R., & Marreno, P. (2010). Estudios preliminares de la propagación de cultivares promisorios de Marpacífico (*Hibiscus rosa-sinensis*). *Centro de investigaciones en bioalimentos*.

Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mogrinski, L. (2010). *Biología y Mejoramiento Vegetal II* (Segunda ed.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Lozano, Z. (2011). *Establecimiento de un protocolo para la propagación in vitro de Guarango Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze, a partir de plántulas como herramienta para la preservación de esta especie*. Quito: ESPE.

Marín, J., & Moll, H. (1997). *La micropropagación y la mejora de especies frutales*.

Ministerio de Educación del Ecuador. (2010). Un proyecto de reforestación para la vida. *El Comercio*.

Mogollón, N., & Gil, M. (1992). Propagación de *Mussaenda erythrophylla* Schum y Thonn, Rosea, mediante cultivo *in vitro*. *Agronomía Tropical*, 42(5-6), 261-283.

Montiel, M. (1999). *Introducción a la Flora de Costa Rica*. Universidad de Costa Rica.

Ortiz, G. (2009). *Flora ornamental española: Aspectos históricos y principales especies*. Monografías Bouteloua.

Ozmen, A. (2010). Cytotoxicity of Hibiscus rosa-sinensis flower extract. *Caryologia*, 63(2), 157-161.

Pérez, J., Alvarado, Y., Gómez, R., Jiménez, E., & Orellana, P. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*. Cuba.

Prehn, D., Serrano, C., & Berrios, C. (2003). Micropropagación de *Quillaja saponaria* Mol. a partir de semillas. *Bosque (Nativia)*, 24, 3-12.

Quintero, R. (1993). *Prospectiva de las agrobiotecnologías*. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura.

Ramírez, A. (2008). Intoxicación ocupacional del mercurio. *American College of Occupational and Environmental Medicine*, 69(1), 46-51.

Recalde, C. (2007). *Establecimiento del cultivo in vitro y aclimatación en invernadero de nepeta hederacea variegata*. Quito: ESPE.

Rioseco, P. (2010). *Ecuador empeñado en frenar la deforestación en la Amazonía*. Retrieved julio 28, 2012, from www.ecuadorinmediato.com

Rivero, M. (2011). *Cultivo de tejidos vegetales*.

Roca, W., & Mogrinski, M. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Regeneración de plantas: embriogénesis y organogénesis. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Rueda, D. (2007). Botánica sistemática (Cuarta edición ed.). Quito: GLOB UBLI.

Sánchez, M., & Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa Duch.*). Universidad de Oriente Press, 4(1), 21-26.

Segretín, M. (2009). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). ArgenBio.

Silva, C., & Souza, D. (2010). *Supervivencia de especies leñosas nativas cultivadas en suelos degradados*. VI Simposio Internacional Sobre Manejo Sostenible de Recursos Forestales.

Tufiño, P. (2009). *Programa de estudios socioambientales*. Dossier.

Velásquez, J. (1997). La micropropagación y la mejora en especies frutales. Academia de ciencias exactas físicas, químicas y naturales de Zaragoza.

Verma, B. (2011). Introduction to taxonomy of Angiosperm. PHI Learning Private.

Vidalie, H. (2001). Producción de flores y plantas ornamentales. Mundi Prensa Libros.

Warner, R., & Erwin, J. (2001). Variation in floral induction requirements of *Hibiscus* sp. Journal of the American Society for Horticultural Science, 126(3), 262–268.

Yang, L., Makoto, H., Haruhiko, M., & Takeshi, U. (1995). *In vitro* plant regeneration from leaf and petiole explants of *Hibiscus syriacus*. Plant tissue culture, 12(2), 173-177.

Zaragoza, J. (2007). *Atlas Todo Fauna*. Retrieved julio 21, 2012, from www.todofauna.com