



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: ARMENDÁRIZ HIDALGO KATHERINE ALICIA

TEMA: ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN,
INTRODUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* A PARTIR DE YEMAS
APICALES DE PLANTAS JUVENILES DE MAGNOLIA (*Magnolia grandiflora*)
PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA, REPOBLACIÓN Y PRESERVACIÓN DE
ESTA ESPECIE EN EL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO.

DIRECTOR: ING. TAPE, MARCO

CODIRECTOR: ING.-MAT. ROMERO, PEDRO

SANGOLQUÍ, AGOSTO 2014

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. KATHERINE ALICIA ARMENDÁRIZ HIDALGO como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, Agosto de 2014

Ing. Marco Taípe
DIRECTOR

Ing.–Mat. Pedro Romero Saker
CODIRECTOR

REVISADO POR:

Dra. María Augusta Chávez
DIRECTORA DE LA CARRERA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Katherine Alicia Armendáriz Hidalgo

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN, INTRODUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* A PARTIR DE YEMAS APICALES DE PLANTAS JUVENILES DE MAGNOLIA (*Magnolia grandiflora*) PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA, REPOBLACIÓN Y PRESERVACIÓN DE ESTA ESPECIE EN EL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO.”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

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

Sangolquí, Agosto 2014.

Katherine Alicia Armendáriz Hidalgo

AUTORIZACIÓN

Yo Katherine Alicia Armendáriz Hidalgo

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN, INTRODUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* A PARTIR DE YEMAS APICALES DE PLANTAS JUVENILES DE MAGNOLIA (*Magnolia grandiflora*) PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA, REPOBLACIÓN Y PRESERVACIÓN DE ESTA ESPECIE EN EL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO.”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Agosto de 2014

Katherine Alicia Armendáriz Hidalgo

DEDICATORIA

A mis padres que me han enseñado a perseverar para cumplir mis metas, a mi hermano y enamorado quienes han estado a mi lado en todo momento. A mis amigos, por animarme y por todos los momentos compartidos.

Katherine Alicia Armendáriz Hidalgo

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme sabiduría, protección y entendimiento para hacer posible la culminación de esta profesión.

A mis padres, los cuales han luchado constantemente, para cumplir este, nuestro sueño, ustedes me dieron fortaleza durante el periodo universitario y principalmente durante la ejecución de mi tesis, siendo el pilar fundamental, quienes han cuidado de mí y me han llevado siempre por el buen camino, enseñándome a ser mejor cada día y por confiar en mí en todo momento.

A mi hermano y su esposa que siempre estuvieron a mi lado, apoyándome en todo momento en mis triunfos y caídas. A mi enamorado por apoyarme en cada decisión que tomo, y por darme fuerzas para siempre salir adelante. A Santi por darme alegría en todo momento.

A María José Basantes, asesora principal de mi tesis, y Segundo Aguilar por su valioso aporte en el diseño, elaboración y obtención de las muestras del presente trabajo.

Al Director y Codirector de Proyecto, por sus conocimientos impartidos y por las recomendaciones para el desarrollo de esta Investigación, gracias, por ser unos grandes maestros.

A mis amigos quienes me aconsejaron, gracias y por brindarme siempre palabras de aliento para seguir adelante.

Katherine Alicia Armendáriz Hidalgo

ÍNDICE DE CONTENIDO

<i>CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN</i>	1
1.1. Formulación del problema.....	1
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general del proyecto	4
1.3.2. Objetivos específicos del proyecto.....	4
1.4. Marco teórico	4
1.4.1. <i>Magnolia grandiflora</i>	4
1.4.2. Nombre científico.....	5
1.4.3. Clasificación taxonómica.....	5
1.4.4. Descripción botánica y morfológica	5
1.4.4.1. Corteza	6
1.4.4.2. Hojas	7
1.4.4.3. Flores.....	7
1.4.4.4. Fruto	8
1.4.4.5. Semilla	9
1.4.4.6. Raíz	10
1.4.5. Componentes.....	10
1.4.6. Factores ambientales y edáficos.....	11
1.4.7. Usos y bondades.....	11
1.4.8. Cultivo <i>in vitro</i>	12
1.4.8.1. Factores influyentes.....	13

1.4.8.2. Medio de cultivo.....	13
1.4.8.3. Etapas de propagación <i>in vitro</i>	23
a. Etapa 0. Selección de plantas donadoras	23
b. Etapa I. Desinfección.....	24
c. Etapa II. Introducción del material <i>in vitro</i>	25
d. Etapa III. Multiplicación.....	25
e. Etapa IV. Enraizamiento.....	26
f. Etapa V. Aclimatación.....	27
1.5. Hipótesis.....	28
<i>CAPÍTULO 2 : METODOLOGÍA</i>	29
2.1. Localización del ensayo	29
2.2. Cronograma de tesis	29
2.3. Obtención de plantas madre	30
2.4. Selección, colecta y transporte del material	31
2.5. FASE I: Desinfección de los explantes	31
2.6. FASE II: Introducción.....	35
2.7. FASE III: Multiplicación.....	37
<i>CAPÍTULO 3 : RESULTADOS</i>	40
3.1. Fase de desinfección de los explantes	40
3.1.1. Contaminación	40
3.1.2. Necrosis.....	46
3.1.3. Viabilidad.....	51
3.2. Fase de introducción.....	56
3.2.1. Presencia de brote	56
3.2.2. Viabilidad.....	59

3.2.3.	Número de brotes	62
3.3.	Fase de multiplicación.....	64
3.3.1.	Presencia de brotes.....	65
3.3.2.	Viabilidad.....	67
3.3.3.	Número de brotes	69
<i>CAPÍTULO 4 : DISCUSIÓN.....</i>		<i>73</i>
4.1.	Etapa de desinfección.....	73
4.1.1.	Contaminación	74
4.1.2.	Necrosis.....	75
4.1.3.	Viabilidad.....	76
4.2.	Etapa de introducción.....	77
4.2.1.	Presencia de brotes y número de brotes	77
4.2.2.	Viabilidad.....	78
4.3.	Etapa de multiplicación	78
4.3.1.	Presencia de brote y número de brotes.....	78
4.3.2.	Viabilidad.....	80
<i>CAPÍTULO 5 : CONCLUSIONES.....</i>		<i>81</i>
<i>CAPÍTULO 6 : RECOMENDACIONES.....</i>		<i>83</i>
<i>CAPÍTULO 7 : BIBLIOGRAFÍA.....</i>		<i>84</i>
<i>CAPÍTULO 8 ANEXOS.....</i>		<i>99</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Corteza de <i>Magnolia grandiflora</i> tomada en la Plaza Grande.	6
Figura 2:	Hojas de <i>Magnolia grandiflora</i> tomada en la Hacienda las Magnolias.	7
Figura 3:	Flor de <i>Magnolia grandiflora</i> (euita, 2014).	8
Figura 4:	Fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> tomada en la Hacienda las Magnolias.	9
Figura 5:	Semilla de Magnolias (Acatkiller, 2014).	9
Figura 6:	Plantas madres de Magnolia.	30
Figura 7:	Explante inicial.	31
Figura 8:	(A) Explantes usados en desinfección. (B) Lavado con detergente comercial 6% p/v (C) Lavado con fungicida 1% v/v (D) Lavado con solución de alcohol al 70% (E) Tratamiento con hipoclorito de sodio.....	33
Figura 9:	(A): Explante viable. (B) Explante contaminado con hongo. (C) Explante contaminado con bacteria.	34
Figura10:	(A) Explante con 3 brotes. (B) Explante con brote. (C) Explante viable. (D) Explante necrosado.....	36
Figura11:	(A) Explante con brotes a partir de yema apical. (B) Explante con brotes a partir de yema axilar. (C) Explante necrosado.....	39
Figura 12:	Porcentaje de contaminación de cada tratamiento respecto al día evaluado.	41
Figura 13:	Porcentaje de contaminación en base a la variación de los tratamientos.....	44
Figura 14:	Número de explantes contaminados respecto al tiempo de inmersión en una solución de NaClO al 1,5%, 2%, 2,5%.	45
Figura 15:	Explantes contaminados respecto al tiempo de inmersión a concentraciones de NaClO 1,5%, 2%, 2,5% respectivamente.	46
Figura 16:	Porcentajes de necrosis de cada tratamiento respecto a los días evaluados.	47
Figura 17:	Porcentaje de explantes necrosados para cada tiempo de inmersión	

	en las distintas concentraciones de NaClO.....	50
Figura 18:	Número de explantes necrosados respecto al tiempo de inmersión en una solución de NaClO al 1,5%, 2% y 2,5%.	51
Figura 19:	Porcentajes de viabilidad de cada tratamiento respecto a los días evaluados.	52
Figura 20:	Porcentajes de explantes viables respecto al tiempo de inmersión en las diferentes concentraciones de NaClO.	55
Figura 21:	Variación de la viabilidad respecto al tiempo de inmersión.....	55
Figura 22:	Explantes con presencia de brotes respecto a los reguladores de crecimiento.	58
Figura 23:	Número de explantes con presencia de brotes con respecto a los reguladores de crecimiento	59
Figura 24:	Porcentajes de explantes viables respecto al tipo de regulador de crecimiento.	61
Figura 25:	Porcentajes de explantes viables respecto a los reguladores de crecimiento.	62
Figura 26:	Frecuencias porcentuales del número de brotes con respecto a cada tratamiento.	64
Figura 27:	Porcentaje de explantes con presencia de brotes respecto a reguladores de crecimiento (BAP, ANA y AIB).	67
Figura 28:	Viabilidad respecto a los tratamientos utilizados.	69
Figura 29:	Número de brotes desarrollados con respecto a la concentración y tipo de auxina utilizado.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Tratamientos propuestos para la fase de desinfección.....	32
Tabla 2:	Tratamientos propuestos para la fase de establecimiento.....	36
Tabla 3:	Tratamientos propuestos para la fase de multiplicación.....	37
Tabla 4:	Tabla de contingencia para los datos de la variable contaminación respecto a los tratamientos.	41
Tabla 5:	Prueba de Kruskal Wallis para la variable contaminación.	42
Tabla 6:	Prueba de Kruskal Wallis en función a la concentración NaClO...	43
Tabla 7:	Prueba de Kruskal Wallis en función al tiempo de inmersión.	43
Tabla 8:	Tabla de contingencia para los datos de la variable necrosis respecto al tiempo de inmersión a las diferentes concentraciones de NaClO.	47
Tabla 9:	Prueba de Kruskal Wallis para la variable necrosis.....	48
Tabla 10:	Prueba de Kruskal Wallis para la variable necrosis en función a la concentración.	49
Tabla 11:	Prueba de Kruskal Wallis para la variable necrosis en función al tiempo.	49
Tabla 12:	Tabla de contingencia para los datos obtenidos de viabilidad con respecto a cada tratamiento.....	52
Tabla 13:	Prueba de Kruskal Wallis para la variable viabilidad.....	53
Tabla 14:	Variable viabilidad con respecto a la concentración.	54
Tabla 15:	Variable viabilidad con respecto al tiempo de inmersión.....	54
Tabla 16:	Tabla de contingencia para los datos presentados para la variable presencia de brote respecto a cada tratamiento.....	56
Tabla 17:	Prueba de Kruskal Wallis para la variable presencia de brote.....	57
Tabla 18:	Tabla de contingencia de los resultados obtenidos para la variable viabilidad en la fase de introducción.	60
Tabla 19:	Prueba de Kruskal Wallis para la variable viabilidad en introducción.	60
Tabla 20:	Tabla de contingencia para los datos obtenidos en la variable número de brotes.....	63

Tabla 21:	Análisis para el número de brotes con respecto a la concentración de BAP y brasinolida.....	63
Tabla 22:	Tabla de contingencia para los datos obtenidos en la variable Presencia de brotes.	65
Tabla 23:	Prueba de Kruskal Wallis para la variable presencia de brote con respecto a auxinas.	66
Tabla 24:	Tabla de contingencia para los datos obtenidos en la variable viabilidad.	67
Tabla 25:	Prueba de Kruskal Wallis para la variable viabilidad con respecto a los tratamientos presentados.	68
Tabla 26:	Tabla de contingencia para los resultados obtenidos en la variable “número de brotes”.	70
Tabla 27:	Prueba de Kruskal Wallis para la variable número de brotes con respecto a los tratamientos presentados.	71
Tabla.28:	Tabla de contingencia para los datos de las variables contaminación, necrosis y muerte de cada tiempo de inmersión respecto a los días evaluados.	99
Tabla.29:	Tabla de contingencia de los datos obtenidos en la etapa de desinfección.	100
Tabla.30:	Tabla de contingencia de los datos obtenidos en la etapa de introducción.	100
Tabla 31:	Tabla de contingencia de los datos obtenidos en la fase de multiplicación (primera multiplicación).	101

LISTADO DE ABREVIATURAS

ANA	Ácido naftalenacético
BRA	brasinolida
BAP	6-Bencilaminopurina
GA3	Ácido giberélico
AIB	Ácido indol butírico
MSV	Medio Murashige & Skoog con vitaminas
DMQ	Distrito Metropolitano de Quito
gr.L⁻¹	gramo/Litro
°C	Grado centígrado
min	Minutos
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	hidroxido de sodio
NaClO	hipoclorito de sodio
MSV	Murashige y Skoog con vitaminas
pH	Potencial hidrógeno
EPMMOP	Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas
p/v	peso/volumen
p/p	peso/peso

RESUMEN

Magnolia es un árbol ornamental, usado para la elaboración de aceites esenciales, en medicina trata padecimientos del corazón, espasmos y tumores. Pero tiene un lento crecimiento, por esta razón se necesita de la producción a gran escala para obtener más plantas, disminuir costos, y permitir la diversificación de la misma. El presente trabajo buscó establecer el protocolo de desinfección, introducción y multiplicación *in vitro* a partir de yemas apicales de plantas juveniles de Magnolia (*Magnolia grandiflora*) para la producción masiva, repoblación y preservación de esta especie en el Distrito Metropolitano de Quito. En este proyecto, las yemas apicales fueron desinfectadas con NaClO en concentraciones 1,5-2,5%, en tiempos de inmersión de 10-20 minutos, en la introducción se colocó BAP ($1-3 \text{ mg L}^{-1}$) y BRA ($0,3 - 0,9 \text{ mg L}^{-1}$) durante 45 días. A continuación, los brotes formados se transfirieron a un medio de multiplicación en presencia de BAP ($2 \text{ y } 3 \text{ mg L}^{-1}$), ANA ($0,5-1,5 \text{ mg L}^{-1}$) y AIB ($0,5-1,5 \text{ mg L}^{-1}$), durante 45 días. Los resultados reflejaron que a una concentración del 2% y a un tiempo de inmersión de 10 minutos se obtuvo el 70% de viabilidad ($p < 0,0001$). En la fase de introducción se utilizó 3 mg L^{-1} BAP ya que presentó un promedio de 70% en presencia de brotes ($p = 0,0001$) y el 59,38% del total de brotes obtenidos ($p = 0,0001$). Para la etapa de multiplicación la dosis de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA y 2 mg L^{-1} BAP mostró el 80% del total de explantes con presencia de brotes ($p = 0,0049$).

Palabras clave: MAGNOLIA, BAP, ANA, IBA, BRA

ABSTRACT

Magnolia is an ornamental tree used in making floral arrangements, In medicine treats heart ailments, spasms and tumors. But it has a slow growth, for this reason we need the large-scale production for more plants, reduce costs, and enable diversification of it. This study sought to establish the disinfection protocol, introduction and multiplication *in vitro* from leaf buds tips of young plants of Magnolia (*Magnolia grandiflora*) for mass production, reforestation and preservation of this species in the Metropolitan District of Quito. In this project, apical buds were disinfected with NaClO at concentrations 1,5-2,5% by immersion times of 10-20 minutes, in the introduction the explants were placed in MSV medium in the presence of BAP (1-3 mg L⁻¹) and BRA (0,3 to 0,9 mg L⁻¹) for 45 days. Then the sprouts formed were transferred to a multiplication medium MSV, in the presence of BAP (2 and 3 mg L⁻¹), ANA (0,5-1,5 mg L⁻¹) and IBA (0,5 – 1,5 mg L⁻¹) for 45 days. The results showed that at a concentration of 2% and an immersion time of 10 minutes obtained 70% of viability (p<0,0001). At the introductory phase MSV was used with 3 mg L⁻¹ BAP and presented an average of 70% in the presence of leaf buds (p=0,0001) and 59,38% of leaf buds obtained (p=0,0001). For the multiplication stage the dosage of 0,5 mg L⁻¹ ANA and 2 mg L⁻¹ BAP showed 80% of explants with presence of leaf buds (p=0,0049).

Keywords: MAGNOLIA, BAP, ANA, IBA, BRA

CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema.

El Ecuador cuenta con una de las mayores biodiversidades del mundo, teniendo más de 20,000 especies vegetales diferentes y algunas en peligro de extinción, esto ocurre debido a la expansión desmedida de poblados, incendios forestales, entre otros; esta investigación busca la propagación *in vitro* de plantas de Magnolia (*Magnolia grandiflora*) a partir de ápices de las mismas en la provincia de Pichincha, para la preservación, producción masiva y para restaurar áreas deterioradas dentro del Distrito Metropolitano.

Magnolia (*Magnolia grandiflora*) es de origen americana aunque también ha sido introducida a Francia, México, Ecuador y otras partes del mundo; en el Distrito Metropolitano de Quito *Magnolia grandiflora* es utilizada para el ornamento de jardines, parques y puede llegar a ser considerada especie introducida de algunas zonas, en las cuales se adaptó correctamente a las condiciones ambientales y ahora está permanente en varios lugares como en la Hacienda las Magnolias en donde se hallan más de 100 árboles, los mismos que forman parte del paisaje que caracteriza al cantón.

Magnolia posee propiedades medicinales para el tratamiento de padecimientos cardiacos y problemas respiratorios (Cartagena, 2013); pero tiene un lento crecimiento, por esta razón se necesita de la producción a gran escala para obtener más plantas, disminuir costos, y permitir la diversificación de la misma para así tener mayor rentabilidad y poder explotar al máximo todos los beneficios.

La micropropagación *in vitro* de Magnolia (*Magnolia grandiflora*) se debe realizar a nivel industrial, debido a que, de esta planta se extraen aceites

esenciales que poseen beneficios contra el estrés, celulitis y la ansiedad; los mismos que son muy cotizados para la fabricación de perfumes y aceites para masajes que actúan como estimulante emocional positivo para personas con depresión.

Magnolia (*Magnolia grandiflora*) tiene problemas de vitrificación, además una alta producción de fenoles y alto índice de contaminación en etapas previas al enraizamiento (Cartagena, 2013); por lo que resulta de gran importancia tener un protocolo estandarizado en las etapas iniciales de este cultivo para tener plantas de Magnolia libres de contaminación, y con características deseadas *in vitro* para las etapas anteriores al enraizamiento.

Debido a estas necesidades, varios investigadores han mostrado interés en la propagación *in vitro* de Magnolia, y se han realizado estudios como el propuesto por Cartagena, (2013) en el que se evaluó el efecto de auxinas y citoquininas sobre la fases de enraizamiento del cultivo *in vitro* de Magnolia (*Magnolia grandiflora*) con miras a la propagación masiva, así como también el estudio de Flores, (2006) en el que se realizó propagación por acodo aéreo en la especie de Magnolia (*Magnolia grandiflora*).

Justificación.

En Ecuador la Magnolia (*Magnolia grandiflora*) es un árbol apreciado por su olor característico, y debido a que brinda una buena rentabilidad, por lo que se procura tener un cultivo masivo; no obstante por los grandes incendios y la demanda de terrenos para ser poblados, la Magnolia está siendo amenazada, según Gómez (2010) es una especie en riesgo de extinción a nivel mundial. Por lo que se está buscando una manera de repoblar los bosques del Distrito Metropolitano de Quito y evitar un desequilibrio ecológico (Santillán, 2003).

Son plantas ornamentales empleadas en la elaboración de arreglos florales, decoración de los exteriores de casas, con fines de estética y diseños de parques de la urbe, sin embargo la importancia de la Magnolia no se limita únicamente a su valor ornamental, debido a que se usan otras partes de la planta, como la madera es usada para la fabricación de muebles, también en la industria se elaboran aceites esenciales para la fabricación de perfumes, inciensos y ambientadores (Flores, 2006). En medicina las flores se emplean para tratar padecimientos del corazón y actúa como diurético, mientras que las hojas son usadas como astringentes, antiespasmódicas y antitumoral (Cartagena, 2013).

El estudio realizado por Cartagena (2013) sugiere que debería existir una estandarización de los protocolos previos al enraizamiento, es por ese motivo que se plantea este proyecto con el fin de tener protocolos validados y completamente funcionales que permitan producir plantas de Magnolia (*Magnolia grandiflora*) a gran escala y en un tiempo corto, ya que esta especie es muy cotizada por sus grandes beneficios industriales, medicinales y a su vez se ayudará a fortalecer la presencia de esta especie en la reforestación de parques, para así brindar alternativas y satisfacer la demanda de árboles ornamentales en los parques y jardines del Distrito Metropolitano de Quito y con esta metodología de cultivo *in vitro* preservar y multiplicar esta especie.

Además permitirá conocer el comportamiento de Magnolia (*Magnolia grandiflora*) en condiciones de laboratorio y contribuirá en posteriores estudios para desarrollar nuevas estrategias científicas tanto en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Unidad de Espacio Público (UEP) como en otros establecimientos. También al hacer propagación *in vitro*, disminuirá los costos y permitirá la diversificación de las especies; gracias al uso de esta técnica se alcanza actualmente elevados niveles en la producción de plantas a partir de yemas apicales, siendo este el método más utilizado debido a sus grandes ventajas con respecto a los métodos tradicionales de propagación asexual (Pérez J. , 1998).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general del proyecto

Establecer los protocolos de desinfección, introducción y multiplicación *in vitro* a partir de yemas apicales de plantas juveniles de Magnolia (*Magnolia grandiflora*) para la producción masiva, repoblación y preservación de esta especie en el Distrito Metropolitano de Quito.

1.2.2. Objetivos específicos del proyecto

- Estandarizar un protocolo de desinfección de yemas apicales para (*Magnolia grandiflora*) con el propósito de controlar la contaminación exógena.
- Establecer un medio de cultivo óptimo para la introducción e inducción de brotes de *Magnolia grandiflora*.
- Evaluar el efecto de dos auxinas (ácido Indolbutirico y ácido α naftalen acético) en la etapa de multiplicación para establecer el medio de cultivo más apropiado.

1.3. Marco teórico

1.3.1. *Magnolia grandiflora*

La Magnolia (*Magnolia grandiflora*) conocida con el término “chuan how pow” en China, es una planta nativa de América del Norte, pero fue introducida a comienzos del siglo XVIII en Francia y es ahora considerada parte del Ecuador.

1.3.2. Nombre científico

Villavicencio & Pérez (2006), manifiesta que el nombre científico de la Magnolia es *Magnolia grandiflora*. El nombre fue otorgado en honor a Pierre Magnol director del jardín botánico de Montpellier en Francia (Flores, 2006).

1.3.3. Clasificación taxonómica

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta / Fanerógamas
- Subdivisión: Angiospermas
- Clase: Magnoliopsida / Dicotiledóneas
- Subclase: Magnoliidae
- Orden: Magnoliales
- Familia: Magnoliaceae
- Género: Magnolia
- Especie: *M. grandiflora* L.
- Nombre Común: Magnolia, Magnolio, Southern magnolia, Magnolia foétida, Magnolia de hoja perenne, árbol de la gran flor (Cronquist, 1986).

1.3.4. Descripción botánica y morfológica

Magnolia grandiflora, es un árbol muy vistoso con follajes densos, en esta especie se forman hojarascas debido al manto formado por sus hojas secas en el suelo (Cartagena, 2013), es un árbol grande perennifolio de 5 m hasta 30 m de alto, con crecimiento lento (Betancour, Adolfo, & Rivera, 2008); tallo erecto, piramidal y ramificado desde la base. En la rama se repite el mismo modelo de

ramificación. Las hojas son cordiformes, de 17 a 30 cm de longitud, de formación continua y las hojas inferiores se caen sucesivamente, quedando el tallo principal y la parte inferior de las ramas desprovistas de hojas. El fruto de 5 a 7 cm de largo es ovoide de color amarillo verdoso a anaranjado con jaspes longitudinales y mesocarpio anaranjado, en ocasiones, sus flores son calificadas de arcaicas por su modo de eclosionar y por su sistema de fecundación.

1.3.4.1. Corteza

Ligeramente acanalada y follaje vistoso, Inicialmente es lisa y de color castaño claro, con el paso del tiempo se torna rugosa con coloración gris oscuro, la corteza es aromática y amarga (Gray, 1864). La corteza consta de 4 glucósidos la magnolidina, cyringina, monoglicosido del syringaresinol y la magnolenina (González, 1997).



Figura 1: Corteza de *Magnolia grandiflora* tomada en la Plaza Grande.

1.3.4.2. Hojas

Las hojas alternas, aparecen en grupo y son amplias de 12 a 20 cm de largo y de 7 a 10 cm de ancho, tienen forma elíptica a oblongo-ovada y consistencia dura (Duncan & Duncan, 1988), perennes con aspecto verde brillante en el haz, en el envés color pardo con pelitos de color rojizo de forma variable, los márgenes un poco ondulados (Claud & Kirman, 1990), coriácea, tienen 2 estípulas libres, la base es cuneada, y el ápice agudo o acuminado, en algunas hojas se puede observar el ápice obtuso; su textura es coriácea, con un nervio central prominente, se renuevan cada 2 años (Evangelista, 2009).



Figura 2: Hojas de *Magnolia grandiflora* tomada en la Hacienda las Magnolias.

1.3.4.3. Flores

Las flores son de color blanco cremoso con pétalos carnosos y grandes, miden de 15 hasta 30 cm de diámetro; presentan los órganos masculinos y femeninos en la misma flor (López, 2006), se encuentran solitarias y erguidas sobre gruesos pedicelos. Poseen brácteas espatáceas, coriáceas y tomentosas. Tiene 3 sépalos de aspecto petaloide; pétalos de 6 a 9 o incluso 12, ovalados u

ovados, los más internos son algo cóncavos y coriáceos; se forma un estrechamiento de los pétalos los mismos que se insertan en la flor (unguiculados). Androceo posee numerosos estambres, con los filamentos de 15-25 mm, purpúreos en la parte inferior (Sánchez, 2014). Se localizan en las puntas de las ramas y aparecen a finales de la primavera y principios del verano, son poco duraderas pero abundantes que se las puede apreciar durante largo tiempo (Brown & Kirkman, 1990).

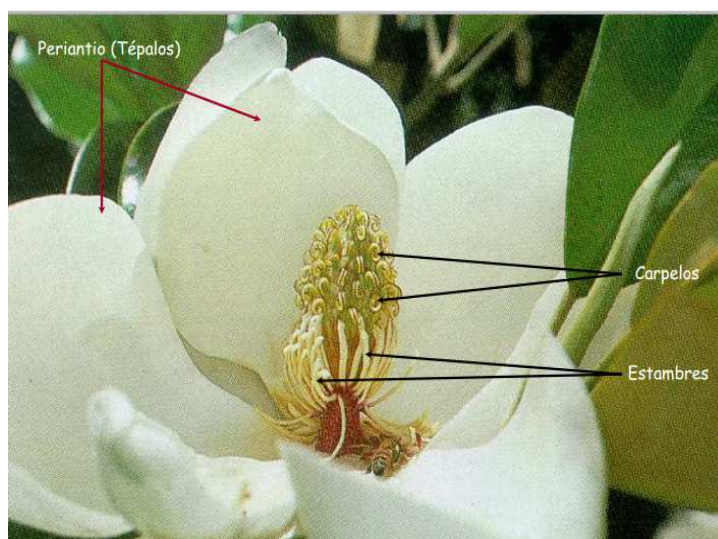


Figura 3: Flor de *Magnolia grandiflora* (euita, 2014).

1.3.4.4. Fruto

Los frutos son similares a una piña, con forma de cono cilíndrico, de 7,5 a 10 cm de longitud, Se encuentran tapados de una pubescencia fina que es de una coloración verde claro en la juventud y marrón claro en la maduración (Odenwald & Turner, 1996).



Figura 4: Fruto de *Magnolia grandiflora* tomada en la Hacienda las Magnolias.

1.3.4.5. Semilla

Las semillas poseen una forma ovoide, aplanada y lisa, tienen la coloración rojo brillante, miden de 1 a 1,3 cm de longitud, (Sánchez, 2014) cuando se encuentran maduras se suspenden por un folículo filiforme al folículo, su maduración ocurre en septiembre y octubre (Odenwald & Turner, 1996).



Figura 5: Semilla de Magnolias (Acatkiller, 2014).

1.3.4.6. Raíz

La raíz de Magnolia es axonomorfa, esto quiere decir que la raíz principal crece verticalmente formando un centro por donde van a brotar las raíces secundarias, la raíz es poco profunda y carnosa, suele ser muy frágil; (Odenwald & Turner, 1996) se alimenta por las raíces superiores por lo que es muy sensible en grandes profundidades y puede provocar un retraso en el crecimiento (Cartagena, 2013).

1.3.5. Componentes

La magnolia posee los siguientes componentes:

Aceite esencial.- Es obtenido a partir de las flores y hojas de la planta (*Magnolia grandiflora*), la extracción de los aceites esenciales se realiza con solventes, tratamiento con alcohol y después la destilación a baja presión, en la cual se obtiene mayoritariamente el b-cariofileno que es un sesquiterpeno bicíclico que da el olor característico a la magnolia (Jiménez, Cordero, Rojas, & Rodríguez, 2007).

Resina.- Secreción producida mayormente en la corteza de la planta, que tiene acción antiinflamatoria, y de protección a la planta (Hernández & Gally, 1981).

Magnolina.- se produce a partir de los extractos de hojas de *Magnolia grandiflora* tiene acción hipotensora; es un compuesto benzilizoquinolínico, alcaloide. (Lozoya & Lozoya, 1982); La magnolina es de gran valor en la industria farmacéutica (Vazquez, y otros, 1987).

Glucósidos.- Es de consistencia resinosa debido a que es un componente esencial de la resina que secreta la planta de *Magnolia grandiflora*. El principal glucósido que se encuentra en la planta es la magnolidina (González, 1997).

Alcaloides.- Son obtenidos de las hojas de la planta, estos alcaloides provocan la inhibición de centro vasomotor y un efecto periférico de tipo adrenolítico.

(Lozoya & Lozoya, 1982). Los principales alcaloides son la magnolina y la magnolamina (Vazquez, y otros, 1987).

1.3.6. Factores ambientales y edáficos

Clima: Se desarrolla en clima templado subhúmedos también en clima caliente y húmedo (Flores, 2006).

Temperatura: Tolera temperaturas entre 17-24 °C; resistente a temperaturas bajas pero no soporta heladas prolongadas ni temperaturas altas (Flores, 2006).

Suelo: Crece en suelos ligeros, profundos, húmedos, bien drenados, fértiles, rico en materia orgánica, decalcificado y ligeramente ácidos o neutros (Flores, 2006).

Exposición: Necesita del sol la mayor parte de tiempo, tolera vientos moderados (Flores, 2006).

Fertilización: Necesita fertilizantes ricos en nitrógeno, fósforo y potasio para beneficiar la floración (Martínez y Chacalo, 1994).

Humedad: No requiere gran cantidad de agua debido a que con humedad relativa alta las raíces se pudren (Flores, 2006).

Plantación: por la fragilidad de las raíces se debe plantar *Magnolia grandiflora* en etapa joven y tener una distancia de 8 m entre planta (Flores, 2006).

pH: Varía entre 5,4 a 7,0, siendo óptimo un pH de 6,5 a 7,0.

1.3.7. Usos y bondades

La magnolia (*Magnolia grandiflora*) tiene múltiples usos; es empleada como ornamento en parques y jardines, y es considerada como uno de los arboles que mas decoración brindan, con una imagen elegante y distinguida por su frondosidad y sus llamativas flores (López, 2006). La madera tiene color claro, textura fina, es de consistencia dura muy durable, pesada, fácil de tornear (Bárceñas, Ortega, Álvares, & Ronzón, 2005), gracias a esto la madera es usada

para la fabricación de muebles, paneles, molduras, objetos de artesanías y chapas. (Sánchez, 2014), a pesar de esto su lento crecimiento limita su producción a gran escala (Weaver, 1997).

Industrialmente se utilizan las flores y hojas para obtener el aceite esencial que posterior va a ser usado para la fabricación de perfumes, inciensos y ambientadores (Flores, 2006). En medicina se emplea *Magnolia grandiflora* para tratar dolencias del corazón; para calmar los nervios, aliviar cólicos, dolor de pies, tratar la bilis, parálisis; es usado también para tonificar el bazo, el estómago, el pulmón y el intestino grueso; contrarresta la fiebre, la leucorrea, diarrea, es antimicrobiano (Schlie & Luna, 2008). Las hojas son astringentes y se usan para tratar la hiperuricemia; las flores so antiespasmódicas y usadas en la epilepsia y la neurosis (Evangelista, 2009). En Estados Unidos es usado como antimalárico, y en la medicina tradicional china contra el frío, dolor de cabeza y dolor de estomago (Jiménez, Cordero, Rojas, & Rodriguez, 2007).

1.3.8. Cultivo *in vitro*

Este tipo de propagación se fundamenta en la Totipotencia celular, que es la capacidad de regeneración de las células para formar una planta completa. El cultivo de tejido *in vitro* consiste en diseñar un medio de cultivo idóneo que permite propagar un explante en condiciones asépticas, condiciones artificiales controladas y, en un medio de cultivo estéril en donde, el resultado son plantas genéticamente idénticas es decir con fenotipo y genotipo similares; principalmente se utiliza para la producción de plantas libres de virus y enfermedades, pero también permite mayor producción en menor espacio y tiempo (Pierik R. , 1999). Dependiendo del cultivo *in vitro* que se va a realizar, sea este cultivo a partir de callo, cultivo de células o meristemas, se requiere un medio específico, el cual contiene sales minerales de macronutrientes y micronutrientes, vitaminas, hormonas (citoquininas, giberelinas, brasinoesterioides y/o auxinas), azúcar, entre otros; el cultivo sembrado se incuba en condiciones ambientales controladas (luz, temperatura, humedad relativa,

etc.), imitando en lo posible las condiciones de campo (Roca & Mroginski, 1993).

1.3.8.1. Factores influyentes

Para el desarrollo de las plantas *in vitro* influyen algunos factores físicos como la luz, temperatura, humedad relativa y la concentración de O₂ y CO₂ (Villalobos, Ramírez, & Salgado, 2002).

Luz: la luz que está dada primero por la intensidad que debe ser entre 1000-5000 lux, esto siempre va a variar dependiendo de qué especie se trata, también el fotoperiodo que es de entre 12 – 16 hrs que de igual manera dependerá del tipo de cultivo que se esté tratando, existen cultivos que no necesitan luz. Estos factores van a ser los que determinen el progreso de las plantas (Pierik R. , 1999).

Temperatura: la temperatura esta en un rango de 24 a 26°C dependiendo de la especie y de sus condiciones in vivo, teniendo como temperatura más baja 18°C (especies bulbosas), y alta de 29°C (especies tropicales).

Humedad relativa: la humedad en el medio de cultivo es relativamente alta por lo que no influye mucho la humedad del cuarto en las plántulas (Roca & Mroginski, 1991).

Concentración de O₂ y CO₂: el uso de agitación en medios líquidos mejora el suministro de oxígeno (Torres, 1997). La concentración de CO₂ siempre va a ser alta dentro del medio de cultivo, por lo que no se debe adicionar CO₂ al medio de cultivo (Trujillo, 2004).

1.3.8.2. Medio de cultivo

Se debe seleccionar el medio ideal para el crecimiento del material vegetal, el mismo que va a contener todos los elementos que se necesita para obtener una respuesta deseada, usualmente contiene soluciones de sales,

vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimientos y una fuente de carbono (George, 2008), se debe tener en cuenta la manera en que se prepara el medio de cultivo (Roca & Morginski, 1991).

Sales inorgánicas

Las sales minerales son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, necesitan de algunos elementos como el carbono, hidrógeno y oxígeno para generar vida, también precisan de otras sales importantes, las cuales se subdividen en macroelementos y microelementos.

Al primer grupo se lo denomina así, porque la planta requiere altas cantidades de estos minerales para la vida y son, el nitrógeno que participa en la síntesis de proteínas y forma parte de los aminoácidos y nucleótidos, el fósforo se encuentra como fosfato de potasio monobásico, es el encargado de regular los procesos enzimáticos y actúa en el metabolismo energético, el azufre ayuda a la formación de la fosfosulfato de adenosina, el calcio mantiene la integridad de la membrana celular, el potasio activa enzimas implicadas en el metabolismo de los hidratos de carbono y proteínas, y el magnesio forma parte de la estructura de la molécula de clorofila; (Hurtado & Merino, 1988).

Los microelementos en cambio se los requiere en cantidades mínimas (< de 0,5 mmol/L) aquí se encuentra el hierro, zinc y molibdeno que forman parte de ciertas enzimas, el manganeso que forma parte de importantes enzimas involucradas en el transporte de electrones, y el boro involucrado en el metabolismo de los hidratos de carbono y ácidos nucleicos, el mismo que es importante en la germinación de los granos de polen y en el crecimiento del tubo polínico (Pierik R. , 1999).

Para tener una planta con un balance en sales orgánicas (macroelementos y microelementos) se debe tomar en cuenta algunos aspectos importantes (White, 1989):

- Debe existir una concentración de sales que supla todas las necesidades de la planta. Se debe usar medios como MS, MSV dependiendo el requerimiento de cada especie; evitando medios que carecen de sales como es el medio White.
- Se añade nitrógeno en forma orgánica como es el caso de la glutamina que es un precursor de varios aminoácidos, o en forma de iones amonio (NH_4^+) y nitratos (NO_3^-), en concentraciones que varían de 12-60 mmol/L (Guerra & Nodari, 2014).

Compuestos orgánicos

- Carbohidratos.- Es necesario adicionar una fuente de carbono al medio de cultivo para un correcto crecimiento y desarrollo, los carbohidratos pueden reemplazar al carbono que las plantas toman del ambiente para iniciar la fotosíntesis (George, 2008), ya que *in vitro* pocos cultivos son autótrofos (White, 1989).

La sacarosa es la fuente de carbono más utilizada debido a que es sintetizada en forma natural por la planta, se adiciona una concentración del 2 % al 5% al medio de cultivo, se puede usar también glucosa, fructosa, maltosa o galactosa (Roca & Mroginski, 1993). El mioinositol también es usado como fuente de carbono y permite un mejor desarrollo y crecimiento de los callos y suspensiones celulares (King, 1984).

- Reguladores de crecimiento.- Las hormonas son sintetizadas por plantas superiores, se encuentran en pequeñas cantidades, ayudan al crecimiento y desarrollo de las plantas, son moléculas activas y de rápida degradación (Pierik R. , 1999). Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos encargados de activar o inhibir procesos fisiológicos, controlan el crecimiento a nivel celular y distribuyen los compuestos que la planta biosintetiza ya que controlan la mayor parte de las actividades fisiológicas (Hurtado & Merino, 1988).

Los reguladores de crecimiento vegetal se dividen en: (Leopold & Kriedemann, 1975) promotores del crecimiento, en este grupo se encuentran las auxinas, citoquininas y giberelinas, a estas hormonas se las puede usar juntas o aisladas, siempre teniendo un balance, para que la planta no se sobresature y se logre un resultado idóneo (Roca & Mroginski, 1993); los inhibidores del crecimiento en donde se encuentra el ácido abscísico; y el etileno.

Promotores del crecimiento

Auxinas: Las auxinas tienen fuerte polaridad en el transporte en plantas; se encuentran en mayor cantidad en las regiones meristemáticas que están en crecimiento activo. Las auxinas están como moléculas libres en concentraciones de entre 1 a 100 mg/kg, o conjugadas inactivas en donde se encuentran unidas a compuestos con un peso molecular bajo (González, 1997); ayudan en el crecimiento de las plantas y son promotores de la citocinesis en el cultivo de tejidos.

Existen auxinas naturales, la más usada es el ácido indolacético (AIA), aunque también se encuentra el etilindol-3-acetato, indol-3-acetonitrilo, indol-3-acetamida, indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído; se puede usar también auxinas sintéticas como el ácido dicloro fenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB); pero la concentración depende mucho de cada planta por esta razón no se ha podido establecer una concentración estándar, que sirva para todos los cultivos (Roca & Mroginski, 1993). Las auxinas se disuelven en una solución de etanol o hidróxido de sodio (White, 1989).

Estas sustancias ayudan a la división celular, formación de raíces adventicias, promueven la expansión de los tejidos y la inducción de callos, inhiben la formación de vástagos tanto axilares como adventicios (Murashige, 1974); sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que permite la embriogénesis en cultivos en suspensión (Trujillo, 2004);

ayudan también en el crecimiento y maduración de frutas, estimula la floración, senectud y geotropismo.

Concentraciones mínimas de auxinas ayudan a la formación de raíces adventicias; y altas concentraciones permiten la formación de callo. En las auxinas el mecanismo para el alargamiento celular está mediado en parte por una acidificación que permite un debilitamiento de la pared celular. Se usan con mayor frecuencia IBA y ANA para el enraizamiento *in vitro*, en tanto para la formación de callo se usa el 2,4-D, que en concentraciones elevadas puede ser tóxica debido a que provoca mutaciones e inhibe la fotosíntesis (Murashige & Tucker).

Se usa en concentraciones de 0,1 a 1mg/L (Roca & Mroginski, 1993), va a variar la concentración dependiendo de la auxina, especie y otros factores, el 2,4-D es usado en concentraciones de 1 a 5 mg/L; el ANA varía entre 1 a 10 mg/L (Alemán, 2006). Las auxinas pueden ser usadas en conjunto con citoquinas, para cambiar el desarrollo de las células indiferenciadas en cultivo *in vitro*; colocar cantidades similares de estas dos fitohormonas produce la formación de callo, si existe mayor cantidad de auxinas que citoquinas se van a formar raíces, mientras que si sucede lo contrario se formarán yemas (García, 2014).

Citoquinas: Se producen en los meristemas y en la punta de las raíces, se encuentran altas concentraciones de citoquinas en embriones y frutas en desarrollo (Pierik R. , 1999), esto produce una fuente rica en nutrientes cabe mencionar que si se encuentran en hojas estas son inmóviles, las citoquinas estimulan la división celular, ayudan a inducir el crecimiento de las yemas adventicias en callos y órganos, permite la propagación de tallos axilares por el rompimiento de la dominancia apical (Murashige & Skoog, 1962).

Intervienen en la estimulación de la pérdida de agua por transpiración (García, 2014), influyen en la germinación de semillas, permiten de la formación de frutas sin semillas. Las citoquininas son derivados

purínicos mayormente de la adenina (Hurtado & Merino, 1988). Altas concentraciones de citoquinas (1-10 mg/L) promueven la formación de vástagos adventicios y axilares, retarda el envejecimiento e inhibe la formación de raíces (Murashige & Tucker, 1969).

Se usa en cultivo de tejidos la kinetina (KIN), la misma que solo actúa en presencia de una auxina, benzilamino purina (BAP), y zeatina (ZEA) (Gamborg, Miller, & Ojeina, 1968). Las citoquinas también se encuentran en mínimas cantidades en el agua de coco, néctar de tomate, extractos de flores, nódulos radicales, en frutos, semillas. Se disuelven en soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (Pierik R. , 1990).

Giberelinas: son diterpenos termolábiles que se extraen del hongo *Gibberella fujikuroi*, las giberelinas alteran la distribución de calcio en los tejidos, para inducir la elongación y el crecimiento, generalmente la planta sintetiza cantidades normales de esta hormona y no siempre se debe adicionar al medio (García, 2014), hoy en día se conocen 90 giberelinas diferentes pero todas estas no siempre se pueden encontrar en la misma planta (Aleman, 2006) y varían en estructura y actividad (García, 2014).

Participan en la división y elongación celular, incrementa el tamaño de las regiones subapicales, ayudan en el alargamiento de los entrenudos y en el crecimiento de los meristemas o yemas *in vitro*; también pueden romper la dormancia de embriones aislados o yemas, inhiben la formación de raíces y vástagos adventicios (Pierik R. , 1990), a menudo las giberelinas vuelven a los tallos largos y delgados; además permite la germinación de la semilla de cereales gracias a que activa la enzima α –amilasa.

El GA3 pierde el 90% de su actividad biológica cuando es sometido al autoclave por lo que es mejor dispensarlo en una cámara de flujo laminar (Pierik R. , 1990); (Roca & Morginski, 1991); *in vitro* se usan concentraciones entre 0,01 a 1 mg/L (Schroeder, 1953), con un punto

óptimo de 0,1 mg/L, esto va a estimular entre otras funciones la formación de callos cuando se encuentra combinado con las auxinas (Roca & Mroginski, 1993).

Inhibidores del crecimiento

Acido abscísico (ABA) es un sesquiterpenoide que esta de forma natural en plantas en las bases ováricas de los frutos encontrándose en mayor cantidad cuando los frutos están maduros (Garcia, 2014), actúa negativamente en propagación *in vitro* porque estimula el cierre de los estomas, inhibe el crecimiento del tallo debido a que bloquea el efecto de las giberelinas, induce la latencia celular, pero dependiendo del explante puede evitar la oxidación celular, ayuda en la maduración de embriones, facilita la sincronización de la división celular en cultivos de células en suspensión (Pierik R. , 1999), activa inhibidores de proteasas en respuesta a heridas en semillas y estimula la síntesis de proteínas de almacenamiento (Garcia, 2014).

Etileno

El etileno se halla en estado gaseoso, está presente en cultivo de callos, permite la formación de vástagos adventicios, interviene en la embriogénesis y formación de órganos en gimnospermas (Pierik R. , 1990); en recipientes plásticos provoca inhibición del crecimiento.

- **Vitaminas.-** Las vitaminas son compuestos químicos no indispensables pero necesarios para la célula vegetal, debido a que la falta de alguna de ellas limita la organogénesis (Alemán, 2006), en las planta se sintetizan en pequeñas cantidades, por esta razón se deben adicionar al medio de cultivo, la concentración a usarse va a depender de la especie y del tipo de cultivo que se quiere llegar a tener (George, 2008).

Están presentes en procesos metabólicos, como es el crecimiento y desarrollo de la planta. En cultivos vegetales, encontramos vitaminas como la tiamina usada en concentraciones de 0,1 a 5 mg/L, el ácido ascórbico el cual inhibe la oxidación del material vegetal el mismo que es usado en concentraciones de 1 – 100 mg/L la piridoxina, la niacina (Roca & Mroginski, 1993), ácido pantoténico, biotina, riboflavina, ácido fólico, tocoferol, ácido cítrico (50 –100 mg/L) y colina (Peña, 2009). También se usa el mioinositol que actúa sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis, se debe adicionar concentraciones de entre 50 – 500 mg/L (Alemán, 2006).

- Aminoácidos.- Los aminoácidos deben ser usados con cautela ya que cada especie vegetal va a tener distinta respuesta, y un mal manejo de estos suplementos puede ocasionar un problema en la nutrición de las células (Roca & Mroginski, 1993). Existen células capaces de sintetizar correctamente todos los aminoácidos necesarios, la adición de L-glutamina en concentraciones de 2 - 8 mmol como fuente de nitrógeno o una mezcla de aminoácidos es a menudo beneficiosa para estimular la formación de vástagos adventicios. (Pierik R. , 1999).
- Antioxidantes.- Los antioxidantes son usados en explantes que tienen gran cantidad de fenoles que se producen por respuesta a la manipulación *in vitro* lo cual provoca la necrosis del explante. Los antioxidantes más usados son el ácido cítrico, ácido ascórbico y la cisteína, se debe tomar en cuenta que algunos compuestos son termolábiles y no soportan ser autoclavados (Peña, 2009).
- Brasinoesteroides.- Los brasinoesteroides (BRs) son sustancias semisintéticas reconocidos en la actualidad como biorreguladores vegetales cuyo progenitor es el campesterol (Clouse & Sasse, 1998), se han usado en los últimos cinco años, mostrando resultados positivos en la organogénesis, morfogénesis, estimulando el crecimiento vegetal y

sobre el desarrollo de callos (Alemán, 2006). Se encuentran presentes en todo el reino vegetal terrestre y marino (algas y pteridiofitas), se incluyen además 5 especies de gimnospermas y 37 especies más de angiospermas (Choe, 2010).

Los brasinoesteroides son reguladores de origen natural, la brasinolida se extrajo por primera vez en el año de 1979 del polen de *Brassica napus*, (Adam, 1998) y hasta ahora es la más efectiva biológicamente (Fujioka & Akira, 2003), son productos naturales usados en bajas concentraciones porque ahí es donde mejor resultado muestran, se encuentran altos niveles en grano de polen inmaduro, mostrando su desempeño en la fertilización de las plantas; los brasinoesteroides naturales son el brasinólido, el 24- epibrasinólido y el homobrasinólido; pero existen otros como la castasterona, tifasterol, teasterona y la 6-deoxocasterona.

Son efectivos para estimular el crecimiento y desarrollo de tejidos de varias especies (Hassan, 2004), estimulan la división celular, mejorar el rendimiento de cultivos, aumenta la resistencia a plagas y enfermedades, se adapta mejor a condiciones de estrés, permite la polarización de la membrana y bombeo de protones, brinda un mejor desarrollo vascular y reproductivo; además apresuran la maduración de la cosecha (Iglesias, Pérez, & Coll, 2000). Bajas concentraciones ayudan a la elongación en hipocótilos, epicótilos y pedúnculos en las dicotiledóneas y también en coleótilos y mesocótilos (Clouse & Sasse, 1998).

Intervienen también en la diferenciación sexual y la obtención de plantas haploides estables (Clouse & Sasse, 1998). El cambio de temperaturas, concentraciones salinas altas, bajos niveles de agua disponible mostró que los brasinoesteroides protegen a las plantas de diferentes cambios ambientales que les causen estrés (Dhaubhadel, Browning, Gallie, & Krishna, 2002).

Hasta ahora existen más de 50 moléculas de este tipo, y hoy en día ya se están haciendo brasinoesteroides sintéticos los cuales tienen resultados muy similares a los obtenidos con brasinoesteroides provenientes de fuentes naturales (Iglesias, Pérez, & Coll, 2000).

Agua

Es el 95% del medio de cultivo, un medio idóneo para el crecimiento de las plantas debe tener agua destilada, bidestilada y desionizada debido a que el uso de agua de las llaves puede contaminar y dañar el desarrollo del explante, por los microorganismos y la alta concentración de iones calcio que ocasionan la precipitación de componentes del medio (Roca & Mroginski, 1993).

Materiales inertes

- **Gelificantes.-** Los agentes gelificantes son usados como soporte de nutrientes y del material vegetal, entregan al medio un gel húmedo que va a alimentar al explante (Hurtado & Merino, 1988), se aplican concentraciones desde un 0,6% hasta un 1% (Roca & Mroginski, 1993); deben ser adicionados dependiendo del explante y del medio de cultivo al que se quiere llegar, observando siempre una densidad óptima para que el explante se mantenga fijo y pueda absorber los nutrientes, porque si se agrega demasiado agar la planta no va a tener los suplementos necesarios para vivir.

El agar es adicionado para tener un medio sólido. La pureza del agar es un factor importante para descartar posibles contaminaciones del medio, ya que agentes como impurezas en el agar, la marca comercial van a afectar la respuesta del material vegetal *in vitro* (Debergh, 1982).

También se puede usar como agente gelificante la poliacrilamida, agarosa, gelatina o gomas géllicas (Phytigel de Sigma, Gelrite de Merck) y la silicagel, la ventaja de estos agentes es que no interactúan con los

nutrientes del medio, tienen un pH neutro y no se digieren por enzimas vegetales. En medios líquidos se usa papel filtro como plataforma (Hurtado & Merino, 1988), pero se puede observar algunos problemas como es la hiperhidratación del explante.

- **Carbón activado.**- La madera es sometida a altas temperaturas en presencia de vapor, se da una carbonización para obtener carbón activado, el mismo que está formado por una red de finos poros, con una gran superficie interna que es usado en concentraciones de entre 0,2-3,0% p/v puede absorber todo tipo de sustancias, desde pigmentos tóxicos como son los productos de la oxidación fenólica, hasta vitaminas, hormonas, quelatos de zinc y hierro; se usa concentraciones elevadas en la etapa de enraizamiento para simular el medio externo obscureciendo el agar y ayudando así al crecimiento de raíces, de igual manera estimula la embriogénesis somática; promueve la organogénesis de especies leñosas (Pierik R. , 1999).

1.3.8.3. Etapas de propagación *in vitro*

Las etapas del cultivo *in vitro* de todas las especies vegetales son cinco bien definidas para obtener un resultado óptimo y confiable. Las etapas I a III, son *in vitro*, mientras que la etapa 0 y IV se desarrollan en el invernadero (Murashige, 1974).

a. Etapa 0. Selección de plantas donadoras

En la etapa cero o de preparación, se seleccionan y acondicionan las plantas madres que van a ser usadas para iniciar los cultivos *in vitro* y así obtener buena calidad en los explantes (Pérez, Ramírez, Núñez, & Ochoa, 1999). Esta etapa previene problemas de contaminación. Para esta etapa generalmente se usa explantes que provienen de yemas apicales y axilares, debido a que poseen tejido

meristemático y gracias a esto no genera variación somaclonal, logrando plantas genéticamente idénticas; para obtener una mejor respuesta *in vitro* y reproducción de la planta, se utiliza tejido joven ya que, el potencial de crecimiento no va estar reducido por senescencia (Roca & Mroginski, 1993).

La planta madre debe estar bajo condiciones cuarentenarias, esto quiere decir en condiciones controladas en cuanto a luz, temperatura y riego apropiado, durante un periodo de tiempo (Roca & Mroginski, 1993), para tener un explante con mejor desarrollo, crecimiento vigoroso, libre de patógenos (Castillo, 2004), y una correcta nutrición, en los cuales se va a utilizar el que posee las mejores características fenotípicas, para ayudar a tener un cultivo en condiciones de asepsia debido a que estas plantas van a tener menor contacto con microorganismos o patógenos (Pérez, Ramírez, Núñez, & Ochoa, 1999).

b. Etapa I. Desinfección

En esta etapa de iniciación se va a obtener plantas anéxicas y viables, para esto se selecciona el material vegetal de la planta madre (yemas, hojas, raíces o semillas), de donde se va a eliminar los contaminantes externos que se encuentran de manera natural en el ambiente (hongos y bacterias); los cuales pueden destruir el explante porque compiten con los contaminantes por los nutrientes del medio de cultivo; existiendo mayor la tasa de multiplicación y desarrollo en los microorganismos, dejando en desventaja al explante y provocando su muerte (Roca & Mroginski, 1993).

En la etapa de desinfección se lava el material vegetal con agua corriente para eliminar impurezas de gran tamaño; seguido de jabón, inmersión en una solución de hipoclorito de sodio, fungicidas de ser necesario y etanol al 70%; posterior a estos pasos se debe sembrar en la cámara de flujo laminar para una total asepsia (Pierik R. , 1999); los medios usados no van a tener reguladores de crecimiento (Roca & Mroginski, 1993) y se emplean medios de cultivos diluidos.

El problema en esta etapa es la contaminación endógena, debido a que existen especies que no expresan contaminación de inmediato y los microorganismos permanecen a lo largo de su vida; otro problema es la contaminación exógena y la oxidación fenólica (Orellana M. , 1997); La etapa de desinfección finaliza cuando el explante se encuentra viable y con un crecimiento y desarrollo libre de contaminación (Pérez, Ramírez, Núñez, & Ochoa, 1999).

c. Etapa II. Introducción del material *in vitro*

Después de la etapa de desinfección, el material vegetal se coloca en un medio de cultivo estéril; el medio a usar va a depender del objetivo al cual se quiera llegar (tejido desdiferenciado, yemas, raíces, u obtener embriones somáticos) (Roca & Mroginski, 1993).

El medio basal con el que se trabaja, va a preparar a los explantes a un sistema *in vitro*, que tiene condiciones ambientales controladas y nutrientes necesarios, de esta manera las plántulas no son en su totalidad autótrofas. Una vez sembrado el explante y, transcurridos de quince días a cuatro semanas dependiendo la especie, va a iniciar la regeneración de nuevos tejidos vegetales, lo cual va a dar inicio del ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo, 2004).

Existen varios medios de cultivo que son específicos para cada planta los cuales van a proporcionar el equilibrio nutricional del explante y permitir una deseada respuesta morfogénica (Pierik R. , 1999).

d. Etapa III. Multiplicación

Se la conoce también como etapa de propagación. El objetivo en esta fase es lograr el mayor número de brotes, que tengan hojas bien formadas, con el mayor vigor y en el menor tiempo posible, a partir de los explantes que están en contacto con el medio de cultivo (Castillo, 2004); el cual debe tener una correcta concentración de reguladores de crecimiento (citoquininas y auxinas).

Cabe mencionar que en esta etapa no se debe adicionar mas fitohormonas, únicamente en el primer medio de introducción, para que no haya una sobresaturación de hormonas, y así obtener la morfología deseada para la investigación (Alonso, 2002). Los nuevos brotes se van a subcultivar para obtener un mayor número de plantas, la cantidad va a variar dependiendo de la especie vegetal y las condiciones de siembra (Castillo, 2004). Con esto se logra una incrementación exponencial de plantas.

La multiplicación in vitro se puede realizar por organogénesis, y la multiplicación por yemas, ápices o meristemos (Krikorian, 1982). Y Uno de los problemas que se dan por un inadecuado manejo de las muestras en esta etapa es la vitrificación y la presencia de contaminantes.

e. Etapa IV. Enraizamiento

La etapa de enraizamiento da como resultado la formación del sistema radical; en esta etapa los brotes que tienen un tamaño aproximado de 2 cm, obtenidos durante la etapa de multiplicación deben adaptarse, y sobrevivir el cambio a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento, que solo posea fitohormonas de tipo auxinas (inducen una respuesta de enraizamiento) (Castillo, 2004), para lograr un mejor crecimiento de raíces, y obtener una plántula completa, que va a tener una mejor adaptación de las plantas al medio externo (Krikorian, 1982). Sin embargo, obtener las raíces por este medio es mucho más difícil que realizarlo durante el enraizamiento *ex vitro* (Bonga & Patrick, 1992).

Los factores físicos que van a ayudar al enraizamiento son el estrés hídrico, temperaturas alta, poca intensidad lumínica y carbón activado (Orellana M. , 1997); Mientras que los factores químicos para que se dé el enraizamiento son la disminución en la concentración de sales minerales del medio de cultivo, la adición de elementos como Br, Ca y Mn, incremento en axinas siempre precautelando que se encuentre un balance hormonal adecuado, o por la adición

de fenoles y vitamina D (Bonga & Patrick, 1992). Algunas especies de plantas muestran el crecimiento de raíces en el mismo medio multiplicación transcurren en forma simultánea (Castillo, 2004).

f. Etapa V. Aclimatación.

En la aclimatación las plántulas que han sido enraizadas se van adaptar al medio exterior, los explantes son extremadamente sensibles y aun no están aptos a cambios ambientales bruscos, en esta etapa hay que adaptarlas paulatinamente al invernadero, porque es el mejor lugar para la aclimatación de las plántulas debido a que es aquí donde se va a disminuir de manera gradual la humedad relativa y aumenta paulatinamente la intensidad de luz.

El medio de cultivo *in vitro* satisface todos los requerimientos de carbono, y las plántulas no tienen la necesidad de realizar la fotosíntesis, por esta razón las hojas *in vitro* muestran una anatomía diferente que las *ex vitro*, son más delgadas y con menor contenido de clorofila (Bonga & Patrick, 1992).

Las plántulas en el medio de cultivo tienen condiciones mixotróficas, esto quiere decir que alternan entre el uso de hidratos de carbono, los mismos que se encuentran presentes en el azúcar y reguladores de crecimiento del medio, y la fijación de CO₂ cuando existe escasa intensidad de luz durante el periodo de incubación (Donnelly & Tisdall, 1993), es por eso que son muy susceptibles al trasplante y se debe realizar riegos continuos; las plántulas tampoco tienen activado el mecanismo de resistencia contra patógenos, por esta razón se debe trabajar en condiciones de asepsia en toda la etapa (Olivera, Gutiérrez, Gutiérrez, & Andrade, 2000).

El mayor problema en la aclimatación es la excesiva humedad relativa dentro del medio de cultivo, esto provoca que las plántulas carezcan o tengan atrofiados algunos sistemas, como en el caso de los estomas de las hojas, los cuales regulan la transpiración, estos se encuentran escasamente abiertos y no

responden apropiadamente a la reducción de la humedad, que dan como resultado la pérdida de agua (Bonga & Patrick, 1992), también la cutícula cérica no se encuentra bien desarrollada, y no sirve de barrera para retener agua en la superficie de la planta, provocando una desecación del explante (Castillo, 2004); para evitar esto necesita una constante irrigación (Dunstan & Turner, 1984), implementando un sistema de nebulización, el uso de bolsas plásticas o con micorrizas para estimular el enraizamiento *ex vitro* (Bonga & Patrick, 1992).

Para finalizar esta etapa las plántulas se plantarán en contenedores con sustrato suelto, poroso, en una mezcla de arena turba y cascara de arroz, que luego van a estar tapados con plástico que ayudará a que la humedad se mantenga en la planta, y va a permitir un mejor desarrollo y crecimiento de la raíz (Bonga & Patrick, 1992).

1.4. Hipótesis

Existe un protocolo de cultivo *in vitro* para el que la desinfección, introducción y multiplicación de explantes de Magnolia (*Magnolia grandiflora*) a partir de yemas apicales, tiene éxito significativo.

CAPÍTULO 2 : METODOLOGÍA

2.1. Localización del ensayo

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Unidad de Espacio Público (UEP) de la Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas del Distrito Metropolitano de Quito (EPMMOP), ubicado en la Av. Intervalles Km 2½, sector Cununyacu.

Provincia: Pichincha

Cantón: Quito

Parroquia: Tumbaco

Sector: Cununyacu

Latitud: 0°13'59"S

Longitud: 78°25'70"O

Altitud: 2 300 m.s.n.m

2.2. Cronograma de tesis

La tesis se desarrollo a partir del día 8 de julio del año 2013 en el Laboratorio de Micropropagación vegetal de la UEP. La primera semana se recibió una capacitación sobre el uso de los equipos del laboratorio, materiales, reactivos. El 15 de Julio del 2013 se inicio el desarrollo de la tesis y tuvo una duración de 10 meses.

2.3. Obtención de plantas madre

Las plantas madre de Magnolia (*Magnolia grandiflora*) fueron obtenidas en la Parroquia de Sangolquí, en la hacienda Las Magnolias ubicada en el cantón Rumiñahui, en el kilómetro 3,5 vía Amaguaña. Las plantas tienen una edad de entre uno a cinco años de edad y una altura promedio de 2 a 4 m. Las plantas se encontraron en condiciones ambientales controladas ya que por estar en una hacienda están debidamente cuidadas y fitosanitariamente tratadas.

Luego de la recolección se procedió a seleccionar las plantas que presentaron las mejores características fisiológicas y fenotípicas. A estas plantas seleccionadas se las denominó plantas madres (figura 2.1).



Figura 6: Plantas madres de Magnolia.

2.4. Selección, colecta y transporte del material

La recolección se ejecutó entre las 9 a 11 de la mañana una vez por semana, se realizaron cortes en las yemas apicales las cuales tuvieron un tamaño aproximado de 4 cm y estaban libres de enfermedades, luego los explantes seleccionados fueron transportados en fundas ziploc desde el lugar de recolección hacia el Laboratorio de Micropropagación Vegetal, en donde se las llevó al cuarto frío que se encuentra a la temperatura de 4 °C hasta su posterior utilización.

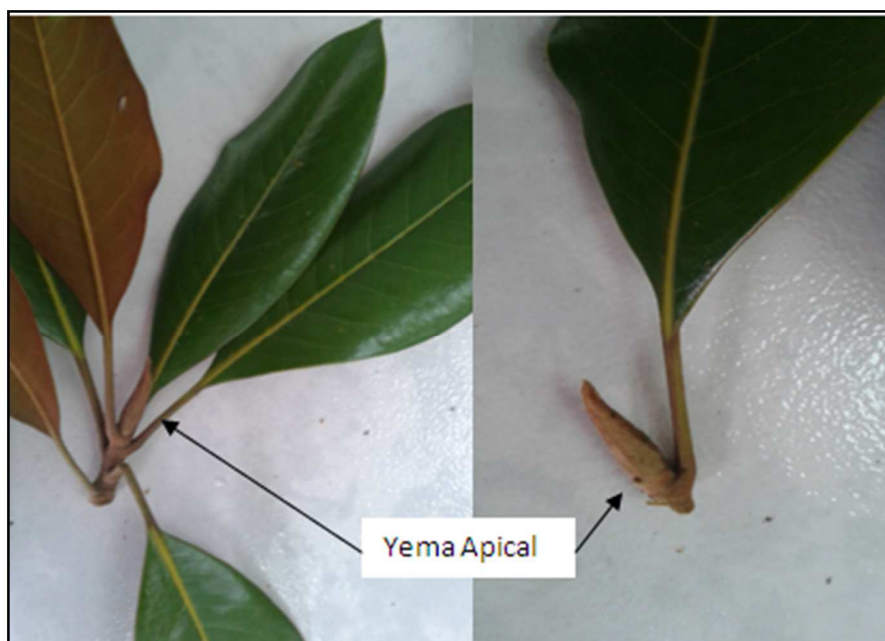


Figura 7: Explante inicial.

2.5. FASE I: Desinfección de los explantes

En el laboratorio se procedió a eliminar todas las hojas, dejando solamente la yema apical, (figura 2.3). Durante este procedimiento se utilizó tijeras de disección que fueron desinfectadas luego de cada corte con una solución de alcohol al 70% v/v.

Para el inicio de la desinfección a los nuevos explantes se los lavó con agua corriente por 30 segundos para eliminar impurezas de mayor tamaño, a continuación se sumergió en una solución de detergente comercial (6g/L) y jabón al 10% v/v, los mismos que estuvieron en agitación continua por 10 minutos, finalizado este paso se realizó tres enjuagues con agua estéril hasta eliminar completamente el detergente, posteriormente se colocó las muestras en una solución de fungicida (2-metoxicarbamilo-bencimidazol y bisulfuro de tetrametiltio carbamilo) a una concentración de 1% v/v por 20 minutos, seguido nuevamente por tres lavados consecutivos con agua estéril y después se sometió al material vegetal en una solución de alcohol al 70% por dos minutos, sin enjuagar.

Luego de esto los explantes, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio en un intervalo de concentración de 1% - 2%, durante 10, 15 y 20 minutos, finalmente se llevaron los explantes dentro de una cámara de flujo laminar (STREAMLINE®), para ello la cámara fue previamente esterilizada con luz ultra violeta durante 40 minutos, en donde se realizaron tres lavados con agua estéril y después se continuó la siembra definitiva (tabla 2.1) con el objetivo de impedir la contaminación y la oxidación. Finalmente se realizó cuatro lavados con agua estéril.

Tabla 1: Tratamientos propuestos para la fase de desinfección.

Tratamiento	Concentración (v/v) hipoclorito de Sodio	Tiempo de inmersión
T1	1,0 %	10 minutos
T2	1,0 %	15 minutos
T3	1,0 %	20 minutos
T4	1,5 %	10 minutos
T5	1,5 %	15 minutos
T6	1,5 %	20 minutos
T7	2,0 %	10 minutos
T8	2,0 %	15 minutos
T9	2,0 %	20 minutos

Todos los lavados e inmersiones se los realizó en agitación continua a 8000 rpm utilizando hot plates Bearnetead (USA) con agitadores.

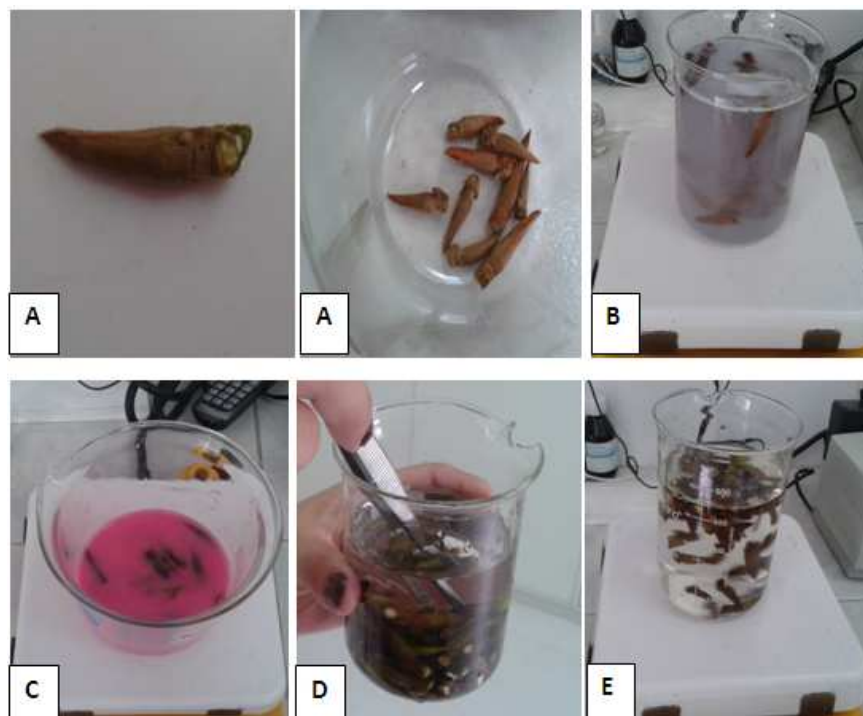


Figura 8: (A) Explantes usados en desinfección. (B) Lavado con detergente comercial 6% p/v (C) Lavado con fungicida 1% v/v (D) Lavado con solución de alcohol al 70% (E) Tratamiento con hipoclorito de sodio

Durante el transcurso de la siembra se eliminó las partes necrosadas por el proceso de desinfección, hasta observar un buen estado en el explante y se procedió a sembrarlos en tubos de ensayo de 25x200 que contienen el medio de cultivo. Para esta etapa se utilizó el medio Murashige y Skoog con vitaminas, además el medio se suplementó con carbón activado (SIGMA) a una concentración de $0,2 \text{ g L}^{-1}$ y ácido ascórbico para evitar la oxidación del explante, sacarosa como fuente de carbono a una concentración de 30 g L^{-1} y agar (SIGMA AGAR) como agente gelificante a una concentración de 7 g L^{-1} ; El medio de cultivo se ajustó a un pH de $5,8 \pm 0,2$ (pH-meter JENWAY) con soluciones de HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N y después se esterilizó durante 1 hora en un autoclave vertical (Trident EA-632).

Posterior a la siembra del material vegetal, los tubos se colocaron en la sala de incubación a una temperatura entre 27 ± 1 °C de temperatura, 60 - 70% de humedad relativa, bajo intensidad lumínica de 2000 - 2500 luxes en fotoperiodo de 12 horas. En esta fase se evaluaron 3 variables para determinar un tratamiento óptimo para esta etapa y estas son:

- **Contaminación.** Mediante observación, se dio valores de “1” para contaminados y “0” para los no contaminados, ya sea por la causa de hongo o de bacteria.
- **Necrosis.** Se puso valores de “1” para explantes necrosados (color café) y “0” para explantes no necrosados (Color verde).
- **Viabilidad.** Mediante la observación se determinará un explante viable y se le asignará el valor de “1” y a un explante no viable el valor de “0”.

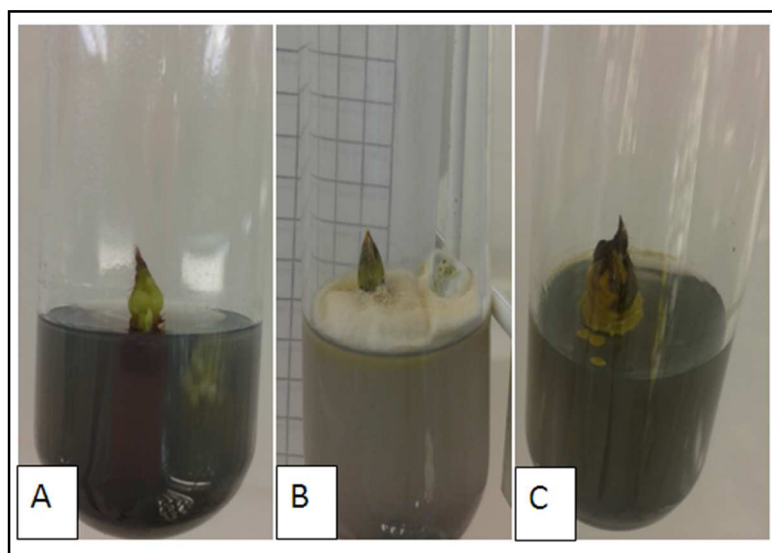


Figura 9: (A): Explante viable. (B) Explante contaminado con hongo. (C) Explante contaminado con bacteria.

Cada tratamiento estuvo constituido por 10 unidades experimentales, siendo la unidad experimental un tubo con un explante, el mismo que posee una yema apical. Las observaciones se las realizó cada 7 días durante un mes.

Para las variables descritas que se realizaron a cabo de un mes desde el primer día de la siembra, se empleó análisis no paramétricos con la prueba de Kruskall Wallis que permitió diferenciar los grupos en los que se dividían, prueba de chi cuadrado y estadística descriptiva básica y análisis de frecuencias (ANEXO E).

2.6. FASE II: Introducción.

En esta etapa los explantes desinfectados mediante el tratamiento estandarizado en la fase anterior que mostraron los niveles más bajos de contaminación, necrosis y muerte.

Durante esta fase se sometió a los explantes desinfectados a diferentes concentraciones del regulador de crecimiento 6-bencilaminopurina (BAP) y se lo comparó con brasinolida, el cual presentó los mejores resultados para esta fase en esta especie (anexo B). Estos reguladores se colocaron en un medio de cultivo sólido Murashige y Skoog suplementado con vitaminas, carbón activado a una concentración de $0,2 \text{ g L}^{-1}$ para reducir la oxidación del tejido, sacarosa como fuente de carbono a una concentración de 30 g L^{-1} , agar como agente gelificante a una concentración de 7 g L^{-1} y $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA (tabla 2.2).

Los cultivos se mantuvieron a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo intensidad lumínica de 2000 - 2500 luxes en fotoperiodo de 12 horas. La toma de datos se realizó cada 7 días hasta llegar a los 45 días, tiempo en el cual culminó la fase de introducción y se determinará cuál es el medio óptimo.

Tabla 2: Tratamientos propuestos para la fase de establecimiento.

Tratamiento	Medio de cultivo	Regulador	Concentración
Control	MSV	Sin regulador	0 mg L ⁻¹
T1	MSV	BAP	1 mg L ⁻¹
T2	MSV	BAP	2 mg L ⁻¹
T3	MSV	BAP	3 mg L ⁻¹
T4	MSV	brasinolida	0,3 mg L ⁻¹
T5	MSV	brasinolida	0,6 mg L ⁻¹
T6	MSV	brasinolida	0,9 mg L ⁻¹

Después de transcurridos estos días se logro determinar el medio y el tiempo óptimo que los explantes deben permanecer en el medio para esta fase, para ello se evaluó 3 variables de respuesta que fueron las siguientes:

- **Presencia de brotes.-** Mediante observación se determinará la presencia de brote en el explante, dando valores de “1” a explantes con brote y “0” a los que no tengan brote (figura 2.5).
- **Viabilidad.-** Mediante observación se determinará si un explante esta viable (tejido verde) o no (tejido oxidado o necrosado) y se le asignará el valor de “1” a un explante viable y el valor de “0” si no lo está.
- **Numero de brotes.-** Se realizará un conteo de los brotes que contenga cada explante

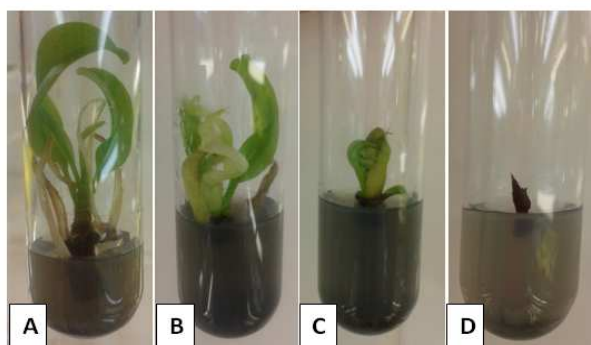


Figura10: (A) Explante con 3 brotes. (B) Explante con brote. (C) Explante viable. (D) Explante necrosado

Cada tratamiento estuvo constituido por 10 unidades experimentales, siendo la unidad experimental un tubo con un explante, se empleó análisis no paramétricos con la prueba de Kruskal Wallis, prueba de chi cuadrado, estadística descriptiva básica y análisis de frecuencias.

2.7. FASE III: Multiplicación

Luego de tener el tratamiento y tiempo óptimo para la introducción, los explantes que presentaron brotes y una buena respuesta vegetativa se replicaron a los medios de multiplicación para inducir el crecimiento axilar y apical de brotes. Se utilizó un medio sólido Murashige y Skoog suplementado con vitaminas (MSV), carbón activado $0,2 \text{ g L}^{-1}$, azúcar 30 g L^{-1} , ácido giberélico 1 g L^{-1} , agar 7 g L^{-1} y con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (tabla 2.3), siempre se tuvo una mayor concentración de citoquinina que auxina.

Tabla 3: Tratamientos propuestos para la fase de multiplicación.

Tratamiento	Medio	Citoquinina	Concentración	Auxina	Concentración	GA ₃
Control	MSV	BAP	0 mg L^{-1}	Ausencia	Ausencia	Ausencia
T1	MSV	BAP	2 mg L^{-1}	ANA	$0,5 \text{ mg L}^{-1}$	1 mg L^{-1}
T2	MSV	BAP	2 mg L^{-1}	ANA	$1,5 \text{ mg L}^{-1}$	1 mg L^{-1}
T3	MSV	BAP	3 mg L^{-1}	ANA	$0,5 \text{ mg L}^{-1}$	1 mg L^{-1}
T4	MSV	BAP	3 mg L^{-1}	ANA	$1,5 \text{ mg L}^{-1}$	1 mg L^{-1}
T5	MSV	BAP	2 mg L^{-1}	AIB	$0,5 \text{ mg L}^{-1}$	1 mg L^{-1}
T6	MSV	BAP	2 mg L^{-1}	AIB	$1,5 \text{ mg L}^{-1}$	1 mg L^{-1}
T7	MSV	BAP	3 mg L^{-1}	AIB	$0,5 \text{ mg L}^{-1}$	1 mg L^{-1}
T8	MSV	BAP	3 mg L^{-1}	AIB	$1,5 \text{ mg L}^{-1}$	1 mg L^{-1}

Se utilizó ocho tratamientos más un control, se sembraron los explantes en condiciones de total asepsia en una cámara de flujo laminar para evitar

contaminaciones externas, fueron sometidos a las mismas condiciones de temperatura, intensidad lumínica y fotoperiodo que en la fase de introducción.

Se realizó cada 7 días la toma de datos por 45 días, después de transcurrido este periodo se estableció el mejor procedimiento entre los 8 tratamientos para esta fase.

Se realizó 10 repeticiones, la unidad experimental que se utilizó para la evaluación fue un frasco con un brote viable obtenido en la fase de establecimiento (figura 2.5):

- **Número de brotes.** Se contó y registró el número de nuevos brotes que desarrolló cada explante.
- **Viabilidad.** Tras la observación de la respuesta del explante posterior a la siembra, se otorgó valores de “1” para los explantes viables (tejido verde y vivo) y “0” para los explantes no viables (tejido de color café debido a oxidación).
- **Presencia de brotes.-** Mediante observación se determinará el presencia de brote en el explante, dando valores de “1” a explantes con brote y “0” a los que no tengan brote.

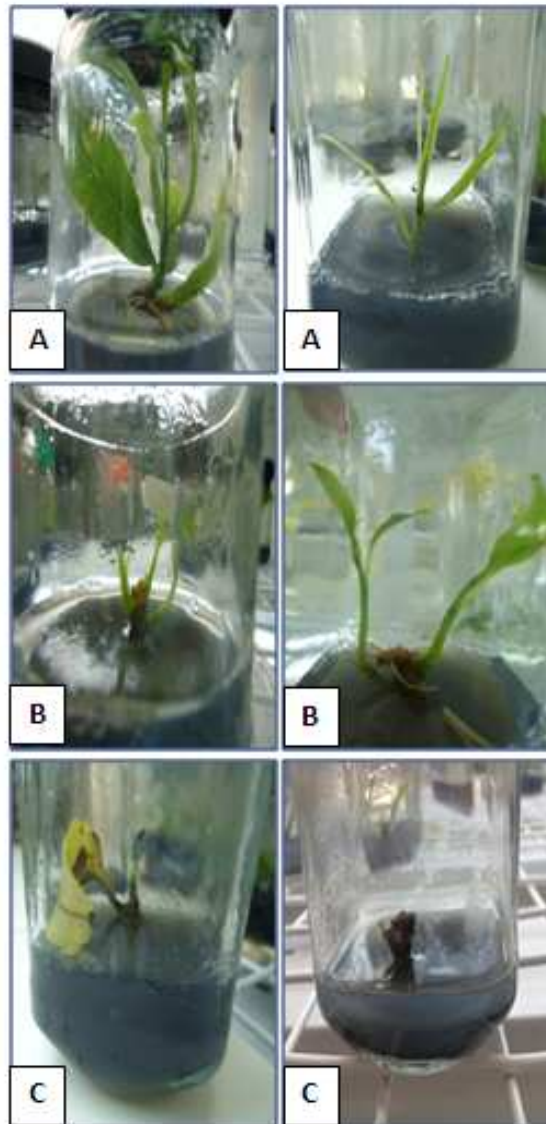


Figura11: (A) Explante con brotes a partir de yema apical. (B) Explante con brotes a partir de yema axilar. (C) Explante necrosado

Se realizó análisis no paramétricos con la prueba de Kruskal Wallis, prueba de chi cuadrado con una significancia del 5% de significancia, estadística descriptiva básica y análisis de frecuencias.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS

3.1. Fase de desinfección de los explantes

En la presente tesis se muestran los resultados de manera en que se evaluaron tres variables las cuales fueron desinfección, necrosis y viabilidad, para la obtención de explantes viables y libres de contaminación. A continuación se presenta el resultado.

3.1.1. Contaminación

En la variable contaminación se evaluó la efectividad de cada nivel de los factores analizados, para ver si es posible disminuir el porcentaje de contaminación con la combinación, en esta variable tuvimos nueve tratamientos que se formaron a partir de hipoclorito de sodio (NaClO) en diferentes tiempos de inmersión.

A continuación se analizó una gráficas de frecuencias para las variables de contaminación (figura 3.1), en donde se muestra el porcentaje de contaminación, se aprecia que en la primera semana no hay incremento notable en la contaminación, en el día 14 se puede observar que ya existe contaminación de los explantes en varios tratamientos, para el día 21 a 30 el porcentaje de contaminación entre tratamientos no varía, por lo que se tomarán los datos a partir del día 21.

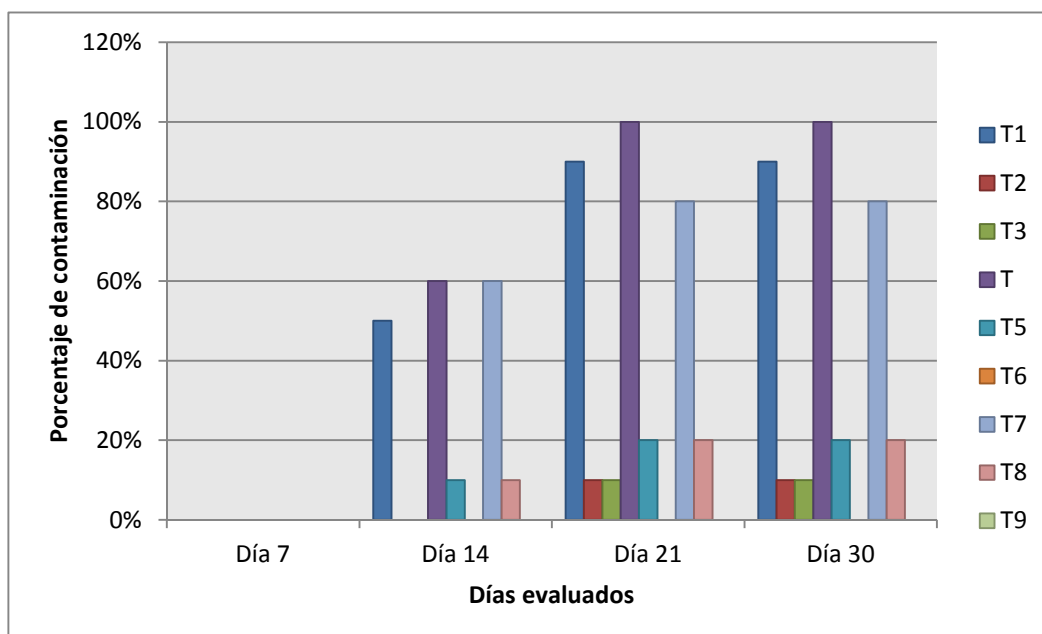


Figura 12: Porcentaje de contaminación de cada tratamiento respecto al día evaluado.

En la tabla 3.1 se muestra el número de explantes contaminados, de los 90 explantes totales introducidos a los 21 días luego de su siembra. La tabla salió de los anexos A.8.1.

Tabla 4: Tabla de contingencia para los datos de la variable contaminación respecto a los tratamientos.

Tratamiento	Tiempo de inmersión	Concentración de NaClO	n	Explantes contaminados
T1	10	1,5	10	9
T2	10	2	10	1
T3	10	2,5	10	1
T4	15	1,5	10	10
T5	15	2	10	2
T6	15	2,5	10	0
T7	20	1,5	10	8
T8	20	2	10	2
T9	20	2,5	10	0
TOTAL			90	33

($p < 0,0001$)

Al ser una variable dicotómica se realizó un análisis mediante la prueba de Kruskal Wallis ($\alpha=5\%$), en base al anexo A.8.2 para conocer el comportamiento de esta variable con respecto a los diferentes tratamientos. El resultado determinó que existe una diferencia estadística significativa entre los tratamientos de desinfección con respecto a distribución de la contaminación ($p < 0,0001$), siendo el tratamiento T4 el menos recomendable debido a que presenta la media más alta de contaminación, el tratamiento T9 y T6 no presentan contaminación (tabla 3.2).

Tabla 5: Prueba de Kruskal Wallis para la variable contaminación.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Contaminación 1		10	0.90	0.32	1.00	39.76	<0.0001
Contaminación 2		10	0.10	0.32	0.00		
Contaminación 3		10	0.10	0.32	0.00		
Contaminación 4		10	1.00	0.00	1.00		
Contaminación 5		10	0.20	0.42	0.00		
Contaminación 6		10	0.00	0.00	0.00		
Contaminación 7		10	0.80	0.42	1.00		
Contaminación 8		10	0.20	0.42	0.00		
Contaminación 9		10	0.00	0.00	0.00		

Trat.	Ranks	
9	29.00	A
6	29.00	A
3	33.50	A
2	33.50	A
8	38.00	A
5	38.00	A
7	65.00	B
1	69.50	B
4	74.00	B

En la tabla 3.3 se observa que la concentración de NaClO según las medias son significativamente diferentes, en el rango A se encuentran las mejores concentraciones las cuales tienen una media de 0,17 y 0,24, y en el rango B se encuentra la concentración que menor eficiencia mostró.

Tabla 6: Prueba de Krustal Wallis en función a la concentración NaClO

Variable	conc	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
contamina	1.50	30	0.90	0.31	1.00	38.77	<0.0001
contamina	2.00	30	0.17	0.38	0.00		
contamina	2.50	30	0.03	0.18	0.00		

Trat.	Ranks
2.50	30.50 A
2.00	36.50 A
1.50	69.50 B

Con nivel de significancia ($\alpha=5\%$) la tabla 3.4 determinó que no existe una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos de desinfección con respecto al tiempo de inmersión ($p=0,8677$), en donde la mejor media es de 0,33.

Tabla 7: Prueba de Krustal Wallis en función al tiempo de inmersión.

Variable	tiempo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
contamina	10.00	30	0.37	0.49	0.00	0.20	0.8677
contamina	15.00	30	0.40	0.50	0.00		
contamina	20.00	30	0.33	0.48	0.00		

Se realizó también graficas de frecuencia para afirmar los datos de los análisis estadísticos.

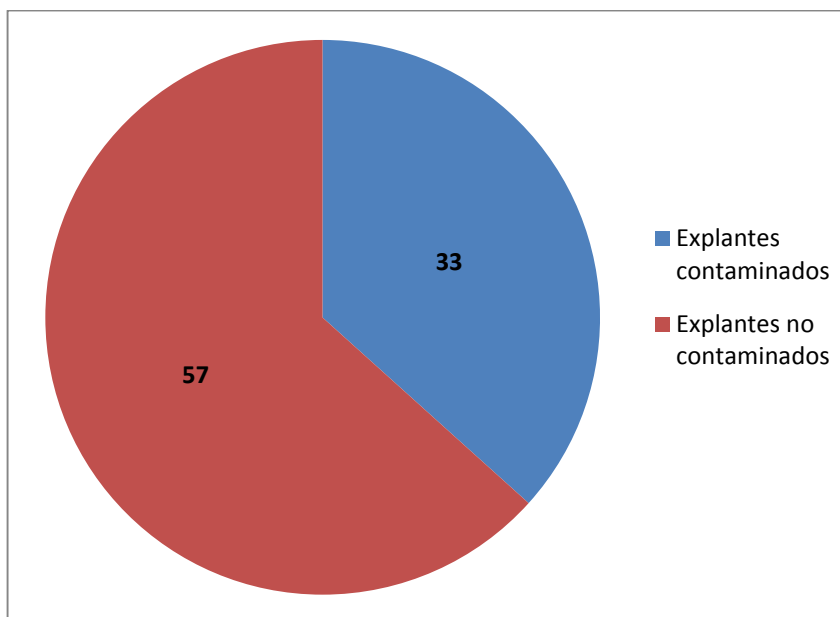


Figura 13: Porcentaje de contaminación en base a la variación de los tratamientos.

El porcentaje de explantes contaminados es del 36,67% y al estar los explantes sometidos a soluciones de NaClO 1,5%, 2%, 2,5% (v/v), en tiempos de inmersión de 10, 15 y 20 minutos se encontró una mejor respuesta en el tratamiento seis y nueve los mismos que tuvieron 100% de desinfección.

En la figura 3.3 se puede apreciar la concentración de NaClO en los diferentes tiempos de inmersión en donde se observa que a una concentración del 1,5% hay un mayor porcentaje de explantes contaminados. A la concentración de NaClO del 2% existe un menor porcentaje de explantes contaminados en el tiempo de inmersión de 10 minutos. A una concentración de NaClO al 2,5% existe una menor contaminación en el tiempo de inmersión de 15 minutos y 20 minutos, teniendo solamente dos explantes contaminados en cada tratamiento. Indicando que el tiempo de inmersión y la contaminación son inversamente proporcionales ya que a medida que el tiempo de inmersión aumenta la contaminación disminuye hasta llegar a obtener explantes sin contaminación.

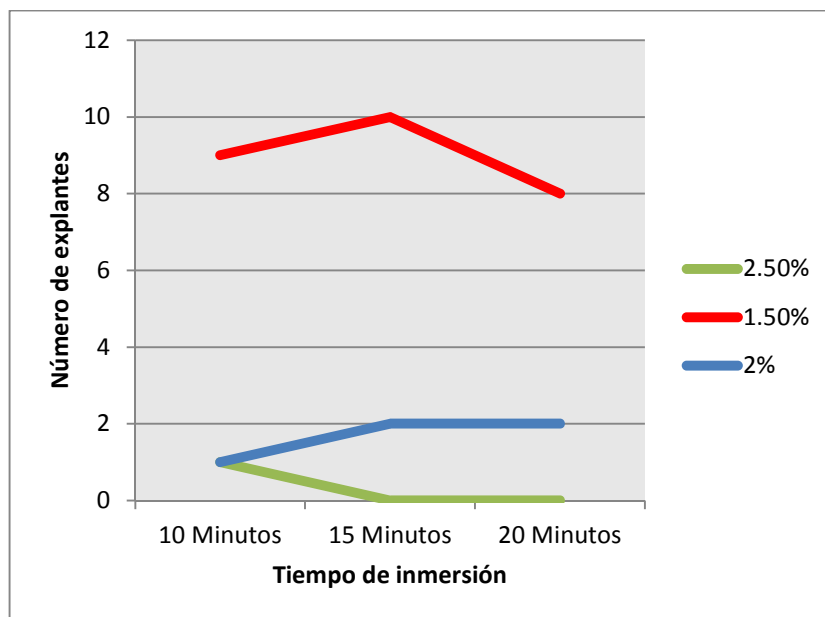


Figura 14: Número de explantes contaminados respecto al tiempo de inmersión en una solución de NaClO al 1,5%, 2%, 2,5%.

Adicionalmente se elaboró una columna de distribución de frecuencias basándose en los datos de la tabla 3.4, para analizar el porcentaje de eficiencia de cada tratamiento por separado. En la figura 3.4 indica que el mejor tratamiento es el T9 y T6, en cambio el T4 y T7 es apenas del 1,5% siendo menos eficientes para la desinfección.

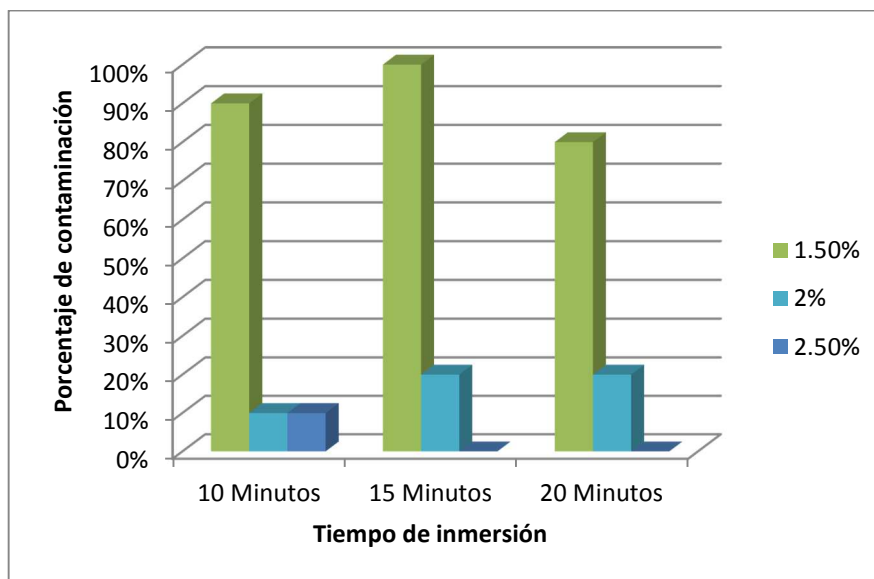


Figura 15: Explantes contaminados respecto al tiempo de inmersión a concentraciones de NaClO 1,5%, 2%, 2,5% respectivamente.

3.1.2. Necrosis

Se evaluó la variable necrosis con el propósito de obtener el tratamiento que mejor resultado tenga sobre los explantes, para impedir grandes pérdidas del material vegetal. La figura 3.5 indica que desde los 21 días no hay variación de la necrosis, siendo el tratamiento cuatro el que menor porcentaje de necrosis posee, ya que desde el día 7 al día 30 no se observa ningún incremento en la grafica de frecuencia.

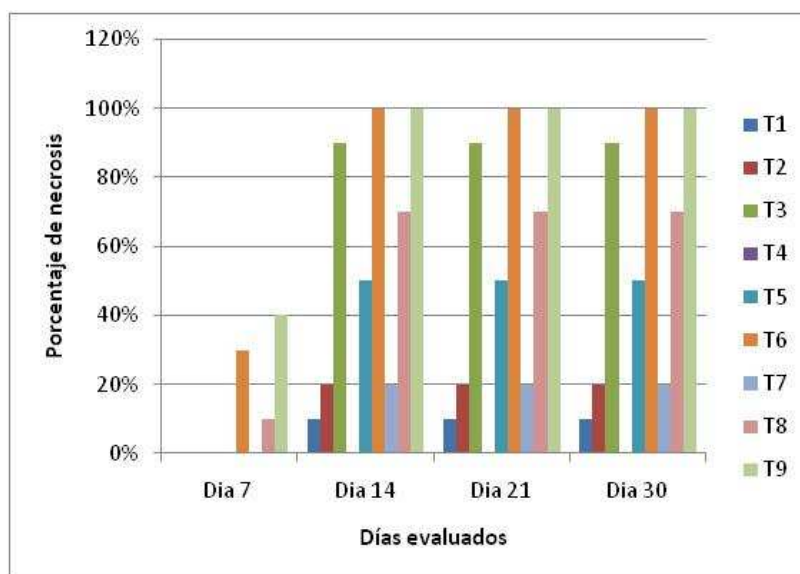


Figura 16: Porcentajes de necrosis de cada tratamiento respecto a los días evaluados.

Para estudiar los datos recolectados para esta variable se realizó una tabla de contingencia (tabla 3.8), en la cual se muestra el número de explantes necrosados en cada tratamiento a los 21 días luego de su siembra.

Tabla 8: Tabla de contingencia para los datos de la variable necrosis respecto al tiempo de inmersión a las diferentes concentraciones de NaClO.

Tratamiento	Tiempo de inmersión	Concentración de NaClO	n	Explantes necrosados
T1	10	1,5	10	1
T2	10	2	10	2
T3	10	2,5	10	9
T4	15	1,5	10	0
T5	15	2	10	5
T6	15	2,5	10	10
T7	20	1,5	10	2
T8	20	2	10	7
T9	20	2,5	10	10
TOTAL			90	46

($p < 0,0001$)

Al tener una variable de tipo discreta dicotómica se procedió a realizar un análisis estadístico no paramétrico mediante la prueba de Kruskal Wallis con un ($\alpha = 5\%$), a fin de conocer el comportamiento de la variable respecto a los diferentes tratamientos. El análisis demostró que existe una diferencia significativa entre las distribuciones de necrosis y los tratamientos realizados ($p < 0,0001$), se observa 3 grupos de los cuales el A es el que menor necrosis muestra, en este grupo el mejor tratamiento es el cuatro, y en el grupo C se encuentran los tratamientos más necrosados en donde el menos eficiente es nueve (tabla 3.6).

Tabla 9: Prueba de Kruskal Wallis para la variable necrosis.

Variable	Tiempo	Concentración	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Necrosis	10	1.50	10	0.10	0.32	0.00	38.24	<0.0001
Necrosis	10	2.00	10	0.20	0.42	0.00		
Necrosis	10	2.50	10	0.90	0.32	1.00		
Necrosis	15	1.50	10	0.00	0.00	0.00		
Necrosis	15	2.00	10	0.50	0.53	0.50		
Necrosis	15	2.50	10	1.00	0.00	1.00		
Necrosis	20	1.50	10	0.20	0.42	0.00		
Necrosis	20	2.00	10	0.70	0.48	1.00		
Necrosis	20	2.50	10	1.00	0.00	1.00		

Trat.	Ranks
15:1.50	22.50 A
10:1.50	27.00 A
20:1.50	31.50 A B
10:2.00	31.50 A B
15:2.00	45.00 A B C
20:2.00	54.00 B C
10:2.50	63.00 C
15:2.50	67.50 C
20:2.50	67.50 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

La concentración dependen significativamente en la necrosis de los explantes ($p = 0,0001$), se observa que el mejor grupo es el A que tiene una concentración del 1,5%, a una mayor concentración menor el porcentaje de explantes vivos como se mira en el grupo C en cual tiene una media de 0,97. Tabla 3.7.

Tabla 10: Prueba de Kruskal Wallis para la variable necrosis en función a la concentración.

Variable	Concentración	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Necrosis	1.50	30	0.10	0.31	0.00	33.69	<0.0001
Necrosis	2.00	30	0.47	0.51	0.00		
Necrosis	2.50	30	0.97	0.18	1.00		

Trat.	Ranks
1.50	27.00 A
2.00	43.50 B
2.50	66.00 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Se aprecia que tanto el tiempo de inmersión como la concentración dependen significativamente en la necrosis de los explantes ($p = 0,1965$) tabla 3.8, teniendo una media de 0,40 a los 10 minutos de inmersión, mostrando que es más efectivo a este tiempo.

Tabla 11: Prueba de Kruskal Wallis para la variable necrosis en función al tiempo.

Variable	Tiempo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Necrosis	10	30	0.40	0.50	0.00	2.44	0.1965
Necrosis	15	30	0.50	0.51	0.50		
Necrosis	20	30	0.63	0.49	1.00		

Se realizó una gráfica de frecuencia (figura 3.6) para determinar la eficiencia de los tratamientos; a una concentración de NaClO al 1,5%, el porcentaje de necrosis es del 10%, lo que revela no existe una gran pérdida de explantes. A la concentración de NaClO del 2% hay un porcentaje de necrosis del 33,33%. Y a la concentración de 2,5% de NaClO no existe un tratamiento idóneo, debido a que el porcentaje de necrosis es muy alto, dando como resultado una eficiencia del 10%.

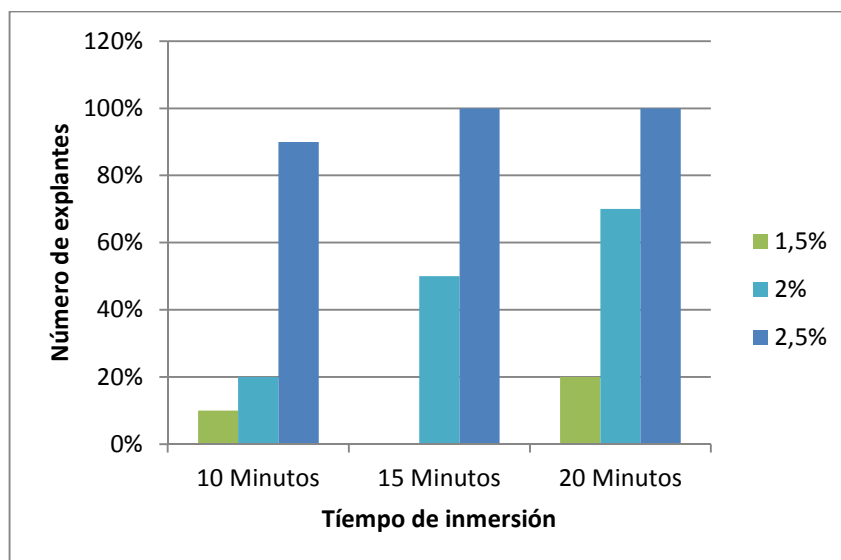


Figura 17: Porcentaje de explantes necrosados para cada tiempo de inmersión en las distintas concentraciones de NaClO.

En la figura 3.7 se puede observar, que a la concentración de 1,5% de NaClO en un tiempo de inmersión de 15 minutos todos los explantes se encuentran sin necrosis, cabe mencionar que a los 10 y 20 minutos también se muestra una óptima respuesta de los explantes. En tanto a una concentración de NaClO al 2% existe menos necrosis en el tiempo de inmersión de 10 minutos; a los 20 minutos es donde más cantidad de explantes se encuentran necrosados. Por último a una concentración de 2,5% de NaClO los tratamientos tienen una pérdida casi total del material vegetal, lo que muestra que el tiempo de inmersión y la necrosis son directamente proporcionales.

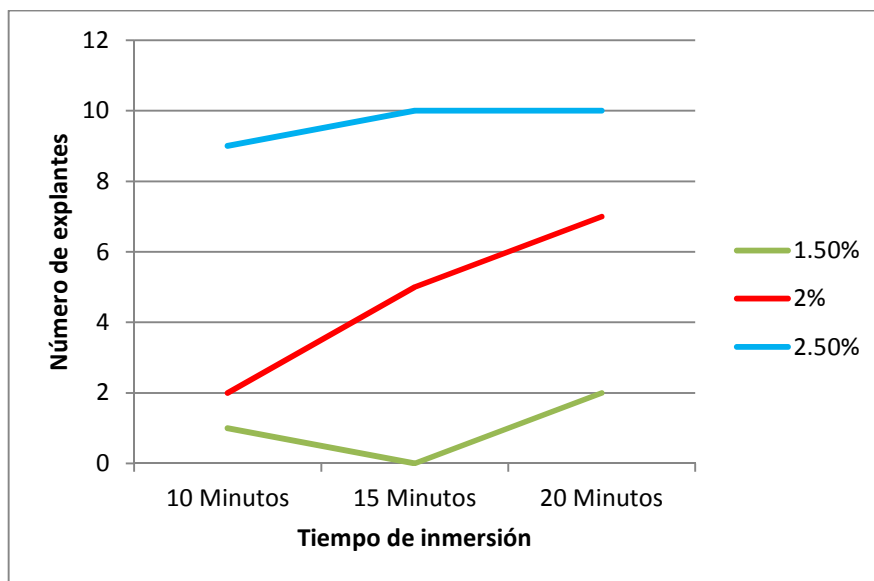


Figura18: Número de explantes necrosados respecto al tiempo de inmersión en una solución de NaClO al 1,5%, 2% y 2,5%.

3.1.3. Viabilidad

Se evaluaron explantes viables, los cuales no presentaron contaminación y necrosis, con el propósito de obtener el mejor tratamiento con el menor número de explantes perdidos, y con la mayor asepsia posible para poder continuar con las siguientes fases en perfectas condiciones. En la figura 3.8 indican que a partir del día 14 al 30 no varía en gran manera la viabilidad de los explantes, por lo tanto los datos se van a evaluar a partir de los 21 días.

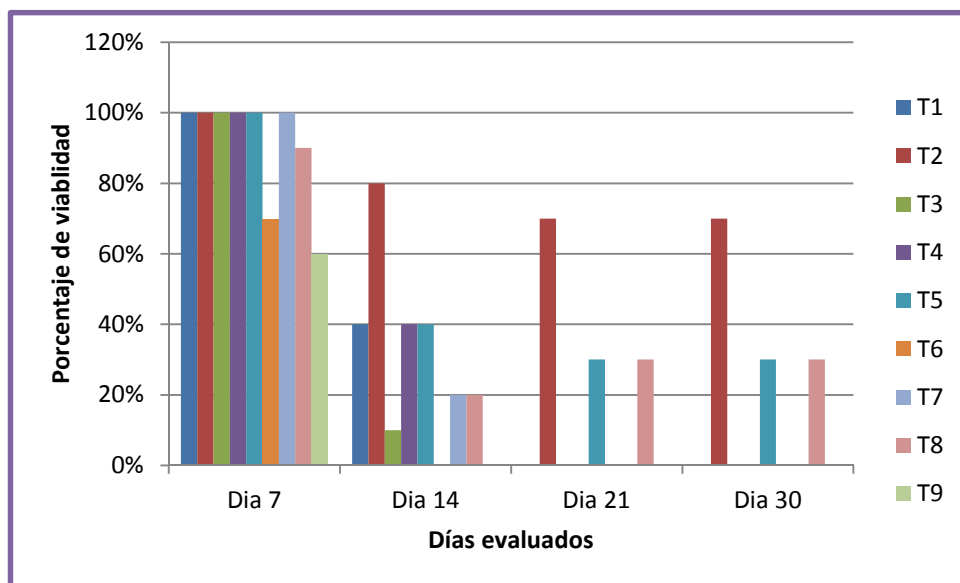


Figura 19: Porcentajes de viabilidad de cada tratamiento respecto a los días evaluados.

Se realizó una tabla de contingencia (tabla 3.9) para los datos obtenidos en cada tratamiento a los 21 días luego de su siembra, para posteriormente poder crear las respectivas gráficas de frecuencia para el análisis de datos.

Tabla 12: Tabla de contingencia para los datos obtenidos de viabilidad con respecto a cada tratamiento.

Tratamiento	Tiempo de inmersión	Concentración de NaClO	n	Explantos viables
T1	10	1,5	10	0
T2	10	2	10	7
T3	10	2,5	10	0
T4	15	1,5	10	0
T5	15	2	10	3
T6	15	2,5	10	0
T7	20	1,5	10	0
T8	20	2	10	1
T9	20	2,5	10	0
TOTAL			90	11

($p < 0,0001$)

Mediante la prueba de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5% se determinó que los tratamientos poseen una diferencia significativa entre ellos, con respecto a la variable viabilidad (tabla 3.10). Teniendo dos grupos, el mejor es el grupo A en el cual el tratamiento dos es el que presenta la media más elevada, es decir el que genera la mayor cantidad de explantes sin contaminación y viables.

Tabla 13: Prueba de Kruskal Wallis para la variable viabilidad

Variable	Concentración	Tiempo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Viabilidad	1.50	10	10	0.00	0.00	0.00	13.52	<0.0001
Viabilidad	1.50	15	10	0.00	0.00	0.00		
Viabilidad	1.50	20	10	0.00	0.00	0.00		
Viabilidad	2.00	10	10	0.70	0.48	1.00		
Viabilidad	2.00	15	10	0.30	0.48	0.00		
Viabilidad	2.00	20	10	0.10	0.32	0.00		
Viabilidad	2.50	10	10	0.00	0.00	0.00		
Viabilidad	2.50	15	10	0.00	0.00	0.00		
Viabilidad	2.50	20	10	0.00	0.00	0.00		

Trat.	Ranks
2.50:20	40.00 A
2.50:15	40.00 A
2.50:10	40.00 A
1.50:10	40.00 A
1.50:15	40.00 A
1.50:20	40.00 A
2.00:20	44.50 A
2.00:15	53.50 A B
2.00:10	71.50 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

La tabla 3.11 muestra la prueba de Kruskal Wallis con respecto a la concentración en donde se estableció que los tratamiento difieren significativamente entre ellos ($p < 0,0001$), teniendo mayor viabilidad a la concentración de NaClO al 2%, y con una media de 0,37 y ubicándose en el grupo A, y en el grupo B se encuentra la concentración que menor eficiencia mostró la cual es del 2,5%.

Tabla 14: Variable viabilidad con respecto a la concentración.

Variable	Concentración	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Viabilidad	1.50	30	0.00	0.00	0.00	7.98	<0.0001
Viabilidad	2.00	30	0.37	0.49	0.00		
Viabilidad	2.50	30	0.00	0.00	0.00		

Trat.	Ranks
1.50	40.00 A
2.50	40.00 A
2.00	56.50 B

De igual manera para analizar la relación entre la variable viabilidad y tiempo de inmersión (tabla 3.12) se realizó una prueba de chi cuadrado de independencia empleando un nivel de significancia del 5%, con ($p = 0,0568$), demostrando que existe evidencia para afirmar que la viabilidad depende del tiempo de inmersión empleado, teniendo la mejor media a los 10 minutos.

Tabla 15: Variable viabilidad con respecto al tiempo de inmersión.

Variable	Tiempo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Viabilidad	10	30	0.23	0.43	0.00	1.85	0.0568
Viabilidad	15	30	0.10	0.31	0.00		
Viabilidad	20	30	0.03	0.18	0.00		

Se observó que el tratamiento dos presenta el más alto porcentaje de explantes viables (70%), seguido del tratamiento cinco (30%) y finalmente el tratamiento ocho (10%). Los demás tratamientos son no viables. Como se puede observar en la figura 3.9.

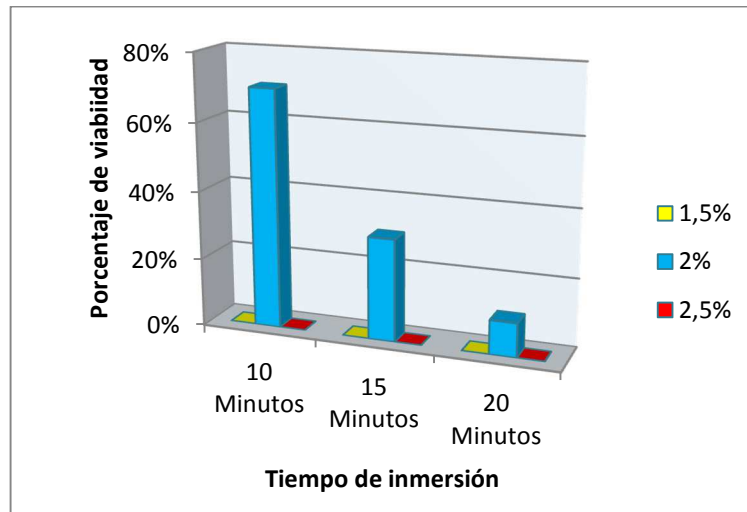


Figura 20: Porcentajes de explantes viables respecto al tiempo de inmersión en las diferentes concentraciones de NaClO.

En la figura 3.10 observamos que a mayor tiempo de inmersión menor es la viabilidad indicando que el tiempo de inmersión influye en la viabilidad de los explantes, ya que, a los 10 minutos de inmersión, existe mayor viabilidad que a los 20 minutos. Por ello se sugiere la utilización del tratamiento dos es el tratamiento más idóneo para poder iniciar la introducción de *Magnolia grandiflora*.

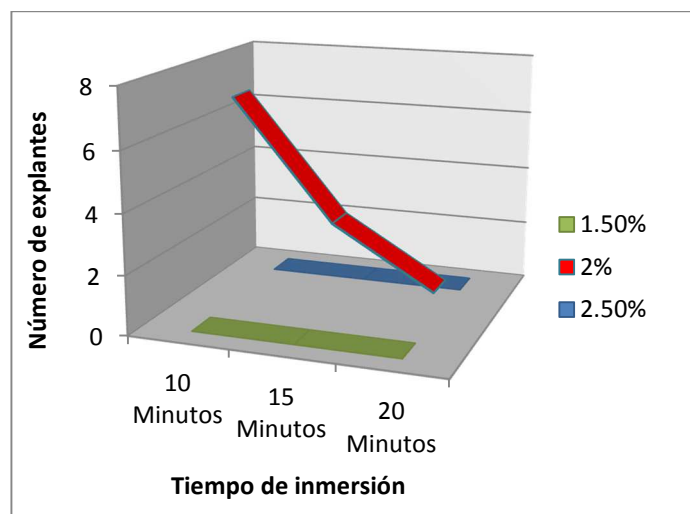


Figura 21: Variación de la viabilidad respecto al tiempo de inmersión.

3.2. Fase de introducción

La fase de Introducción se efectuó a los 45 días luego la siembra inicial, los tratamientos para esta fase se encuentran señalados en la tabla 2.2 y nos permitieron evaluar a brasinolida y bencilaminopurina (BAP) a diferentes concentraciones en medio MSV.

3.2.1. Presencia de brote

La variable presencia de brotes, permitió evaluar si existió la presencia o ausencia de brotes independientemente del número de brotes presentado por cada explante.

Se realizó una tabla de contingencia (tabla 3.13) para analizar los resultados presentados, en donde, de un total de 70 explantes introducidos (10 explantes por tratamiento) se obtuvo 14 explantes que presentaron brotes. Siendo el tratamiento tres el que presentó un mayor número de explantes con presencia de brotes (siete explantes), también en el tratamiento dos se pudo apreciar la presencia de brotes en tres explantes, y en el tratamiento uno la presencia de brotes en cuatro explantes, no se pudo observar la presencia de brotes en los demás tratamientos.

Tabla 16: Tabla de contingencia para los datos presentados para la variable presencia de brote respecto a cada tratamiento.

Tratamiento	n	Explantos viables	Porcentaje	Promedio	
BAP	T1	10	4	40%	46,7%
	T2	10	3	30%	
	T3	10	7	70%	
brasinolida	T4	10	0	0%	0%
	T5	10	0	0%	
	T6	10	0	0%	
Control	10	0	0%	0%	
Total	70	14	20%		

$$(p = 0,0118)$$

Al ser una variable discreta dicotómica, se realizó un análisis de varianza no paramétrico mediante la prueba de Kruskal Wallis con ($\alpha = 5\%$). Se apreció que en la tabla 3.14 existe una diferencia significativa entre la presencia de brotes y los reguladores de crecimiento, ya que se obtuvo un valor de ($p=0,0118$). Siendo el tratamiento tres el mejor, ya que este presenta la media más alta (0,7) y el que menor brote presentó fue el dos los tratamientos cuatro al siete no presentaron brotes.

Tabla 17: Prueba de Kruskal Wallis para la variable presencia de brote.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Presencia de Brotes	1.00	10	0.40	0.52	0.00	13.61	0.0001
Presencia de Brotes	2.00	10	0.30	0.48	0.00		
Presencia de Brotes	3.00	10	0.70	0.48	1.00		
Presencia de Brotes	4.00	10	0.00	0.00	0.00		
Presencia de Brotes	5.00	10	0.00	0.00	0.00		
Presencia de Brotes	6.00	10	0.00	0.00	0.00		
Presencia de Brotes	7.00	10	0.00	0.00	0.00		

Se elaboró una grafica de frecuencia (figura 3.11) para comparar los tratamientos y observar la diferencia que existe entre brasinolida y BAP, en donde se puede observar que el mejor regulador de crecimiento para la introducción es BAP (3mgL^{-1}), ya que presentó un 70% del total de explantes con presencia de brotes en comparación con brasinolida la cual no presento ningún brote a los 45 días después de la siembra.

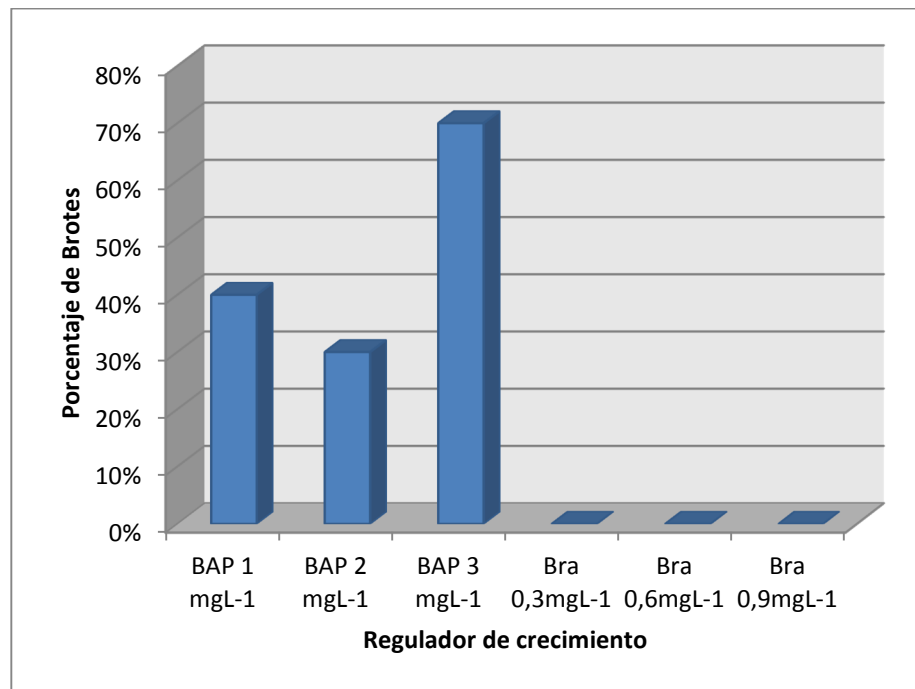


Figura 22: Explantes con presencia de brotes respecto a los reguladores de crecimiento.

La figura 3.12 muestra que el tratamiento tres, que contiene una concentración de 3 mgL^{-1} de BAP en medio MSV, es la concentración más favorable para que los explantes generen brotes. Aquí se presentó siete del total de explantes con brotes obtenidos entre los tratamientos con BAP. Con brasinolida no existe la presencia de brotes, en ninguna de las concentraciones.

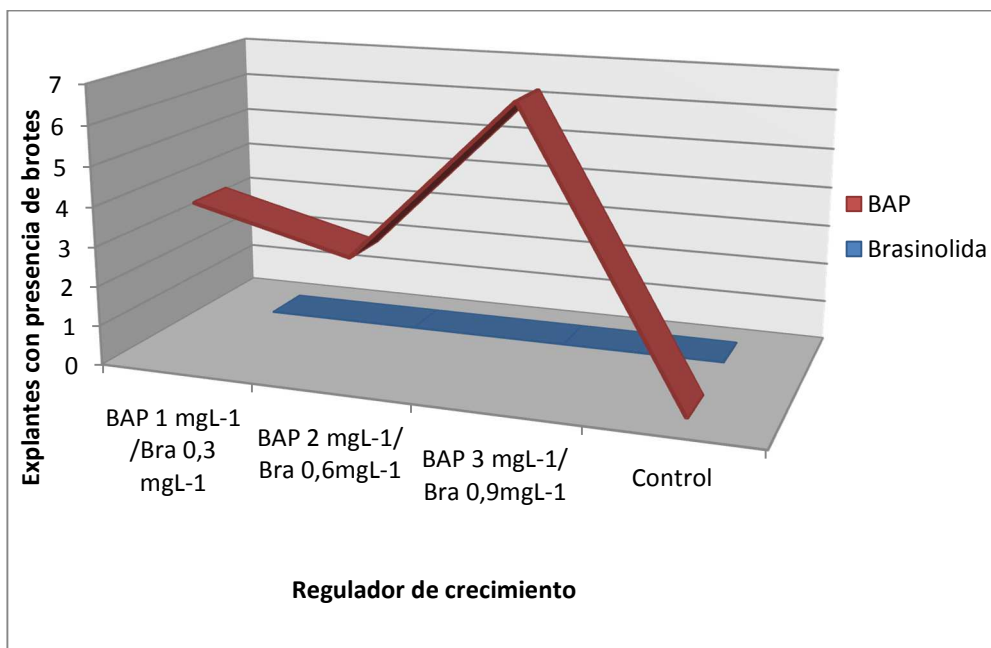


Figura 23: Número de explantes con presencia de brotes con respecto a los reguladores de crecimiento

3.2.2. Viabilidad

La tabla de contingencia 3.15 muestra los datos obtenidos de la fase experimental para analizar la variable viabilidad. En donde, de un total de 70 explantes sembrados 42 sobrevivieron con un 29,4%. Del cual el tratamiento tres es el que mayor número de explantes viables se observa, los demás tratamientos también son viables teniendo seis explantes vivos en los tratamientos uno, dos, cuatro, cinco y seis.

Tabla 18: Tabla de contingencia de los resultados obtenidos para la variable viabilidad en la fase de introducción.

Tratamiento	n	Explantos viables	Porcentaje	Promedio	
BAP	T1	10	6	60%	63,4%
	T2	10	6	60%	
	T3	10	7	70%	
brasinolida	T4	10	6	60%	60%
	T5	10	6	60%	
	T6	10	6	60%	
Control	10	5	50%	50%	
Total	70	42	29,4%		

$$(p = 0,9911)$$

Mediante la prueba de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5% y al ser esta una variable discreta dicotómica se realizó un análisis de varianza no paramétrica con un nivel de significancia del 5% (tabla 3.16). Los resultados señalaron que no existe diferencia estadística significativa entre las distribuciones de la viabilidad en los diferentes tratamientos probados ($p=0,9915$) con la mejor media del 0,7 en el tratamiento tres.

Tabla 19: Prueba de Kruskal Wallis para la variable viabilidad en introducción.

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Viabilidad 1		10	0.60	0.52	1.00	0.59	0.9915
Viabilidad 2		10	0.60	0.52	1.00		
Viabilidad 3		10	0.70	0.48	1.00		
Viabilidad 4		10	0.60	0.52	1.00		
Viabilidad 5		10	0.60	0.52	1.00		
Viabilidad 6		10	0.60	0.52	1.00		
Viabilidad 7		10	0.50	0.53	0.50		

Para conocer que regulador de crecimiento es el que mayor eficiencia tiene en cuanto a la viabilidad de los explantes, se elaboró una gráfica de

frecuencia (figura 3.13), la cual nos indica que con BAP se tiene un 63,30% de explantes viables, con brasinolida tiene un porcentaje del 60%. Lo cual se observa que no existe una diferencia significativa entre los dos porcentajes, sin embargo BAP exhibe el valor más alto.

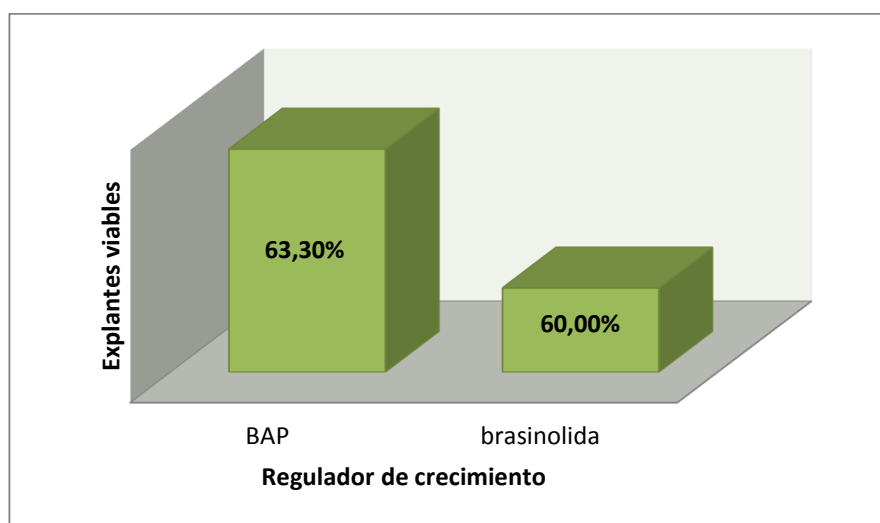


Figura 24: Porcentajes de explantes viables respecto al tipo de regulador de crecimiento.

La figura 3.14 al estar con el regulador de crecimiento BAP muestra que el mejor tratamiento es el número tres, en donde hay un porcentaje de viabilidad del 70%, le sigue el tratamiento número uno y dos con un 60% de viabilidad. Con regulador de crecimiento brasinolida no existe mayor cambio en la viabilidad, ya que los tratamientos cuatro, cinco y seis tienen un 60% de explantes vivos. Todos los tratamientos presentaron porcentajes de viabilidad del 50% en adelante.

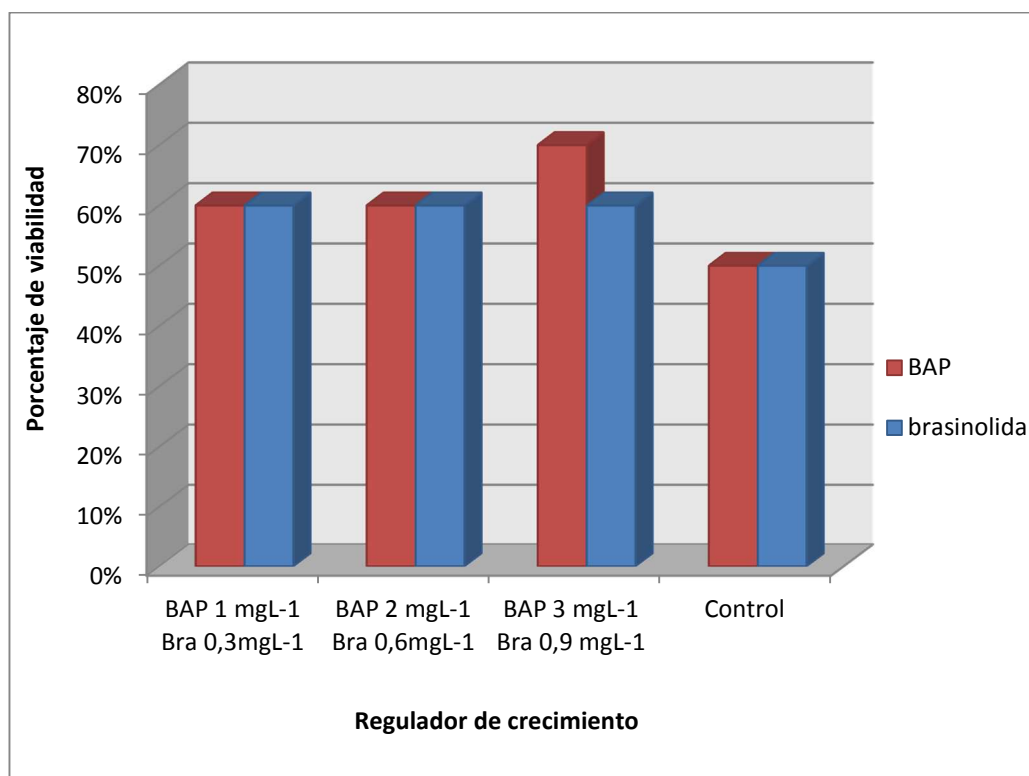


Figura 25: Porcentajes de explantes viables respecto a los reguladores de crecimiento.

3.2.3. Número de brotes

La tabla de contingencia 3.17 muestra los datos obtenidos para la variable número de brotes en la fase de introducción después de los 45 días de incubación. Indicando que el mejor tratamiento es el número tres el cual generó el más alto número de brotes (19 brotes), con este resultado representa el tratamiento con el 59,38% dando una diferencia significativa con los demás tratamientos, ya que el siguiente tratamiento que tuvo brotes es el número dos con ocho brotes, y el tratamiento uno tiene un porcentaje del 15,62%, y finalmente los demás tratamientos se pudo apreciar la ausencia de brotes.

Tabla 20: Tabla de contingencia para los datos obtenidos en la variable número de brotes.

Categoría	Tratamiento							Total
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Control	
Número de brotes	5	8	19	0	0	0	0	32
Porcentaje de frecuencia	15,62%	25%	59,38	0%	0%	0%	0%	100%

$$(p = 0,0001)$$

Para la variable número de brotes se realizó la prueba de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5% y al ser esta una variable discreta dicotómica se realizó un análisis de varianza no paramétrica, la misma que demostró que existen 2 grupos estadísticos, entre los cuales los resultados obtenidos con respecto al número de brotes presentan una verdadera diferencia estadística (tabla 3.18). Siendo el tratamiento tres (3 mg L⁻¹ BAP) que se encuentra ubicado en el grupo B es el que tiene la media más alta (1,9) entre todos los tratamientos, y además presenta una diferencia significativa ($p < 0.5$) del resto. Con lo que sugiere que es la mejor concentración probada para lograr una alta cantidad de brotes.

Tabla 21: Análisis para el número de brotes con respecto a la concentración de BAP y brasinolida.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Número de Brotes 1.00		10	0.50	0.71	0.00	14.27	0.0001
Número de Brotes 2.00		10	0.80	1.32	0.00		
Número de Brotes 3.00		10	1.90	1.45	2.00		
Número de Brotes 4.00		10	0.00	0.00	0.00		
Número de Brotes 5.00		10	0.00	0.00	0.00		
Número de Brotes 6.00		10	0.00	0.00	0.00		
Número de Brotes 7.00		10	0.00	0.00	0.00		

Trat.	Ranks	
5.00	28.50	A
6.00	28.50	A
7.00	28.50	A
4.00	28.50	A
2.00	39.55	A B
1.00	40.70	A B
3.00	54.25	B

En la grafica de frecuencia 3.15 se observa de mejor manera que tratamiento tres tiene un 59,38% del total de brotes obtenidos en esta fase, en donde podemos ver que a una concentración de BAP 3 mgL^{-1} existen ocho brotes y a una concentración de 3 mgL^{-1} que corresponde al tratamiento tres existe 19 brotes, es decir se considera un incremento directamente proporcional de brotes con respecto a la concentración de BAP.

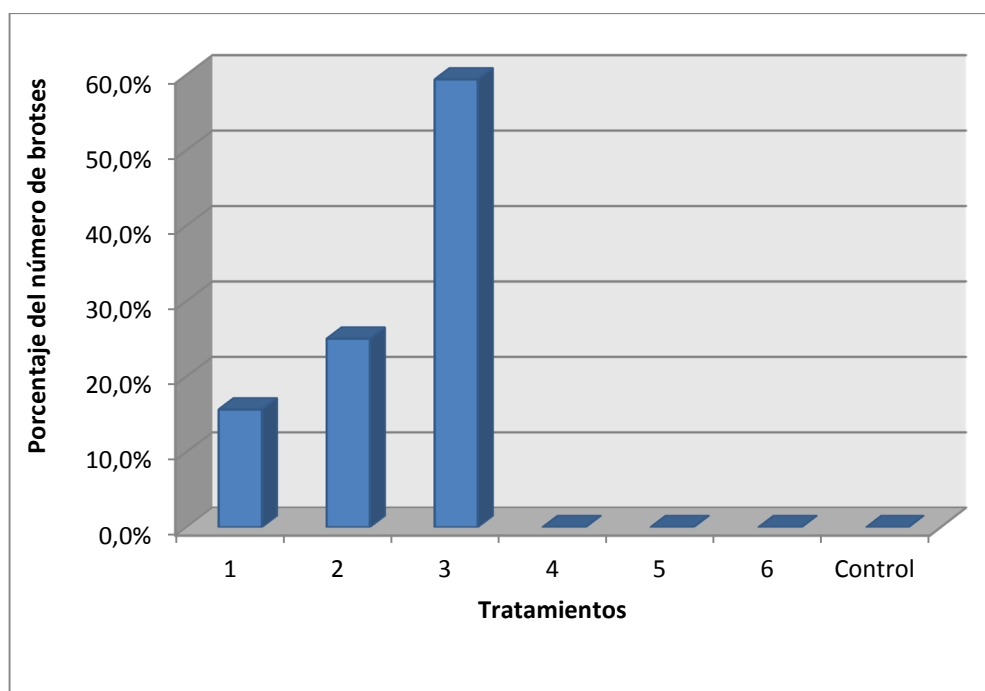


Figura 26: Frecuencias porcentuales del número de brotes con respecto a cada tratamiento.

3.3. Fase de multiplicación

Los explantes que provienen de la introducción fueron usados en esta fase, y se evaluaron a los 45 días luego de su siembra inicial. Los tratamientos en la fase de multiplicación tienen diferentes reguladores de crecimientos, los cuales están detallados en la tabla 2.5.

3.3.1. Presencia de brotes

Para el estudio de los datos recolectados en esta variable se realizó una tabla de contingencia (tabla 3.19), en la cual se muestra el número de brotes a los 45 días luego de su siembra.

Tabla 22: Tabla de contingencia para los datos obtenidos en la variable Presencia de brotes.

Tratamiento		n	Presencia de brotes
T1	0,5 mg L-1 ANA 2 mg L-1 BAP	10	8
T2	1,5 mg L-1 ANA 2 mg L-1 BAP	10	6
T3	0,5 mg L-1 ANA 3 mg L-1 BAP	10	5
T4	1,5 mg L-1 ANA 3 mg L-1 BAP	10	1
T5	0,5 mg L-1 AIB 2 mg L-1 BAP	10	4
T6	1,5 mg L-1 AIB 2 mg L-1 BAP	10	5
T7	0,5 mg L-1 AIB 3 mg L-1 BAP	10	1
T8	1,5 mg L-1 AIB 3 mg L-1 BAP	10	1
Control		10	0
TOTAL		70	31

($p = 0,0049$)

Finalmente se realizó un análisis de mediante la prueba de Kruskal Wallis en donde se determinó que existe una diferencia significativa entre la concentración de auxinas con respecto a la variable presencia de brotes (tabla 3.20), razón por la cual se confirma que la presencia de brotes es dependiente de las concentraciones de auxinas utilizadas, en donde el grupo B tiene la mayor cantidad de brotes, pero se destaca el tratamiento uno con una media de 0,8 seguido por el tratamiento dos el mismo que abarca los dos grupos y tiene una media de 0,6.

Tabla 23: Prueba de Kruskal Wallis para la variable presencia de brote con respecto a auxinas.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Presencia de brotes 1.00	1.00	10	0.80	0.42	1.00	14.48	0.0049
Presencia de brotes 2.00	2.00	10	0.60	0.52	1.00		
Presencia de brotes 3.00	3.00	10	0.50	0.53	0.50		
Presencia de brotes 4.00	4.00	10	0.10	0.32	0.00		
Presencia de brotes 5.00	5.00	10	0.40	0.52	0.00		
Presencia de brotes 6.00	6.00	10	0.50	0.53	0.50		
Presencia de brotes 7.00	7.00	10	0.10	0.32	0.00		
Presencia de brotes 8.00	8.00	10	0.10	0.32	0.00		

Trat.	Ranks	
4.00	29.00	A
7.00	29.00	A
8.00	29.00	A
5.00	41.00	A B
6.00	45.00	A B
3.00	45.00	A B
2.00	49.00	A B
1.00	57.00	B

Se elaboró una grafica de frecuencia (figura 3.16) para comparar los tratamientos y observar la diferencia que existe entre la concentración de auxinas y BAP, en donde se puede observar que el mejor regulador de crecimiento para la multiplicación es el tratamiento uno, ya que presentó un 80% del total de explantes con presencia de brotes en comparación con el tratamiento cuatro y ocho los cuales presentaron un 10% de explantes con brotes a los 45 días después de la siembra, lo que revela que a esta concentración (0,5 mg L-1 ANA y 2 mg L-1 BAP) existe ocho explantes con brotes de los 10 sembrados.

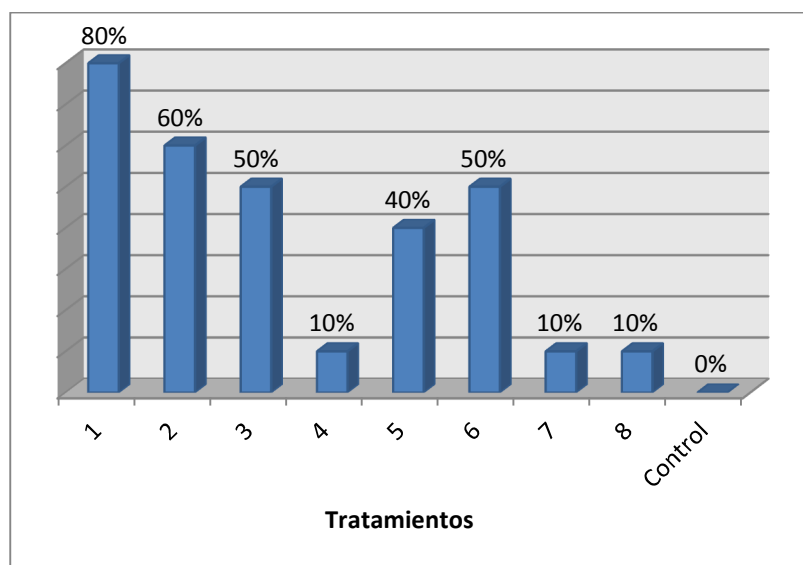


Figura 27: Porcentaje de explantes con presencia de brotes respecto a reguladores de crecimiento (BAP, ANA y AIB).

3.3.2. Viabilidad

Los datos obtenidos para esta variable se presentan en la siguiente tabla de contingencia (tabla 3.21).

Tabla 24: Tabla de contingencia para los datos obtenidos en la variable viabilidad.

	Tratamiento		n	Explantes Viables
T1	0,5 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP	10	10
T2	1,5 mg L-1 ANA	2 mg L-1 BAP	10	8
T3	0,5 mg L-1 ANA	3 mg L-1 BAP	10	9
T4	1,5 mg L-1 ANA	3 mg L-1 BAP	10	5
T5	0,5 mg L-1 AIB	2 mg L-1 BAP	10	8
T6	1,5 mg L-1 AIB	2 mg L-1 BAP	10	7
T7	0,5 mg L-1 AIB	3 mg L-1 BAP	10	8
T8	1,5 mg L-1 AIB	3 mg L-1 BAP	10	3
	Control		0	10
	TOTAL		53	90

($p < 0,0140$)

Para determinar si existe una relación de dependencia o independencia para esta variable con respecto a las diferentes combinaciones de factores de crecimiento que fueron probadas, se desarrolló un análisis mediante la prueba de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5%. Los resultados de este análisis señalan un valor de ($p = 0,0140$), razón por la cual se acepta que la viabilidad de los explantes es dependiente de la interacción presentada por cada tratamiento, es decir que existe una diferencia significativa con respecto a la variable viabilidad, aquí se pueden apreciar dos grupos en donde el mejor tratamiento se encuentra en el grupo B con una media de 1,00 seguido por el tratamiento tres con una media de 0,9 (tabla 3.22).

Tabla 25: Prueba de Kruskal Wallis para la variable viabilidad con respecto a los tratamientos presentados.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Viabilidad 1.00		10	1.00	0.00	1.00	10.52	0.0140
Viabilidad 2.00		10	0.80	0.42	1.00		
Viabilidad 3.00		10	0.90	0.32	1.00		
Viabilidad 4.00		10	0.50	0.53	0.50		
Viabilidad 5.00		10	0.80	0.42	1.00		
Viabilidad 6.00		10	0.70	0.48	1.00		
Viabilidad 7.00		10	0.80	0.42	1.00		
Viabilidad 8.00		10	0.30	0.48	0.00		

Trat.	Ranks	
8.00	23.50	A
4.00	31.50	A B
6.00	39.50	A B
7.00	43.50	A B
5.00	43.50	A B
2.00	43.50	A B
3.00	47.50	B
1.00	51.50	B

Se analizó el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la viabilidad de los explantes, en la figura 3.17 se observa que el tratamiento uno presentó un 100% de viabilidad, el tratamiento tres tuvo una viabilidad del 90%, los tratamientos dos, cinco y siete presentaron un 80% de viabilidad. Lo que permite apreciar que la viabilidad no depende de los reguladores de crecimiento.

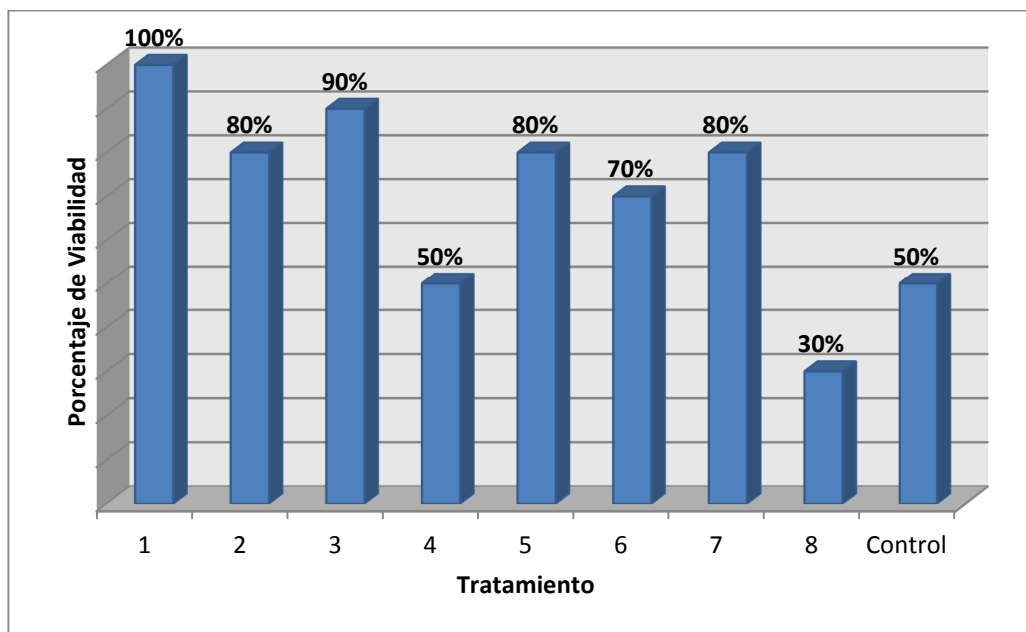


Figura 28: Viabilidad respecto a los tratamientos utilizados.

3.3.3. Número de brotes

Los resultados obtenidos para esta variable son presentados en la tabla 3.24. Mediante la cual se puede observar que se obtuvo un total de 71 brotes, en donde el tratamiento uno tiene 26 brotes y el tratamiento dos posee 14 brotes, siendo los mejores resultados. En el control no se observó la presencia de ningún brote, el tratamiento siete fue el que menor número de brotes se obtuvo. Lo que demostró que estos dos tratamientos presentaron una diferencia significativa con el resto de tratamientos los cuales presentaron solo entre uno a ocho brotes.

Tabla 26: Tabla de contingencia para los resultados obtenidos en la variable “número de brotes”.

Tratamiento		n	Número de Explantes
T1	0,5 mg L-1 ANA 2 mg L-1 BAP	10	26
T2	1,5 mg L-1 ANA 2 mg L-1 BAP	10	14
T3	0,5 mg L-1 ANA 3 mg L-1 BAP	10	12
T4	1,5 mg L-1 ANA 3 mg L-1 BAP	10	2
T5	0,5 mg L-1 AIB 2 mg L-1 BAP	10	5
T6	1,5 mg L-1 AIB 2 mg L-1 BAP	10	8
T7	0,5 mg L-1 AIB 3 mg L-1 BAP	10	1
T8	1,5 mg L-1 AIB 3 mg L-1 BAP	10	3
Control		10	0
TOTAL		90	71

($p = 0,0015$)

Para establecer si existe una relación de dependencia entre el número de brotes obtenidos y los reguladores de crecimiento se realizó una prueba de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5%. La cual presentó un valor de ($p = 0,0015$), con lo cual los resultados señalaron que existe diferencia estadística significativa entre las concentraciones de los reguladores de crecimiento y el número de brotes. También se pudo clasificar en tres grupos en donde el grupo A representa al tratamiento con menor número de brotes teniendo una media de 0,1, el grupo C tiene el mayor número de brotes siendo el tratamiento uno el mejor con una media de 2,6.

Tabla 27: Prueba de Kruskal Wallis para la variable número de brotes con respecto a los tratamientos presentados.

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Número de brotes	1.00	10	2.60	1.96	2.50	17.91	0.0015
Número de brotes	2.00	10	1.40	1.65	1.00		
Número de brotes	3.00	10	1.20	1.48	0.50		
Número de brotes	4.00	10	0.20	0.63	0.00		
Número de brotes	5.00	10	0.50	0.71	0.00		
Número de brotes	6.00	10	0.80	0.92	0.50		
Número de brotes	7.00	10	0.10	0.32	0.00		
Número de brotes	8.00	10	0.30	0.95	0.00		

Trat.	Ranks		
7.00	27.95	A	
4.00	29.00	A	B
8.00	29.75	A	B
5.00	37.85	A	B
6.00	42.90	A	B C
3.00	45.85	A	B C
2.00	49.05		B C
1.00	61.65		C

Se analizó la relación que presenta el uso de auxinas con respecto al número de brotes desarrollados. En la figura 3.18 se observa la relación que tiene la concentración de cada auxina con respecto al número de brotes obtenidos, en el caso del ácido indolbutírico (AIB) se observa que el número de brotes no incrementa de gran manera, por el contrario con el ácido naftalenacético (ANA) el número aumenta con concentraciones bajas donde se alcanzó los mejores resultados de con un máximo de brotes de 26. Por otro lado en ausencia de reguladores de crecimiento no se obtiene ningún brote como se puede apreciar en el control.

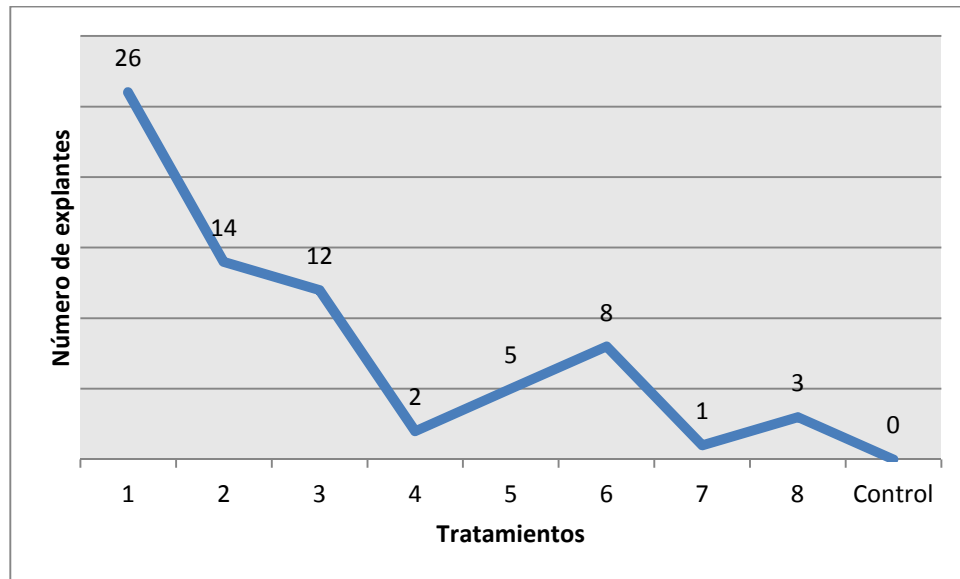


Figura 29: Número de brotes desarrollados con respecto a la concentración y tipo de auxina utilizado.

De esta manera se pudo determinar que para el *Magnolia grandiflora* el ácido naftalenacético permite la obtención de mayor cantidad de brotes en la fase de multiplicación.

CAPÍTULO 4 : DISCUSIÓN

El objetivo en esta investigación fue encontrar un protocolo eficiente mediante cultivo *in vitro* para la producción de plantas de *Magnolia grandiflora*, esta especie tiene uso notable ornamental e industrial. Para superar la contaminación para lograr llegar al enraizamiento se ha desarrollado un protocolo para la desinfección, introducción y multiplicación, en donde se va a tener cultivos en total sanidad y con una alta tasa de multiplicación.

4.1. Etapa de desinfección

En la etapa de desinfección se expuso a los explantes a diferentes concentraciones de NaClO en diferentes tiempos de inmersión, para tener una baja contaminación con la mayor viabilidad posible. Según (Roca & Mroginski, 1991) el NaClO es uno de los compuestos desinfectantes que más se usan en cultivo *in vitro*, por su fácil manipulación y porque nos garantiza la eliminación de contaminantes exógenos; la concentración de NaClO fue establecida al 2 % porque a esta concentración se obtuvo un alto porcentaje de desinfección, en comparación a las concentraciones utilizadas previamente en el ensayo.

Las muestras en la primera semana no presentan una notable contaminación, en el día 14 el 21,11% de los explantes de *Magnolia grandiflora* mostraron contaminación por bacterias y hongos, para el día 21 a 30 se pudo observar que el porcentaje de contaminación entre tratamientos se mantiene constante, garantizando un alto número de explantes viables y sin contaminación, por esta razón los resultados se tomaron al partir del día 21 con lo que ya se observa una alta tasa de contaminación (36,66), la cual se puede deber al mal manejo de la planta donante o planta madre, puede existir agentes endógenos que no se puede eliminar fácilmente con una desinfección superficial. Según Martínez (2012), a partir de los 15 días hongos y sus esporas ya se encuentran

desarrollados y estos son los que mayor tiempo tarda en crecer por ende este agente contaminante es el que más se debe esperar para culminar esta etapa.

4.1.1. Contaminación

En la desinfección de yemas apicales de Magnolia se utilizó una solución de NaClO al 2,5% con la cual se logró tener un porcentaje de desinfección del 100% en el tratamiento que empleó 15 y 20 minutos de inmersión, del 90% para el tratamiento de 10 minutos de inmersión, también se apreció el 90% para una solución de NaClO al 2% a los 10 minutos de inmersión. Sin embargo conseguir un 100% de desinfección en el protocolo no es precisamente óptimo debido a que también se deben evaluar otros factores como necrosis y viabilidad especialmente en plantas leñosas.

La variable contaminación, mostró una variación estadística significativa para el factor NaClO, lo cual sugiere que el índice de contaminación depende de la concentración de NaClO para la desinfección de los explantes. Según (Pelacho, y otros, 2014) se debe esterilizar la superficie de los explantes como paso previo a la introducción, con la utilización de agentes desinfectantes para eliminar el riesgo de contaminación por microorganismos. Se puede emplear también agentes biocidas como el hipoclorito de calcio, cloruro de mercurio o fungicidas que actúan como desinfectantes con una alta rapidez (Trujillo, 2004). Cabe mencionar que la efectividad de estas sustancias químicas va a depender del tipo de explante, tipo de planta y del tipo de sustancia química que se va a utilizar (Hurtado & Merino, 1988). Según Villegas (1990) el principal problema para establecer plantas leñosas *in vitro* es porque tienen un lento crecimiento, y por ende pasan por mucho tiempo expuestas a microorganismos que en ocasiones son difíciles de erradicar.

Haciendo un análisis por separado para el tiempo de inmersión no existe una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos de desinfección,

según (Abdelnour & Escalant, 1994), la contaminación está ligada a la concentración del desinfectante pero no al tiempo de inmersión. Indicando que cuando se utilizó bajas concentraciones de NaClO y corto tiempo de inmersión (T1 y T4), se obtuvo el mayor promedio de explantes contaminados (95%), lo cual indica que el tiempo de inmersión y la concentración de NaClO al tratarlos conjuntamente influyen directamente para lograr una perfecta desinfección.

4.1.2. Necrosis

Uno de los mayores problemas que tuvo esta investigación en la pérdida de explantes fue el nivel de necrosis, con el 51,11% de los explantes de Magnolia necrosados, posiblemente porque la concentración del agente químico fue demasiado fuerte y provocó un efecto tóxico sobre los explantes, ya que el tejido epidérmico del material vegetal es sumamente delicado.

Los resultados muestran un porcentaje de necrosis del 100% cuando se aplicó NaClO al 2,5% por 20 minutos y 15 minutos, al aplicar una concentración menor (1,5%) disminuyó a un 10% de explantes necrosados, aquí pudimos observar que el mejor tratamiento fue el T4 (15" NaClO 1,5%) pero se debe recordar que a esta concentración la contaminación supera el 90% entonces, los explantes no están necrosados pero si contaminados. Al 2% de concentración de NaClO el porcentaje total de explantes necrosados fue de 46,7% y al tiempo de inmersión de 10 minutos hubo un porcentaje de necrosis del 6,66% (T2), lo que indica que a esta concentración y tiempo, el tejido vegetal se encuentra vivo, y se lo podrá usar en la próxima etapa; aquí se aprecia que a medida que la concentración de NaClO fue aumentando, resultaba perjudicial para los explantes. Esto se debe a que el NaClO 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).

El análisis estadístico demostró que existe una diferencia significativa entre los tratamientos y la necrosis, lo que demuestra que tanto el tiempo de inmersión como la concentración de NaClO influyen significativamente en la necrosis de los explantes. Por esta razón cuando las dosis de sustancias químicas son altas, mejor va a ser la eliminación microbiana, pero mayor es la muerte de los explantes utilizados (Alvadado, 1998). Por lo tanto es de gran importancia tener un cultivo en total asepsia ya que la técnica que se emplea no siempre va a ser la más adecuada, a demás Martínez, Sánchez, Faus y Gill (1998), afirman que la necrosis limita llegar a la etapa de introducción de cultivos *in vitro* de especies leñosas.

También se estableció el uso de explantes entre 2 a 3 cm de longitud con lo cual se descartó el uso de yemas apicales de menor tamaño, ya que mientras más pequeñas son se van a necrosar fácilmente y mueran antes de la siembra. Ya que según George *et al* (2008) se debe utilizar explantes de aproximadamente 2 cm de largo para el establecimiento de un cultivo a partir de yemas apicales, debido a que ayuda en la manipulación y permite un mejor desarrollo del explante y soportan la necrosis.

4.1.3. Viabilidad

El resultado final que proporciona el mejor tratamiento en la fase de desinfección fue evaluado con la variable viabilidad que se encuentra en total dependencia de la contaminación y la necrosis. A menor tiempo de inmersión y a una concentración media, se aprecia que el tratamiento T2 posee el más alto porcentaje de viabilidad (70%) el cual consistió en 10 minutos de inmersión en NaClO al 2% ya que permitió un control de la contaminación (90%) y menor nivel de necrosis (20%); desde el día 14 al 30 no varía en gran manera la viabilidad de los explantes, por lo tanto es el tratamiento más idóneo para poder iniciar la introducción de *Magnolia grandiflora*. Indicando que es un porcentaje aceptable para una especie leñosa (Martínez, Rico, & Silva, 2006). Y tan solo el 30% es material vegetal perdido.

4.2. Etapa de introducción

4.2.1. Presencia de brotes y número de brotes

En esta etapa se buscó obtener el mayor número de brotes por explante con lo cual se usó diferentes concentraciones de BAP y brasinolida, para que la plántula supere la situación de estrés a la que fue expuesta en condiciones *in vitro* (Roca & Morginski, 1991), para ello se realizó un análisis estadístico en el cual se demostró que la obtención de brotes dependió estrictamente del regulador utilizado. Siendo BAP el más recomendable para esta etapa, debido a que se presentó el 70% en cuanto a la presencia de brotes y el 59,38% del total de brotes obtenidos. También se puede apreciar que la presencia y número de brotes incrementa a medida que la concentración de BAP va aumentando, no obstante así con brasinolida.

Estos resultados se pueden atribuir a que BAP es una hormona que muestra resultados positivos en la organogénesis en especies forestales ya que van a estimular la formación de hormonas dentro del explante (Abdelnour & Gamboa, 1999). También según Ramírez y Salazar (1998), se debe tener en cuenta que la concentración del regulador depende de la constitución genética, la edad de la planta madre y de las condiciones presentadas por el medio.

Por otro lado la adición de brasinolida no dio resultado favorecedor ya que el 100% de las muestras evaluadas no presentaron respuesta a las diferentes concentraciones de brasinolida, siendo menos eficiente comparado con BAP (Nuñez, 2012), observaron que se puede obtener callos cuando se adiciona brasinolida con auxinas, esto puede haber ocurrido ya que en plantas leñosas poseen una mayor producción y concentración endógena de diversas hormonas lo cual se puede sugerir que *Magnolia* tiene una producción interna de auxinas Schmülling (2004). También según (Fujioka & Akira, 2003) brasinolida sirve para regular procesos específicos, la misma que solo funciona con ciertos compuestos, y no beneficia a todas las especies puede ser por la constitución

genética de la planta o debido a que esta planta se encuentra en condiciones normales para su desarrollo y no permiten estímulos adicionales para su crecimiento y producción, esto quiere decir que existe un equilibrio entre las hormonas de crecimiento y al suplementar brasinolida se inhibe el crecimiento quedando en un periodo de latencia.

4.2.2. Viabilidad

En base a los análisis estadísticos se determinó que la viabilidad en esta etapa no depende de los reguladores de crecimiento utilizados. Mostrando que los tratamientos que contienen BAP tienen un porcentaje de viabilidad del 63,3% y con brasinolida un 60%. En base a estas variables analizadas se pudo establecer que el mejor medio de cultivo para la introducción es el tratamiento T3 (3 mg L⁻¹ de BAP) este medio presentó la mayor viabilidad (70%) y el mayor porcentaje de explantes con brote (59,38).

4.3. Etapa de multiplicación

4.3.1. Presencia de brote y número de brotes

En esta etapa se buscó obtener el mayor número de brotes por explante y por tratamiento, ya que en la etapa anterior solamente se buscaba la formación de brotes sin desarrollo (Uribe & Cifuentes, 2004), ahora se busca el desarrollo de los mismos, para ello se usó diferentes concentraciones de BAP, y se incrementó la concentración de auxinas (ANA y AIB). Ya que según (Zamora & Juárez, 2008) tener un balance de auxinas y citoquininas ayudan en la regeneración de ápices en propagaciones a partir de yemas apicales, axilares o meristemas, y produce una alta tasa de proliferación de brotes, además la adición de citoquininas tiene un efecto positivo debido a que rompe la dormancia apical y estimula la brotación de las yemas, también las citoquininas interactúan con las auxinas para que se pueda realizar la división celular y la

desdiferenciación; se debe mantener a las auxinas a una concentración menor a la citoquinina, a fin de evitar la dominancia apical que es producida por las auxinas y la cual inhibe el desarrollo de los brotes (Jordán & Casaretto, 2006).

El análisis estadístico mostró que el número de brotes y la presencia de brotes dependen del tipo y concentración de hormona utilizada en el medio. Para el tratamiento T1 (0,5 mg L⁻¹ ANA y 2mg L⁻¹ de BAP) se obtuvo una media de 2,6, para T3 (1,5 mg L⁻¹ ANA y 2mg L⁻¹ de BAP) 1,2 y para T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA y 3 mg L⁻¹ de BAP) hubo una media de 1,4 mientras que T4 tuvo una media 0,2. Indicando que el tratamiento más favorable fue el T1 (0,5 mgL⁻¹ ANA + 2 mgL⁻¹ BAP) el mismo que produjo un mayor número de brotes, siendo el mejor balance de auxinas-citoquininas que presentó este tratamiento. Según Rojas *et al* (2004). Ya que la adición de auxinas citoquinina depende también del balance endógeno en los explantes, y en plantas leñosas la mayoría de auxinas incrementan la actividad del cambium en el tejido vascular e inducen a una constante división celular, con lo cual se obtiene el desarrollo de los brotes de yemas axilares (Jácome, 2011).

Como se indicó a través de los resultados del análisis estadístico, el AIB no generó una respuesta muy favorable sobre los explantes a diferencia de lo producido por el ANA. A la concentración de 0,5 de AIB una media de 0,5 y 0,1 a concentraciones de BAP de 2 y 3 mg L⁻¹ respectivamente, y a la concentración de de 1,5 de AIB una media de 0,8 y 0,3 a concentraciones de BAP de 2 y 3 mg L⁻¹ las cuales son medias muy bajas. Finalmente el análisis estadístico demostró que el tratamiento T1 (2 mg L⁻¹ de BAP y 0,5 mg L⁻¹ de ANA) presentó la media más alta para el número de brotes producidos por explante (2,6) y la presencia de brotes (0,8) teniendo un 80% del total de explantes con presencia de brotes en comparación con el tratamiento T4 y T8 los cuales presentaron un 10% de explantes con brotes en la etapa de multiplicación. Por otra parte se demostró estadísticamente una relación de dependencia entre del número de brotes y la presencia de brotes con respecto al uso de estas

hormonas. Observando que a una alta concentración de citoquinina inhiben la función de las auxinas, según Arredondo (1999), afirma que para obtener un mayor desarrollo de los brotes, se debe disminuir la concentración de citoquinina en el medio.

4.3.2. Viabilidad

La evaluación de la viabilidad se realizó con una frecuencia semanal, durante 45 días, se obtuvo un porcentaje del 58,89 de viabilidad sin embargo el tratamiento que mayor pérdida de explantes fue el T8. Esto puede ser porque las plantas *in vitro* pueden tener alteraciones en la estabilidad genética o fisiología por la composición del medio de cultivo y el efecto que pueden tener los reguladores de crecimiento (Hartmann, Kester , Davies, & Geneve, 2002).

CAPÍTULO 5 : CONCLUSIONES

- El mejor tratamiento para la desinfección consistió de 10 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio al 2%, el cual permitió tener el más alto porcentaje de viabilidad (70%) bajos índice de contaminación (10%) y necrosis (20%) ($p < 0,0001$).
- La concentración de BAP presenta una influencia significativa sobre el número de brotes obtenidos ($p=0,0001$) y la presencia de brotes ($p=0,0118$), siendo 3 mgL^{-1} la concentración ideal para la etapa de introducción la cual presentó el 59,38% de brotes formados, un 70% de presencia de brotes y con una viabilidad del 70% y con una media de 1,9 brotes por explante.
- Se concluyó que la utilización de brasinolida no produjo resultados favorecedores tanto en la presencia como número de brotes, ($p=0,0001$), pero presenta una viabilidad del 60%.
- El uso de diferentes concentraciones de citoquininas y diferentes auxinas presentó una influencia significativa para la presencia de brotes ($p=0,0049$) y el número de brotes ($p=0,0015$), siendo ANA a una concentración de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ y BAP a una concentración de 2 mg L^{-1} el mejor tratamiento para la multiplicación produciendo un resultado máximo de 26 con una media de 2,6 y en cuanto a la presencia de brotes se obtuvo un porcentaje del 80% y una media del 0,8.
- El mejor protocolo en este estudio fue: para la desinfección 10 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio al 2%, para la introducción 3 mgL^{-1} BAP y para la multiplicación ANA a una concentración de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ y BAP a una concentración de 2 mg L^{-1} .

- Se acepta la hipótesis planteada al inicio de este trabajo la cual afirma que existe un protocolo de cultivo *in vitro* para el que la desinfección, introducción y multiplicación de explantes de Magnolia (*Magnolia grandiflora*) a partir de yemas apicales adultas, tiene éxito significativo para proceder al enraizamiento, ya que se tiene un alto porcentaje de multiplicación.

CAPÍTULO 6 : RECOMENDACIONES

- Para la etapa de desinfección de Magnolia se recomienda usar el protocolo de desinfección T2 que dio el mejor resultado en la desinfección de yemas apicales, antes de la introducción en el medio de cultivo.
- Se recomienda usar concentraciones menores de citoquininas y auxinas en la etapa de multiplicaciones para determinar una mejor combinación que aumente el número de brotes en los explantes sembrados.
- En este ensayo se recomienda no usar brasinolida porque no se obtienen resultados favorables.
- Para obtener brotes con mayores longitud se recomienda utilizar concentraciones menores de 1 mg L^{-1} de ácido giberélico.

CAPÍTULO 7 : BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A., & Escalant, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Recuperado el 16 de abril de 2014, de Centro agronómico de investigacion investigación y enseñanza (CATIE): <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A6525E/A6525E.PDF>
- Abdelnour, A., & Gamboa , J. (1999). Micropropagación de melina. *Agronomía costarricense*, 1(23), 69-76.
- Abdelnour, A., & Muños, A. (2005). Micropropagación de teca (*tectona grandis* L.f). *Forestal Kurú*, 2(5).
- Abdelnour, A., Ramírez, C., & Engelmann, F. (2002). *Micropropagación de chayote (Sechium edule Jacq. SW.) a partir de brotes vegetativos*. Recuperado el 17 de 04 de 2014, de Agronomía mesoamericana: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v13n02_147.pdf
- Abdelnour, Ana; Escalant, Jean. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Recuperado el 16 de abril de 2014, de Centro agronómico de investigacion investigación y enseñanza (CATIE): <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A6525E/A6525E.PDF>
- Acatkiller. (2014). *Jardín botánico de la Roche*. Obtenido de http://es.wikipedia.org/wiki/Jard%C3%ADn_Bot%C3%A1nico_de_la_Roche_Fauconni%C3%A8re#mediaviewer/Archivo:Magnoliatree.jpg
- Acosta, M., Alvarado, Y., Cruz, M., Leiva, M., & Delgado, L. (2005). Micobiota epífita y contaminantes fungosos del establecimiento in vitro de *Eucalyptus grandis*. *Manejo integrado de plagas y agroecología*(75), 60-63.
- Alemán, S. (2006). Influencia del estado físico del medio de cultivo y diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento sobre la formación de brotes axilares en *Agave fourcroydes* Lem. *Biotecnología Vegetal Vol. 6*, 1-3.

- Alonso, M. (2002). *Biotecnología aplicada a la mejora de Pelargonium*. España : Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Alvadado, Y. (1998). contaminación microbiana en cultivo in vitro de plantas. *Instituto de Biotecnología de Plantas*, 81-104.
- Arredondo, A. (1999). Guía Para La Micropropagación y Producción in Vitro de Plantas de Sotol. *INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRICOLAS Y PECUARIAS CENTRO DE INVESTIGACION REGIONAL DEL NORESTE CAMPO EXPERIMENTAL SALTILLO*.
- Ayala, A. (2011). *Establecimiento de cultivo in vitro de molle (Schinus molle L.) a partir de yemas axilares formadas de plantas madre como herramienta para la propagación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito*. Recuperado el 14 de 12 de 2013, de Escuela Politécnica del Ejército: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4734/1/T-ESPE-032803.pdf>
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Baena, M., & Halffter, G. (2008). Extinción de especies. *Conocimiento actual de la biodiversidad*, 263-282.
- Bárcenas, P., Ortega, E., Álvares, A., & Ronzón, P. (2005). RELACIÓN ESTRUCTURA-PROPIEDADES DE LA MADERA DE ANGIOSPERMAS MEXICANAS. *Instituto de Ecología, A.C*, 3.
- Betancour, J., Adolfo, J., & Rivera, O. (2008). *Árboles y arbustos más frecuentes de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá*. Bogotá: Universidad de Colombia.
- Billard, C., & Lallana, V. (2005). Multiplicación in vitro de *Eucalyptus dunnii*. *Ciencia, docencia y tecnología*(30), 199-216.

- Boisvert, M. (2009). *Synthèses de brassinostéroïdes et étude de leur potential neuroprotecteur*. Recuperado el 01 de abril de 2014, de Université du Quebec à Trois-Rivières: <http://www.archipel.uqam.ca/>
- Bonga, J., & Patrick, A. (1992). *In Vitro Culture of Trees (Forestry Sciences)*. Springer: Kluwer Academic Publisher.
- BRGlobal. (2010). *Importancia de los micronutrientes*. Recuperado el 8 de marzo de 2014, de BR Global: <http://www.brglimited.com/download/MicroNutrientes.pdf>
- Brown, C., & Kirkman, K. (1990). *Trees of Georgia and Adjacent States*. Oregon: TIMBER PRESS.
- Calderón, X., Pérez F, & Rotella, A. (1993). Micropropagacion de una especie chilena en peligro de extinción: Gomotega keule (Mol.). *Bosque*, 1(14), 23-28.
- Cardenas, M. (2011). *Determinacion del protocolo de establecimiento y multiplicacion in vitro de quishuar (buddleja incana) a partir de yemas axilares de plantas madre, como una herramienta para la preservacion de esta especie dentro del Distrito Metropolitano de Quito*. Recuperado el 23 de marzo de 2014, de Escuela Politecnica del Ejercito: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3235/1/T-ESPE-031080.pdf>
- Carrere, R. (1999). *Deforestación y monocultivos forestales en Ecuador: Las venas siguen abiertas*. Recuperado el 6 de marzo de 2014, de Movimiento mundial por los bosques tropicales: <http://www.wrm.org.uy/oldsite/paises/Ecuador/venas.html>
- Cartagena, E. (2013). *Enraizamiento in vitro y aclimatizacion de plantas de Magnolia grandiflora obtenidas a partir de segmentos apicales para la repoblación forestal en parques y jardines del Distrito Metropolitano de Quito*. Escuela Politecnica del Ejercito. Quito: Escuela Politecnica del Ejercito.

- Castillo, A. (2004). *Propagacion de plantas por cultivo in vitro. Una biotecnologia que nos acompaña hace mucho tiempo*. Recuperado el 23 de marzo de 2014, de http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf INIA:
- CEPAL. (2012). *Situación ambiental de la región*. Recuperado el 28 de 11 de 2013, de Comisión Económica Para America Latina y el Caribe: <http://www.eclac.org/publicaciones/xml/6/10876/cap4.pdf>
- Choe, S. (2010). *Brassinosteroid Biosíntesis and Metabolism*. P. Davies. Springer Hetherlands.: Plant Hormones.
- Claud, B., & Kirman, K. (1990). *Trees of Georgia and Adjacent States*. Portland: Timber Press.
- Clouse, S., & Sasse, J. (1998). Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 427 – 451.
- Cronquist, A. (1986). *Botánica básica*. México: Compañía Editorial Continental.
- Cuamacas, B., & Tipaz , G. (1995). *Árboles de los bosques interandinos del norte del Ecuador*. Quito, Ecuador: Casa de la Cultura Ecuatoriana.
- Debergh, P. (1982). Physical proprieties of culture media. *Plant tissue culture*, 135-136.
- Dhaubhadel, S., Browning, K., Gallie, D., & Krishna, P. (2002). Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *The Plant Journa*, 681 – 691.
- Dolezal , K., Popa, I., Krystof, V., Spíchal, L., Fojtíková, M., Holub, J., . . . Strnad, M. (2005). Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivates in plants and human cancer cells. *Biorganic & Medicinal Chemistry*(14), 875-884.
- Donnelly, D., & Tisdall, L. (1993). *Acclimatization strategies for micropropagated plants*. Holanda: Ahuja, M.R. (eds). Kluwer Academic Publishers.

- Duncan, W. H., & Duncan, M. B. (1988). *Trees of the Southeastern United States*. Georgia: Athens.
- Dunstan, D., & Turner, K. (1984). The acclimatization of micropropagated plants. En I. Vasil, *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants* (págs. 123-129). Kelowna: Academic Press.
- Echenique , V., Rubistein, C., & Mroginski, L. (2004). *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Argentina: INTA.
- euita. (3 de Julio de 2014). *Familia Magnolaceas*. Obtenido de <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas%20PDF/Magn%C3%B3lidas.pdf>
- Evangelista, V. (05 de Enero de 2009). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Recuperado el 14 de Abril de 2014, de http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Magnolia_grandiflora&id=7587
- Fay, M., & Clemente, M. (1997). Aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en la propagación y conservación de especies amenazadas. *Monografías del Jardín Botánico de Córdoba*, 5, 43-50. Obtenido de Jardín Botánico de Córdoba.
- Fernández, J., Rodríguez , M., & Veiga, M. (2001). Micropropagación de dos cultivares de fruto de *Castanea sativa* Mill. *III congreso Forestal Español, Granada 25-28 septiembre. Dpt de Produccion Vegetal. Escuela Politécnica Superior de lugo. Universidad de Santiago de Compostela*.
- Flores, A. (2006). *PROPAGACIÓN POR ACODO AÉREO DE Magnolia grandiflora L.* Chapingo, Texcoco, Edo. de México: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO.
- Fujioka, S., & Akira, S. (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology*, 137 -164.

- Gamborg, U., Miller, R., & Ojeina, K. (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Plant Cell Reports*, 151-158.
- Gantait, S., & Mandal, N. (2010). Tissue culture of *Anthurium andreanum*: a significant review and future prospective. *International Journal of Botany*. ISSN 1811 - 9700.
- García, F. (05 de Marzo de 2014). *Fitorreguladores (cap. 14)*. Obtenido de Universidad Politécnica de Valencia: http://www.euita.upv.es/variados/biologia/Temas/tema_14.htm
- Geier, T. (1986). Factors affecting plant regeneration from leaf segments of *Anthurium scherzerianum* Schott (Araceae) cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*(6), 115-125.
- George, E. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. Inglaterra: Elsevier.
- George, E., Hall, M., & De Klerk, G.-J. (2008). *Propagación de plantas mediante cultivo de tejidos*. Dordrecht: Springer.
- González, M. (1997). *Especies vegetales de importancia económica en México: contribución a su conocimiento*. México: Editorial Porrúa.
- Gray, A. (1864). *Lessons in Botany*. New York: Ivison.
- Guerra, M., & Nodari, R. (11 de Mayo de 2014). *Biotecnología*. Obtenido de Universidade Federal de Santa Catarina: <http://www.cca.ufsc.br/ldgv/style.css>
- Hartmann, H., Kester, J., Davies, F., & Geneve, R. (2002). *Plant propagation principles and practices*. (7ma Edición ed.). Prentice Hall.
- Hassan, A. (2004). Effect of homobrassinolide on in vitro growth of apical meristems and heat tolerance of banana shoots. *International Journal of Agriculture & Biology*, 771 - 775.

Hernández, A., & Gatica, A. (2001). *Establecimiento in vitro de Bambusa vulgaris (bambú amarillo)*. Recuperado el 17 de abril de 2014, de instituto tecnológico de Costa Rica: <http://bibliodigital.itcr.ac.cr/xmlui/bitstream/handle/2238/34/BJFIB200330.pdf?sequence=1>

Hernández, R., & Gally, M. (1981). *Plantas Medicinales*. México: Árbol editorial.

Hernández, Y., & González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 58-69. Recuperado el 2 de abril de 2014, de Redalyc: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193218885008>

Hoyos, L., & Kafuri, L. (1998). *Sistemas biotecnológicos para la selección acelerada de tomate de árbol (Cyphomandra betacea) por su resistencia a antracnosis*. Recuperado el 20 de abril de 2014, de Corporación colombiana de investigación agropecuaria: <http://corpomail.corpoica.org.co/BACFILES/BACDIGITAL/46071/46071.pdf>

Hurtado, D., & Merino, M. (1988). *Cultivo de tejidos vegetales*. México: Editorial Trillas.

Iglesias, M., Pérez, R., & Coll, F. (2000). Brasinoesteroides naturales y análogos sintéticos. *Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Química. Universidad de la Habana*. , Cuba.

IUCN. (2013). *The International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species*. Recuperado el 18 de 11 de 2013, de <http://www.iucnredlist.org/>

Jácome, A. (2011). *Micropropagación in vitro de la especie endémica: JIGUERÓN (Aegiphila ferruginea), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción*. Recuperado el 2 de marzo de 2014, de ESPE: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3238/1/T-ESPE-031075.pdf>

- Jaramillo, P. (2008). *Establecimiento del cultivo in vitro de Polylepis microphylla como futura estrategia de conservacion de la especie en la provincia del chimborazo*. Recuperado el 3 de abril de 2014, de Escuela Politecnica del Ejercito: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/530/1/T-ESPE-019539.pdf>
- Jiménez, D., Cordero, A., Rojas, L., & Rodriguez, M. (2007). Estudio de los componentes volátiles de las hojas y flores de *Magnolia grandiflora*, que crece en el Estado Mérida, Venezuela. *REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA Vol. 49*, 1-3.
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, giberelinas y citoquininas*. Chile: La serena.
- King, P. (1984). *Cell culture and somatic cell genetics of plants. Induction and maintenance of cell suspension cultures*. USA: Academic Press.
- König, C. (2011). *Pas de bourgeon, pas de forêt*. Recuperado el 31 de marzo de 2014, de Futura Nature: <http://www.futura-sciences.com/magazines/nature/>
- Krikorian, A. (1982). *Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivo in vitro*. New york: State University of New York at Stony Brooks.
- Kukreja, A., Mathur, A., & Zaim, M. (1990). Mass production of virus free patchouli plants. *Tropical Agronomie*(67), 101-104.
- Lema, J. (2014). *Especies en peligro*. Recuperado el 14 de marzo de 2014, de Nueva tierra: <http://www.nuevatierra.com/>
- Leopold, A., & Kriedemann, P. (1975). *Plant growth and development*. USA: McGraw Hill.
- Lluna, R. (2006). *Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta*. Recuperado el 14 de marzo de 2014, de Industria hortícola: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Reguladores%20general.pdf>

- López, G. (2006). *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares: especies silvestres y las principales cultivadas*. Madrid: Mundi prensa.
- Lozoya, L., & Lozoya, M. (1982). *Flora medicinal de México*. México: Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Luna, A. (2009). *Causas subyacentes de la deforestación. Políticas ambientales*. Recuperado el 28 de Febrero de 2014, de Universidad Tecnica del Norte : http://aplicaciones.utn.edu.ec/altosestudios/Conferencias/Alfedo_Luna_BHT.pdf
- MAE. (2011). *Estimación de la Tasa de Deforestación del Ecuador Continental*. Recuperado el 7 de marzo de 2014, de Sistema de informacion Marino Costera del Ecuador: <http://simce.ambiente.gob.ec/sites/default/files/documentos/geovanna/Estimaci%C3%B3n%20de%20la%20Tasa%20de%20Deforestaci%C3%B3n%20del%20Ecuador%20Continental.pdf>
- Margara, J. (1988). *Multiplificación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemos y la organogénesis*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Marin, J., Boudabous, M., Lorente, P., García, E., Andreu, P., & Arbeloa, A. (2010). Saneamiento in vitro de "Douce de Djerba", una variedad de manzano micropropagada. *Información Técnica Económica Agraria*, 106(4), 303-307.
- Martínez, M. (2012). *Conservando esporas de helechos*. Recuperado el 17 de abril de 2014, de espores: www.espores.org
- Martínez, M., Rico, L., & Silva, R. (2006). Cultivo in vitro de cuatro diferentes tejidos de *Casimiroa edulis* Llave et lex para identificación de alcaloides totales. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 37(4), 5-11.
- Martínez, M., Sánchez, L., Faus, M., & Gill, A. (1988). Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) Polyphenoloxidase: monophenolase and dihydroxyphenolase activities. *Food Science*, 4(53), 1191-1194.

- MECN. (2009). *Ecosistemas del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ). Publicaciones Misceláneas N°6*. (M. E. MDMQ, Ed.) Quito, Ecuador: Nuevo Arte.
- Mistura. (2008). *La importancia de las plantas autóctonas*. Recuperado el 22 de marzo de 2014, de Revista mistura: <http://revistamistura.com.ar/>
- Moldenke, H. (1934). Genus *Aegiphila*. *Brittonia*, 1(5), 250-263.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Physiology. Annual Review of Plant Physiology*, 135-165.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 473-497.
- Murashige, T., & Tucker, U. (1969). Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Physiology Plantarum*, 279-285.
- Neill, D. (2012). ¿Cuántas especies nativas de plantas vasculares hay en Ecuador? *Revista amazónica: Ciencia y tecnología*, 1(1), 70-83.
- Núñez, M. (2012). *Brasinoesteroides y las respuestas de las plantas al estrés ambiental*. Cuba: Ediciones_INCA.
- Oberschelp, G., & Marcó, M. (2010). Efecto del ácido 3-indolbutírico sobre el enraizamiento adventicio y la altura de plantines clonales de *Prosopis*. *Quebracho*, 18, 112-119.
- Odenwald, N., & Turner, J. (1996). *Identification, Selection and Use of Southern Plants: For Landscape Design*. Luisiana: Claitor's Publishing Division.
- Olivera, V., Gutiérrez, M., Gutiérrez, J., & Andrade, M. (2000). Cultivo in vitro de *Gerbera* (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Red de Revistas Científicas redalyc*, 75-80.

- Orellana, M. (1997). *Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro para los explantes nodales de caoba (Swietenia macrophylla, King)*. Costa Rica: Tesis de Maestría en Ciencias.
- Orellana, P. (1998). Introducción a la propagación masiva in vitro de clones selectos de *Castanea sativa* Mill. *propaiotecnologiacion y mejora genética de plantas por b*, 125-162.
- Orquera, G. (2013). *Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de chuquiragua (Chuquiraga jussieu) a partir de yemas apicales y axilares*. Recuperado el 04 de abril de 2014, de Escuela Politecnica del Ejercito: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7167/1/T-ESPE-047408.pdf>
- Pacheco, F. (2009). Evaluación de la eficacia de la aplicación de inóculos microbiales y de *Eisenia fetida* en el proceso de compostaje doméstico de desechos urbanos. Tesis. Navarra, España: Universidad De Navarra.
- Palacios, W. (2011). *Familias y Géneros Arbóreos del Ecuador. Manual de Identificación*. Quito, Ecuador: Ministerio del Ambiente (MAE) y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO).
- Paladines, C. (2011). Evaluación de la capacidad de degradación microbiana de tensioactivos aniónicos a partir de dos consorcios microbianos removedores de colorantes reactivos, a nivel de laboratorio. Tesis. Sangolquí: Escuela Politécnica Del Ejército.
- Pelacho, A., Closas, M., Cueva, B., Sanfeliu, L., Badía, S., & Alins, V. (2 de Julio de 2014). *Cultivo in vitro*. Obtenido de Unidad de Fisiología Vegetal del Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola: <http://www.udl.es/>
- Peña, C. (2009). *Establecimiento y evaluación de protocolos de desinfección, introducción y multiplicación in vitro de piñón (jatropha curcas) a partir de semillas y yemas apicales obtenidas de plantas adultas con miras a una propagación masiva de plantas élite*. Quito: ESPE.

- Peret, B. (2007). *Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical Casuarina glauca*. Recuperado el 28 de marzo de 2014, de Thèses en ligne: <http://tel.archives-ouvertes.fr/>
- Pérez, E., Ramírez, R., Núñez, H., & Ochoa, N. (1999). *Introducción al Cultivo de México*: Universidad Autónoma de Aguascalientes. Apoyado por el Fondo para la Modernización de la Educación Superior.
- Pérez, J. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. España: Ediciones MultiPrensa.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de plantas superiores*. Madrid: Mundi prensa.
- PINHEIRO, M., SOUSSA, M., BRAZ, R., & ROCHA, E. (2004). *Antiproliferative Effects of Abietane Diterpenes from Aegiphila lhotzkyana*. Recuperado el 2014 de marzo de 14, de Thieme: <https://www.thieme-connect.com/>
- Programa mosaicos de conservación. (2008). *Los viveros de plantas nativas*. Recuperado el 2014 de marzo de 22, de Fundacion Cerros de Bogotá: <http://cerrosdebogota.org/viveros/descargables/losviverosdeplantasnativas.pdf>
- Ramirez, M., & Salazar, E. (1998). Método de desinfección y efecto de citocinas en el cultivo in vitro de segmentos de hojas de *Psidium guajava*. *revista de la facultad de agronomía*, 2(5), 162-173.
- Roca, W., & Morginski, L. (1991). *Cultivo de tejido en la agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: CIAT.
- Rojas, S., García, J., & Melva, A. (2004). *Propagación asexual de plantas*. Colombia: PRONATTA.

- Sáenz, L., Córdova, I., & Rodríguez, F. (2006). *Los brasinoesteroides. Una nueva clase de hormonas vegetales*. Recuperado el 2 de abril de 2014, de Revista mexicana de ciencias: <http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/>
- Sánchez, J. (1 de enero de 2014). *Arboles Ornamentales*. Recuperado el 15 de Abril de 2014, de <http://www.arbolesornamentales.es/Magnoliagrandidflora.htm>
- Santillán, F. (2003). *Evaluación de plaguicidas naturales en el control de nematodo agallador, áfidos y chinchorro en tomate de árbol en la zona austral del Ecuador*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Schlie, M., & Luna, L. (2008). *Recursos Fitogenéticos y Sustentabilidad en Chiapas*. Chiapas: UNICACG.
- Schmülling, T. (2004). *Cytokinin*. (W. Lennars, & M. Lane, Edits.) Berlin.
- Schroeder, C. (1953). Giberelinas. *University of California*, 67.
- Segretin, E. (2007). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II*. Recuperado el 10 de febrero de 2014, de ArgenBio: <http://www.argenbio.org/>
- Sen, J., & Sharma, A. (1991). Micropropagation of *Withania somnifera* from germinating seed and shoot tips. *Plant cell tissue organ cult*(26), 71-73.
- Suarez, I., Jarma, A., & Ávila, M. (2006). Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). *Universidad de Córdova*.
- The Plant List. (2013). *The Plant List*, 1.1. Recuperado el 2014 de marzo de 13, de <http://www.theplantlist.org/>
- Thébault, L. (2001). *Cytokinines*. Recuperado el 31 de marzo de 2014, de Du bigbang à l'homme: <http://www.botanic06.com/site/index.htm>
- Thomas, P., & Ravindra, M. (1997). Shoot tip culture in mango; influence of medium, genotype, explant factor, season and descontamination treatments on

phenolic exudation, explant survival and axenic cultur establishment. .
Journal of Horticultural Science.

Toribio, M., & Celestino, C. (1989). CULTIVO IN VITRO DEL ALCORNOQUE.
SCIENTIA gerundensis(15), 11-21.

Tropicos. (2014). *Tropicos*. Recuperado el 2014 de diciembre de 28, de
<http://www.tropicos.org/>

Trujillo, R. (2004). *Micropropagación: Fundamentos del cultivo de tejidos*. Cuba:
Centro de vitroplantas.

UNEP-WCMC. (2014). *United Nations Environment Programme-World
Conservation Monitoring Centre*. Recuperado el 24 de 11 de 2014, de
<http://www.unep-wcmc.org/>

Uribe, M., & Cifuentes, L. (2004). Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la
propagación de *Legrandia concinna*. *Bosques*, 25(1), 129-135.

Uribe, M., Delaveau, C., Garcés , M., & Escobar, R. (2008). Efecto de asepsia y
fitohormonas en el establecimiento in vitro de *Berberidopsis corallina*, a
partir de segmentos nodales. *Bosques*, 29(1), 56-64.

Valentin, J. (2005). *Respuesta de dos tipos de aguacate(Persea americana var. Mill)
a la micropropagacion utilizando diferentes combinaciones de auxinas y
citoquininas, realizado en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales*.
Recuperado el 24 de marzo de 2014, de Universidad de San Carlos de
Guatemala: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2243.pdf

Vargas, W. (2002). *Guía ilustrada de las plantas de la Cordillera Central de
Colombia del Quindío y los Andes Centrales*. Manizales, Colombia: Centro
editorial.

Vazquez, A., Cuevas, R., Cochrane, T., Iltis, H., Santana, F., & Guzman, L. (1987).
Flora de Manantlan. Guadalajara: BRIT.

- Villalobos, V., Ramírez, M., & Salgado, R. (2002). *Cultivo in vitro de Paulonia*. Recuperado el 4 de 12 de 2013, de INIFAP-CEFAP: <http://agroforestal.com.mx/content/cultivo-vitro-de-paulonia>
- Villegas, A. (1990). Fundamento teorico practico del cultivo de tejidos vegetales. *Metodos asepticos*, 21-23.
- Vincent, K., Mathew, K., & Hariharan, M. (1992). Micropropagation of *Kaempferia galanga* L. a medicinal plant. *Plant cell tissue organ cult*(28), 203-207.
- Weaver, P. (1997). Familia de las Magnolias. *Forest Service*, 6.
- White, P. (1989). Plant Tissue Culture: methods and applications in agriculture. *Academic Press*, 1-20.
- Zamora, A., & Juárez, A. (2008). Micropropagación en piña cultivar MD-2. *Universidad Nacional Agraria*,.
- Zavattieri, A. (2002). *Biotechnologia Vegetal*. Recuperado el 04 de abril de 2014, de Universidad de Evora: <http://home.dbio.uevora.pt/~zavattieri/Micropropaga%E7%E3o.pdf>
- ZIPCODEZOO. (2013). *Aegiphila monticola*. Recuperado el 12 de marzo de 2014, de ZIPCODEZOO: http://zipcodezoo.com/Plants/A/Aegiphila_monticola/
- Zúñiga, T. (1999). *SITUACIÓN ACTUAL DE LA FORESTACIÓN Y REFORESTACIÓN EN EL ECUADOR*. Recuperado el 14 de marzo de 2014, de Food and Agriculture Organization of the United Nations: http://www.fao.org/docrep/007/ad102s/AD102S08.htm#p3288_177985

CAPÍTULO 8 ANEXOS






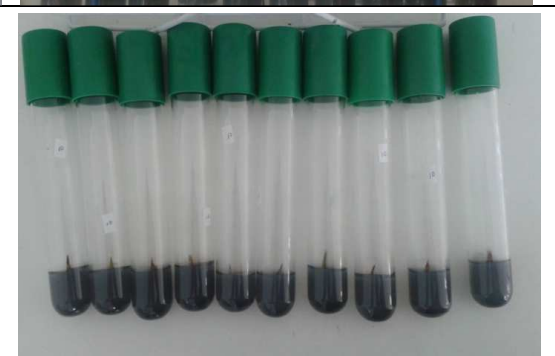

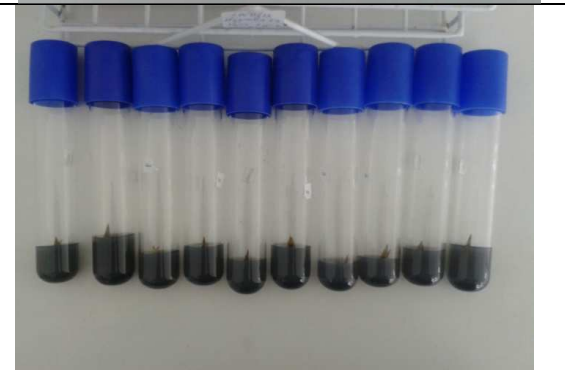
ANEXO A

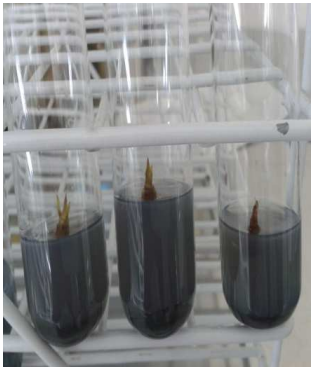



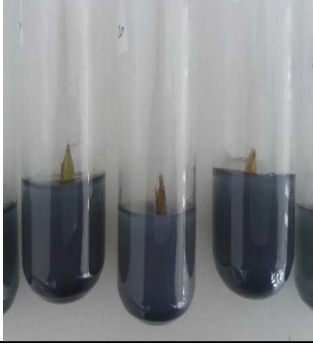
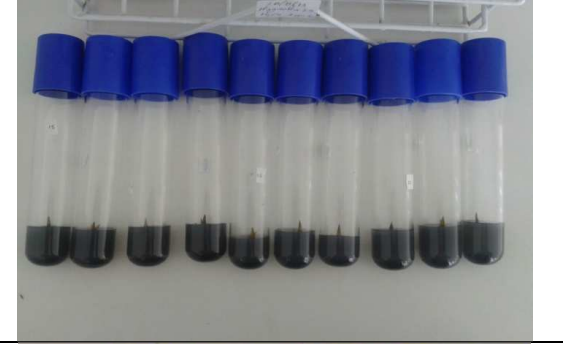
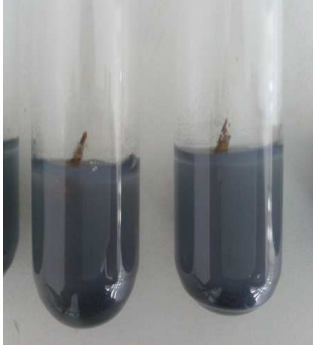

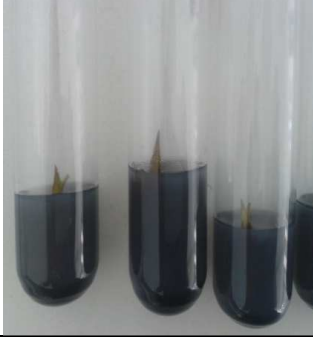
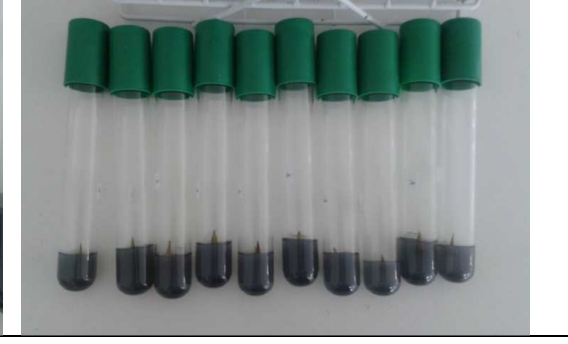
Tabla A.28: Tabla de contingencia para los datos de las variables contaminación, necrosis y muerte de cada tiempo de inmersión respecto a los días evaluados.

Tratamiento	Tiempo de inmersión	[NaClO] (%)	Explantos contaminados	Explantos necrosados	Explantos viables	Número total de explantes
Día 7	10	1,5	0	0	10	10
		2	0	0	10	10
		2,5	0	0	10	10
	15	1,5	0	0	10	10
		2	0	0	10	10
		2,5	0	3	7	10
	20	1,5	0	0	10	10
		2	0	1	9	10
		2,5	0	4	6	10
Día 14	10	1,5	5	1	4	10
		2	0	2	8	10
		2,5	0	9	1	10
	15	1,5	6	0	4	10
		2	1	5	4	10
		2,5	0	10	0	10
	20	1,5	6	2	2	10
		2	1	7	2	10
		2,5	0	10	0	10
Día 21	10	1,5	9	1	0	10
		2	1	2	7	10
		2,5	1	9	0	10
	15	1,5	10	0	0	10
		2	2	5	3	10
		2,5	0	10	0	10
	20	1,5	8	2	0	10
		2	2	7	1	10
		2,5	0	10	0	10
Día 30	10	1,5	9	1	0	10
		2	1	2	7	10
		2,5	1	9	0	10
	15	1,5	10	0	0	10
		2	2	5	3	10
		2,5	0	10	0	10
	20	1,5	8	2	0	10
		2	2	7	1	10
		2,5	0	10	0	10

ANEXO B: FOTOS DE DESINFECCIÓN**Recolección y corte de la muestra**

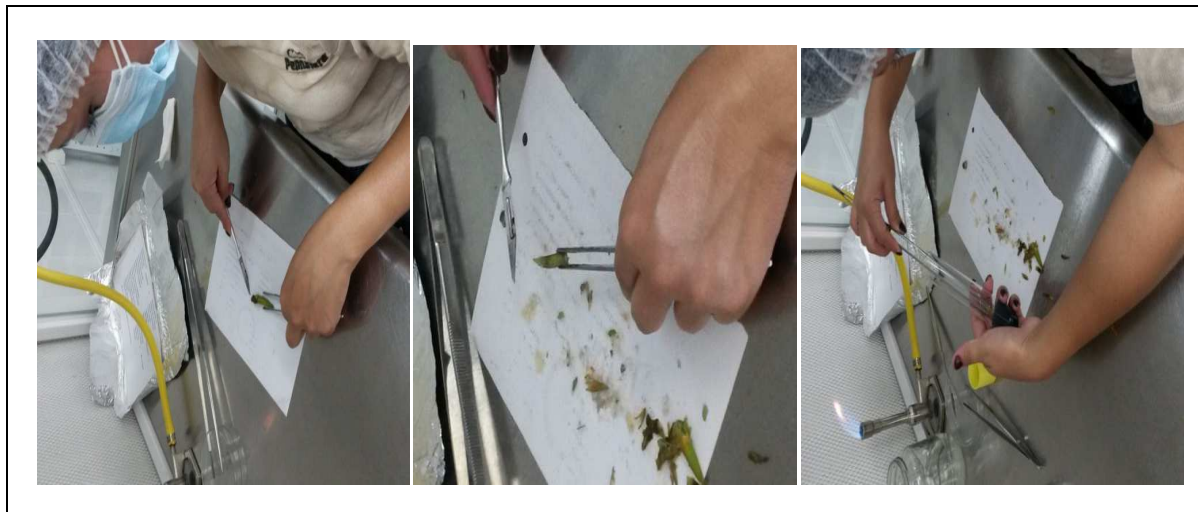
Resultados obtenidos de diferentes tiempos de inmersión a diferentes concentraciones de hipoclorito de Sodio.

Tratamiento 1 hipoclorito de Sodio al 1,5% (10 minutos)		
Tratamiento 2 hipoclorito de Sodio al 2% (10 minutos)		
Tratamiento 3 hipoclorito de Sodio al 2,5% (10 minutos)		
Tratamiento 4 hipoclorito de Sodio al 1,5% (15 minutos)		

<p>Tratamiento 5 hipoclorito de Sodio al 2 % (15 minutos)</p>		
<p>Tratamiento 6 hipoclorito de Sodio al 2,5% (15 minutos)</p>		
<p>Tratamiento 7 hipoclorito de Sodio al 1,5% (20 minutos)</p>		
<p>Tratamiento 8 hipoclorito de Sodio al 2% (20 minutos)</p>		
<p>Tratamiento 9 hipoclorito de Sodio al 2,5% (20 minutos)</p>		




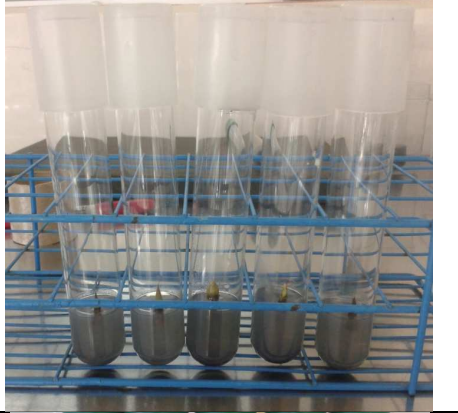




ANEXO C: FOTOS DE ESTABLECIMIENTO

Proceso para introducir el material



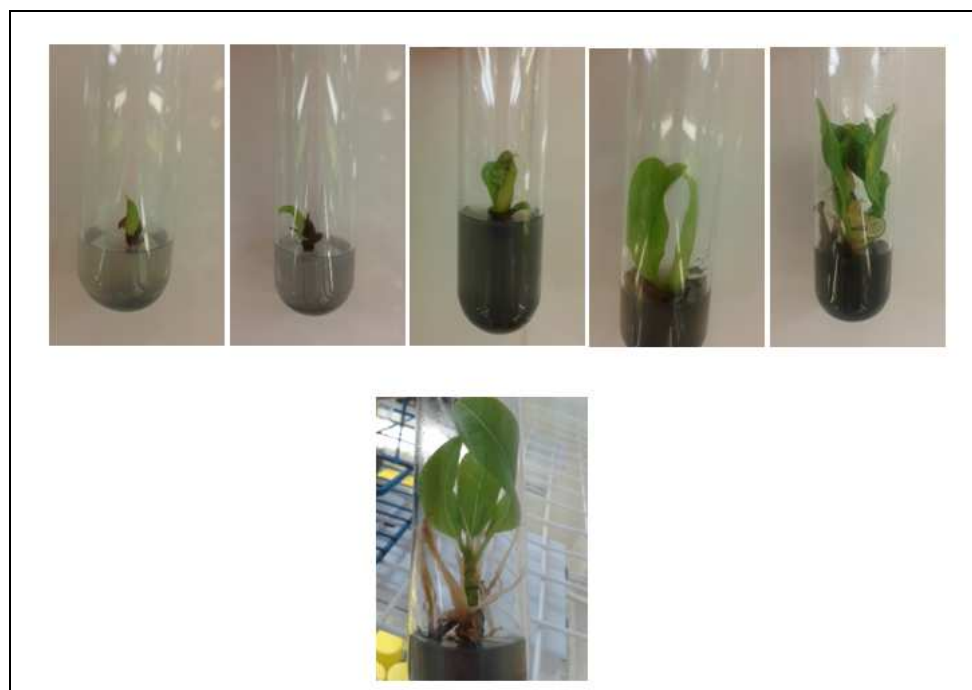
Resultados obtenidos con los diferentes tratamientos

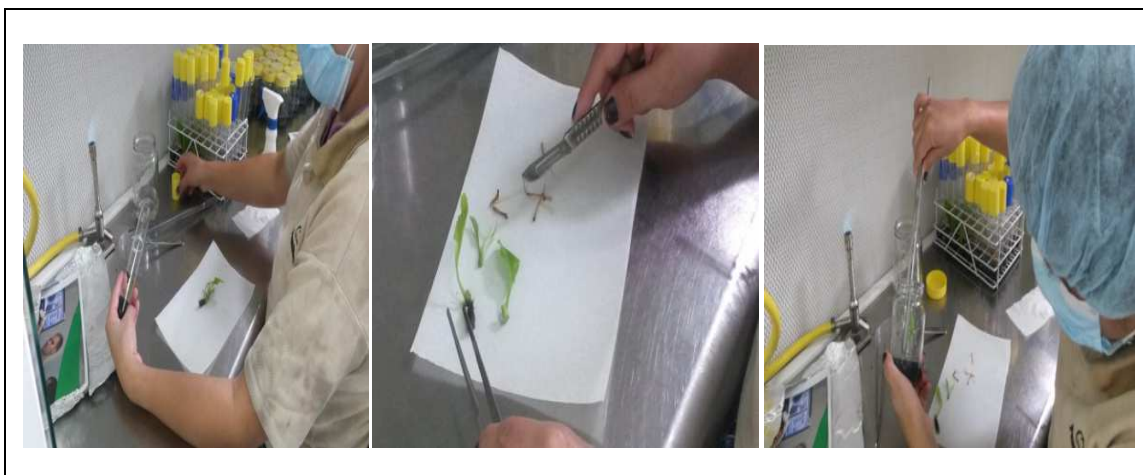
<p>Tratamiento 1</p> <p>BAP 1 mgL⁻¹</p>	
<p>Tratamiento 2</p> <p>BAP 2 mgL⁻¹</p>	



<p>Tratamiento 3</p> <p>BAP 3 mgL⁻¹</p>		
<p>Tratamiento 4</p> <p>brasinolida 0,3 mgL⁻¹</p>		
<p>Tratamiento 5</p> <p>brasinolida 0,6 mgL⁻¹</p>		
<p>Tratamiento 6</p> <p>brasinolida 0,9 mgL⁻¹</p>		










Resultados obtenidos con el tratamiento 3 (3 mgL⁻¹ BAP y MSV)



ANEXO D: FOTOS DE MULTIPLICACIÓN**Procedimiento realizado para multiplicar el material vegetal****Resultados obtenidos en los diferentes medios de multiplicación**

<p>Tratamiento 1 BAP 2 mg L⁻¹ ANA 0,5 mg L⁻¹</p>	
<p>Tratamiento 2 BAP 2 mg L⁻¹ ANA 1,5 mg L⁻¹</p>	

<p>Tratamiento 3 BAP 3 mg L⁻¹ ANA 0,5 mg L⁻¹</p>			
<p>Tratamiento 4 BAP 3 mg L⁻¹ ANA 1,5 mg L⁻¹</p>			
<p>Tratamiento 5 BAP 2 mg L⁻¹ AIB 0,5 mg L⁻¹</p>			
<p>Tratamiento 6 BAP 2 mg L⁻¹ AIB 1,5 mg L⁻¹</p>			

Tratamiento 7 BAP 3 mg L ⁻¹ AIB 0,5 mg L ⁻¹			
Tratamiento 8 BAP 3 mg L ⁻¹ AIB 1,5 mg L ⁻¹			
Control			

Resultados obtenidos en el medio de multiplicación (2 mgL⁻¹ BAP y 0,5mgL⁻¹ ANA)



ANEXO E: Teoría estadística

Prueba de Krustal Wallis

La prueba de Krustal Wallis nos permite saber si las hipótesis se pueden aceptar o rechazar, esto quiere decir si las diferencias entre los tratamientos indican variaciones idénticas respecto de las poblaciones de las que salieron. Las variables deben ser continuas y estar medidas en escala ordinal.

Sean n_1, n_2, \dots, n_k los tamaños de cada uno de los tratamientos y n el total. Se van a ordenar de mayor a menor las n para el cálculo del estadístico de prueba y de van a asignar rangos desde 1 hasta n . después de esto se va a obtener la suma de los rangos, R_j es el rango promedio. Si la hipótesis nula es cierta, el rango promedio va a ser aproximadamente igual para los k tratamientos; cuando dichos promedios sean muy diferentes es un indicio de que H_0 es falsa.

El estadístico de prueba es:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(n+1)$$

Si H_0 es cierta y los tamaños muestrales son mayores que 5, H se distribuye aproximadamente como chi-cuadrado con $k-1$ grados de libertad. Se aproxima más cuanto mayor es el número de muestras y el tamaño de las mismas.

Cuando hay cuando varias observaciones de la misma o de distintas muestras son iguales y todas tienen un rango igual, es necesario dividir el valor de H por el siguiente factor de corrección:

$$1 - \frac{\sum_{j=1}^0 (t_j^3 - t_j)}{n^3 - n}$$

En esta expresión g es el número de rangos que se repiten y t_i es el número de veces que se repite el rango i -ésimo. El efecto del factor de corrección es elevar ligeramente el valor de H .

Prueba de Chi cuadrado

La prueba de Chi cuadrado se utiliza con datos medibles en una escala nominal. Se usa con el fin de evaluar la aseveración que establece que todas las k muestras independientes vienen de poblaciones que presentan la misma proporción de algún elemento. Entonces H_0 muestra que todas las proporciones de la población son iguales y H_1 no todas las proporciones de la población son iguales, y de acuerdo con esto, las hipótesis son nulas o no.

Para esto se colocan los datos en una tabla de frecuencias. Para cada intervalo de valores se indica la frecuencia absoluta observada o empírica (O_i). Suponiendo que la hipótesis nula es cierta, se va a calcular para cada valor la frecuencia absoluta $E_i = n \cdot p_i$, donde n es el tamaño de la muestra y p_i la probabilidad del i -ésimo valor o intervalo de valores según la hipótesis nula). El estadístico de prueba se basa en las diferencias entre la (O_i) y E_i y se define como:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Se observa el estadístico con una distribución Chi-cuadrado con $k-1$ grados de libertad si n tiene todas las frecuencias esperadas mayores que 5. En la práctica se tolera un máximo del 20% de frecuencias inferiores a 5.

Al existir Si existe relación perfecta entre las frecuencias observadas y las esperadas el estadístico tomará un valor igual a 0; mientras que, si existe una diferencia entre estas frecuencias el estadístico va a tener un valor grande y, la hipótesis nula se rechazará.