

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – I.A.S.A.  
“GRAD. CARLOMAGNO ANDRADE PAREDES”

**“INCREMENTO DEL NÚMERO DE BROTES DE  
BABACO (*Vasconcellea x heilbornii* cv *BABACO*) *in vitro*  
MEDIANTE LA INTERACCIÓN DE REGULADORES DE  
CRECIMIENTO PARA LA REGENERACIÓN DE  
PLANTAS COMPLETAS”**

previa a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

IVONNE DE LOS ANGELES VACA SUQUILLO

El Prado, Enero de 2008.

I.A.S.A.

**“INCREMENTO DEL NÚMERO DE BROTES DE BABACO (*Vasconcellea x heilbornii* cv *BABACO*) *in vitro* MEDIANTE LA INTERACCIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS COMPLETAS”**

2008

## **CERTIFICACIÓN**

Certificado que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO. Como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO AGROPECUARIO.

Enero, 2008

Ing. César Falconí M.Sc MBA.  
DIRECTOR

Ing. Norman Soria M.Sc.  
CODIRECTOR

Ing. Jaime Villacís M.Sc.  
BIOMETRISTA

## **DEDICATORIA**

A Dios, por ser fuente de amor, esperanza y fortaleza durante toda mi vida.

A mis padres a quienes amo y respeto mucho, quienes con todo su esfuerzo, amor y comprensión han sabido guiarme por el camino correcto y han inculcado en mí grandes valores, quienes han sido y serán siempre el mejor ejemplo a seguir que Dios ha puesto en mi camino, les dedico todos y cada uno de mis logros.

A mi familia, quienes en todo momento han sabido darme ejemplos de amor, sacrificio y lucha, para poder alcanzar sus sueños, por todas y cada una de sus palabras de aliento.

A mis amigos a quienes considero como hermanos, que han sabido apoyarme, aconsejarme y darme una mano, y hasta un hombro cuando más lo he necesitado.

*Ivonne Vaca*

## AGRADECIMIENTO

A mis padres por ser el principal pilar de mi fortaleza y ser una fuente infinita de amor y comprensión, que con sus consejos y apoyo he conseguido culminar mis estudios y cumplir con éxito las metas propuestas.

Al Ing. César Falconí un gran científico, hombre y amigo, a quien admiró, respeto y aprecio mucho, por todo su apoyo y confianza.

Al Ing. Pablo Landázuri un gran investigador y amigo, a quien aprecio y admiro mucho, por su apoyo incondicional, toda su colaboración y paciencia para el correcto desarrollo y culminación de este proyecto.

Al Ing. Norman Soria y al Ing. Jaime Villacís por su apoyo y consejos para el desarrollo de la investigación.

A la Lic. Viviana Yáñez, Ing. Abraham Oleas, Ing. Juan Giacometti, Lic. Marco Taco, Ing. Diego Toledo y al Ing. Juan Tigrero por su apoyo incondicional, su ayuda y por transmitirme sus conocimientos.

Al Sr. Alejandro Patricio Núñez por su colaboración en la elaboración del presente trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, que con su valiosa amistad, consejos y apoyo he conseguido culminar el presente proyecto, en especial a la Srta. Adriana Terán, Sr. David Aguirre, Sr. David Arcos, Ing. Adriana López e Ing. Fernanda Amores.

A todos mis familiares y amigos, que en algún momento aportaron de forma tanto intelectual como espiritual para que logre mis objetivos, que en los momentos más difíciles supieron entregarme una palabra de aliento y siempre estuvieron pendientes, prestos para colaborar.

A la Carrera de Ciencias Agropecuarias, IASA1, por permitirme desarrollar mi carrera y el presente proyecto. Además por ser la madre de amistades inolvidables.

*Ivonne Vaca*

**HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR:**

**IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO**

**DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**CRNL. ESP. JARAMILLO**

**AB. CARLOS OROZCO**  
**SECRETARIO ACADÉMICO**

Sangolquí, Enero de 2008

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – I.A.S.A.**

**“INCREMENTO DEL NÚMERO DE BROTES DE BABACO (*Vasconcellea x heilbornii*  
*cv BABACO*) *in vitro* MEDIANTE LA INTERACCIÓN DE REGULADORES DE  
CRECIMIENTO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS COMPLETAS”**

**IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO**

**2008**

VIII

I.A.S.A.

**“INCREMENTO DEL NÚMERO DE BROTES DE BABACO (*Vasconcellea x heilbornii* cv *BABACO*) *in vitro* MEDIANTE  
LA INTERACCIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS  
COMPLETAS”**

2008

“INCREMENTO DEL NÚMERO DE BROTES DE BABACO (*Vasconcellea x heilbornii* cv BABACO) *in vitro* MEDIANTE LA INTERACCIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS COMPLETAS”

IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO

REVISADO Y APROBADO:

Ing. Alvaro Yépez

Coordinador de la Carrera de Ciencias Agropecuarias – IASA I

Ing. César Falconí M.Sc MBA

DIRECTOR

Ing. Norman Soria M.Sc

CODIRECTOR

Ing. Jaime Villacís M.Sc

BIOMETRISTA

Abg. Carlos Orozco

Delegado de la Unidad de Admisiones y Registros – IASA I

“INCREMENTO DEL NÚMERO DE BROTES DE BABACO (*Vasconcellea x heilbornii* cv BABACO) *in vitro* MEDIANTE LA INTERACCIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS COMPLETAS”

IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO

Aprobado por los señores miembros del tribunal de calificación del informe técnico.

	CALIFICACIÓN	FECHA
DIRECTOR		
Ing. César Falconí M.Sc MBA.	.....	.....
CODIRECTOR		
Ing. Norman Soria M.Sc	.....	.....

Certifico que estas calificaciones fueron presentadas en esta secretaría.

Abg. Carlos Orozco  
Delegado de la Unidad de Admisiones y Registros – IASA I

El Prado, Enero del 2008

**CERTIFICADO**

Los infraescritos Director y Codirector de la tesis de la alumna Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo, titulada “Incremento del número de brotes de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv *BABACO*) *in vitro* mediante la interacción de reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas completas” certificamos que fueron presentados los discos compactos que contienen el documento completo de la defensa del proyecto de investigación.

Ing. Cesar Falconí M.Sc MBA

**DIRECTOR**

Ing. Norman Soria M.Sc

**CODIRECTOR**

***DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA***

**CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

***DECLARACION DE RESPONSABILIDAD***

IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO

**DECLARO QUE:**

El proyecto de grado denominado “INCREMENTO DEL NÚMERO DE BROTES DE BABACO (*Vasconcellea x heilbornii* cv *BABACO*) *in vitro* MEDIANTE LA INTERACCIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS COMPLETAS”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

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

El Prado, 16 de Enero de 2008

---

IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO

***DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA***

**CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

***AUTORIZACIÓN***

Yo, Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “INCREMENTO DEL NÚMERO DE BROTES DE BABACO (*Vasconcellea x heilbornii* cv *BABACO*) *in vitro* MEDIANTE LA INTERACCIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS COMPLETAS”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

El Prado, 16 de Enero de 2008

---

**IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO**

# **DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

## **CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

### **CERTIFICADO**

Ing. César Falconí M.Sc MBA. e Ing. Norman Soria M.Sc

#### **CERTIFICAN**

Que el trabajo titulado “INCREMENTO DEL NÚMERO DE BROTES DE BABACO (*Vasconcellea x heilbornii* cv *BABACO*) *in vitro* MEDIANTE LA INTERACCIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS COMPLETAS”, realizado por Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a los resultados innovadores para la propagación de esta especie nativa, SI recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de dos documentos empastados y cinco discos compactos, los cuales contienen los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo que lo entregue a Ing. Alvaro Yépez, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

El Prado, Enero de 2008

---

**Ing. César Falconí Saa**  
DIRECTOR

---

**Ing. Norman Soria Idrovo**  
CODIRECTOR

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	OBJETIVOS .....	4
2.1.	OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO .....	4
2.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	4
III.	REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
3.1.	BABACO .....	5
3.1.1.	Generalidades .....	5
3.1.2.	Origen.....	5
3.1.3.	Taxonomía .....	6
3.1.4.	Descripción morfológica .....	7
3.1.5.	Condiciones ambientales .....	8
3.1.6.	Propagación .....	8
3.1.6.1	Propagación por estacas maduras .....	9
3.1.6.2	Propagación por estacas tiernas .....	9
3.1.6.3	Propagación por injertación .....	9
3.1.6.4	Cultivo de tejidos.....	10
3.1.7.	Plagas y enfermedades.....	12
3.2.	CULTIVO DE TEJIDOS <i>in vitro</i> .....	13
3.2.1.	Generalidades .....	13
3.2.2.	Usos.....	14
3.2.3.	Tipos de cultivo de tejido <i>in vitro</i> .....	15
3.2.3.1.	Cultivo de plantas intactas .....	16
3.2.3.2.	Cultivo de embriones .....	16
3.2.3.3.	Cultivo de meristemas y yemas axilares .....	16
3.2.3.4.	Organogénesis .....	17
3.2.3.5.	Embriogénesis somática .....	18
3.2.3.6.	Cultivo de células aisladas y protoplastos.....	19
3.2.4.	Medios de cultivo y componentes .....	19
3.2.4.1.	Constituyentes minerales.....	20
3.2.4.2.	Constituyentes orgánicos.....	20
3.2.4.2.1.	Carbohidratos o azúcares.....	20
3.2.4.2.2.	Vitaminas y aminoácidos.....	20
3.2.4.2.3.	Reguladores de crecimiento .....	21
3.2.4.3.1.	Auxinas.....	22
3.2.4.3.1.1.	AIA .....	22
3.2.4.3.1.2.	AIB .....	22
3.2.4.3.1.3.	ANA .....	22
3.2.4.3.1.4.	2,4- D .....	22
3.2.4.3.2.	Citocininas .....	24
3.2.4.3.2.1.	KIN (6-furfunil aminopurina) .....	24
3.2.4.3.2.2.	ZEA .....	24
3.2.4.3.2.3.	BAP o BA .....	24
3.2.4.3.2.4.	Adenina sulfato.....	24
3.2.4.3.3.	Giberelinas.....	27
3.2.4.3.4.	Otros.....	28
3.2.4.3.4.1.	Etileno .....	28
3.2.4.3.4.2.	ABA .....	28

3.2.4.4.	Gelificantes .....	29
3.2.4.5.	Otros .....	30
3.2.4.5.1.	Caseína hidrolizada .....	30
3.2.5.	Etapas de la propagación <i>in vitro</i> .....	30
3.2.5.1.	Etapa 0 .....	31
3.2.5.2.	Etapa I .....	31
2.5.2.1.	Selección del explante .....	31
2.5.2.2.	Protocolo de desinfección .....	33
3.2.5.3.	Etapa II .....	36
3.2.5.4.	Etapa III .....	36
3.2.5.5.	Etapa IV .....	37
3.2.6.	Factores físicos .....	37
3.2.6.1.	Luz .....	37
3.2.6.2.	Temperatura .....	38
3.2.6.3.	Humedad relativa .....	38
3.2.6.4.	pH .....	39
3.2.6.5.	Otros .....	39
3.2.6.5.1.	CO <sub>2</sub> .....	39
3.2.6.5.2.	Oxígeno .....	39
3.2.6.5.3.	Subcultivos .....	39
3.2.6.5.4.	Corriente eléctrica .....	39
3.2.7.	Factores limitantes .....	40
3.2.7.1.	Fenolización .....	40
3.2.7.2.	Contaminación .....	41
3.2.7.2.1.	Contaminación exógena .....	41
3.2.7.2.2.	Contaminación endógena .....	41
3.2.7.3.	Vitrificación .....	42
IV.	MATERIALES Y METODOS .....	43
4.1.	UBICACIÓN GEOGRÁFICA .....	43
4.2.	MATERIALES .....	43
4.3.	METODOLOGÍA .....	44
4.3.1.	Determinación el protocolo de desinfección más adecuado para la introducción de explantes de babaco <i>in vitro</i> .....	44
4.3.1.1.	Fase de introducción .....	45
4.3.1.1.1.	Elección de los explantes .....	45
4.3.1.1.2.	Desinfección de los explantes .....	45
4.3.1.1.3.	Pruebas de caracterización de la bacteria .....	47
4.3.1.1.4.	Antibiogramas .....	48
4.3.1.1.5.	Baño maría .....	50
4.3.2.	Fase de multiplicación .....	50
4.3.2.1.	Determinación de la dosis óptima de auxinas en la fase de multiplicación. ....	50
4.3.3.	Fase de enraizamiento .....	54
4.3.3.1.	Establecimiento del explante en la fase de enraizamiento para la selección del medio adecuado y la dosis óptima de auxina.....	54
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	57
5.1.	Determinación el protocolo de desinfección más adecuado para la introducción de explantes de babaco <i>in vitro</i> .....	57

<b>5.1.1.</b>	<b>Fase introducción</b> .....	57
<b>5.1.1.1.</b>	<b>Protocolo de desinfección</b> .....	57
<b>5.1.1.2.</b>	<b>Pruebas de caracterización de la bacteria</b> .....	59
<b>5.1.1.3.</b>	<b>Antibiogramas</b> .....	61
<b>5.1.1.4.</b>	<b>Baño maría</b> .....	62
<b>5.2.</b>	<b>Cuantificación de la dosis óptima de auxinas en la fase de multiplicación.</b> .....	62
<b>5.2.1.</b>	<b>Fase de multiplicación</b> .....	62
<b>5.3.</b>	<b>Establecimiento del explante en la fase de enraizamiento para la selección del medio adecuado y la dosis óptima de auxina</b> .....	80
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	93
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	93
<b>VIII.</b>	<b>RESUMEN</b> .....	94
<b>IX.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	95
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b> .....	96
<b>XI.</b>	<b>ANEXOS.</b> .....	110

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 4.3.1.1.2.1. Protocolos de desinfección para la introducción de los explantes de babaco, IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	46
<b>Cuadro 4.3.2.1.1. Fuente vegetativa, auxinas y dosis utilizadas para la inducción de brotes en la fase de multiplicación. IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	51
<b>Cuadro 4.3.3.1.1. Medio de cultivo, auxinas y dosis utilizadas en la fase de enraizamiento. IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	55
<b>Cuadro 5.1.1.1.1. Porcentaje de contaminación bacteriana, contaminación fúngica y mortalidad de los explantes de babaco en el medio de introducción, IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	57
<b>Cuadro 5.1.1.2.1. Test API 20 E para identificación de bacilos Gram negativos, IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	60
<b>Cuadro 5.1.1.3.1. Porcentaje de formación de halo para los antibiogramas, IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	61
<b>Cuadro 5.2.1.1. Análisis de la varianza para el número de brotes formados y la longitud del brote en los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	62
<b>Cuadro 5.2.1.2. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar del número de brotes formados y la longitud del brote, para la fuente vegetativa de los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	63
<b>Cuadro 5.2.1.3. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar el número de brotes formados y la longitud del brote, para las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	64
<b>Cuadro 5.2.1.4. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar del número de brotes formados y la longitud del brote, para las dosis de las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	65
<b>Cuadro 5.2.1.5. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar del número de brotes formados y la longitud del brote, para los tratamientos en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	67
<b>Cuadro 5.2.1.6. Análisis de la varianza para el porcentaje de formación de callo, porcentaje del área del explante cubierta por callos y formación de hojas nuevas en los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	69
<b>Cuadro Cuadro 5.2.1.7. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar del área del explante cubierta por callos para la fuente vegetativa de los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007</b> .....	70

<b>Cuadro 5.2.1.8. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar del porcentaje del área del explante cubierta por callos, y formación de hojas nuevas para las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007.....</b>	<b>70</b>
<b>Cuadro 5.2.1.9. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar del porcentaje de formación de callo, porcentaje del área del explante cubierta por callos y formación de hojas nuevas para las dosis de las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>71</b>
<b>Cuadro 5.2.1.10. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar del porcentaje del área del explante cubierta por callos y formación de hojas nuevas para los tratamientos en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>73</b>
<b>Cuadro 5.2.1.11. Análisis de la varianza para de fenolización, contaminación bacteriana y de amarillamiento en los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>74</b>
<b>Cuadro 5.2.1.12. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar de fenolización, contaminación bacterianas y amarillamiento del explante para la fuente vegetativa de los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>75</b>
<b>Cuadro 5.2.1.13. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar de fenolización y contaminación bacteriana del explante para las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>76</b>
<b>Cuadro 5.2.1.14. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar de fenolización y contaminación bacteriana del explante para las dosis de las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>77</b>
<b>Cuadro 5.2.1.15. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar de fenolización, contaminación bacteriana y amarillamiento del explante para los tratamientos en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>78</b>
<b>Cuadro 5.2.1.16. Porcentaje de mortalidad en la fase de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>80</b>
<b>Cuadro 5.3.1. Análisis de la varianza para el número de raíces, contaminación fúngica, contaminación bacteriana y amarillamiento del explante en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>81</b>
<b>Cuadro 5.3.2. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar del número de raíces, contaminación fúngica, contaminación bacteriana y amarillamiento del explante para el medio de cultivo en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>82</b>
<b>Cuadro 5.3.3. Promedio (<math>\pm</math>) del error estándar del número de raíces y contaminación fúngica para las auxinas utilizadas en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>84</b>

**Cuadro 5.3.4. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de raíces, contaminación fúngica y contaminación bacteriana del explante para las dosis de las auxinas utilizadas en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007 ..... 85**

**Cuadro 5.3.5. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de raíces, contaminación fúngica, contaminación bacteriana y amarillamiento del explante para los tratamientos en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007 ..... 86**

**Cuadro 5.3.6. Porcentaje de enraizamiento y mortalidad de los explantes de babaco, para los tratamientos en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007 ..... 89**

**Cuadro 5.3.7. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del porcentaje de enraizamiento y número de raíces para las dosis de las auxinas utilizadas en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007 ..... 91**

## LISTADO DE GRÁFICOS

<b>Figura 3.2.4.3.1.1. Molécula de AIA.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 3.2.4.3.2.1. Molécula de KIN .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 3.2.4.3.2.2. Molécula de ZEA.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 3.2.4.3.2.3. Molécula de BAP .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 3.2.4.3.3. Molécula de GA<sub>3</sub> .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 3.2.4.3.4.1. Molécula de Etileno.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 3.2.4.3.4.2. Molécula de ABA .....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 5.1.1.3.1. A) No formación de halo y B) Formación de halo, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 5.2.1.1. A) Fuente basal con brote, B) Fuente Media con brote y c) Fuente apical sin brote, en la fase de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 5.2.1.2. Promedio (±) del error estándar de la longitud del brote bajo el efecto de la interacción Fuente*Auxina, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 5.3.1. A) T2 con una raíz, B) T3 con dos raíces y C) T11 sin raíces, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 5.3.2. Promedio (±) del error estándar del número de raíces formadas por efecto de la interacción Medio*Dosis, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 5.3.3. Promedio (±) del error estándar del número de raíces formadas por efecto de la interacción Dosis*Auxina, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 5.3.4. Promedio (±) del error estándar del número de raíces formadas por efecto de la interacción Dosis*Auxina*Medio, IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 5.3.5. A) Explante enraizado por efecto del T7 y B) No enraizado por el efecto del T4, observados bajo el microscopio estereoscopio (10x), IASA 1, Ecuador, 2007 .....</b>	<b>90</b>

**LISTADO DE ANEXOS**

<b>Anexo 1. Medios de cultivo .....</b>	<b>110</b>
<b>Anexo 2. Pruebas para caracterización de la bacteria .....</b>	<b>112</b>
<b>Anexo 2.1. Tabla de lectura Test API 20 E .....</b>	<b>112</b>
<b>Anexo 2.2. Tablas de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>.....</b>	<b>113</b>
<b>Anexo 3. Clave arbitraria para evaluar el porcentaje del área cubierta por callo y del área contaminada (bacteria y/u hongo).....</b>	<b>113</b>
<b>Anexo 4. Escala Colorimétrica establecida en por Lindsey y Brown 2006 .....</b>	<b>114</b>
<b>Anexo 5.1. Confrontación los resultados obtenidos en el Test API 20E sobre la bacteria, con la tabla de características fenotípicas para determinar fenotipos y razas de bacterias, Gardan <i>et al.</i>, 2004 .....</b>	<b>114</b>
<b>Anexo 5.2. Dendograma de fenotipos y razas de bacterias, Gardan <i>et al.</i>, 2004 ..</b>	<b>115</b>

**NOMENCLATURA UTILIZADA**

AIA	Ácido indol acético
ANA	Ácido naftalen acético
2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
AIB	Ácido indol butírico
CC	Medio Cohen y Cooper (1982)
LQ	Medio Quoirin y Lepoivre (1977)
°C	Centígrados.
cm	Centímetro.
mm	Milímetro.
g	Gramo.
mg	Miligramo
ha	Hectárea.
kg	Kilogramo.
L	Litro.
mL	Mililitro
μL	Microlitro
meq	Miliequivalentes
ppm	Partes por millón.
h	Hora.
Min	Minuto.
s	Segundo
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado
μM	Micromolar
UFC	Unidad formadora de colonias

## I. INTRODUCCIÓN

El babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv babaco) es una planta nativa del Ecuador, originaria de la provincia de Loja, que se cultiva principalmente en la serranía ecuatoriana en las provincias de Tungurahua, Loja, Imbabura, Pichincha y Carchi (Fabara *et al.* 1985; Soria y Viteri, 1999; MAG, 2001).

Este cultivo es de gran interés comercial, por su gran potencial económico en los mercados internacionales, debido a sus propiedades sensoriales (olor y sabor) y potencial en la extracción de enzimas proteolíticas. Estas cualidades han catapultado a este frutal en mercados internacionales como fruta exótica, llegando a comercializarse hasta en 3.20USD kg<sup>-1</sup> (Villareal *et al.* 2003©). El cultivo de babaco presenta una de las más altas tasas de retorno dentro de los frutales, ya que puede alcanzar un rendimiento promedio de 225Tm ha<sup>-1</sup> durante su período de producción de dos a dos y medio años, con una densidad de 5500 plantas ha<sup>-1</sup> (PROEXANT, s.f.). Actualmente, el productor ecuatoriano tiene la oportunidad de exportar a Holanda y Alemania, principales países consumidores de babaco en el mundo (MAG, 2001).

Las expectativas que crea la exportación de babaco en el agricultor han incrementado su necesidad de propagación. Pero, debido a su forma de reproducción vegetativa o asexual, la multiplicación del babaco se realiza a través de estacas provenientes de cultivos comerciales, ya que el fruto no produce semilla, es decir es partenocárpico (Fabara *et al.* 1985; Soria y Viteri, 1999; Galarza, 2002). Sin embargo, al realizar este tipo de propagación los problemas esenciales son la diseminación de enfermedades internas de la planta madre y la pérdida de variabilidad genética que facilita la adaptación de los microorganismos al medio (Fabara *et al.*, 1985; Cañizares, 1998). En el país la marchites

vascular del babaco (MVB), es la enfermedad radicular más importante ya que puede llegar a una incidencia de hasta el 100%, ésta es transmitida fácilmente a través del material de propagación contaminado (Falconí *et al.*, 2006).

Los problemas fitosanitarios del cultivo, empiezan por la falta de certificación de plantas, éste proceso en general precisa de un protocolo estricto de selección, desinfección y seguimiento del material vegetal tanto en su fase de multiplicación en vivero, así como en las plantaciones definitivas (MAG, 2001; Falconí *et al.*, 2006).

Para controlar estos problemas se han realizado varios trabajos de propagación de babaco *in vitro* (Cañizares, 1998) y *ex vitro* (Viteri, 1988) para obtener plantas libres de patógenos. Otros trabajos realizados por Vega y Kitto (1990), se enfocaron en la producción masiva *in vitro* de babaco a partir de óvulos y pedúnculos, induciendo a la formación de callos, con el uso de reguladores de crecimiento. Lastimosamente los trabajos mencionados no han presentado resultados consistentes, puesto que no han logrado obtener plantas completamente enraizadas, llegando únicamente hasta la obtención de callos.

Otros estudios realizados sobre babaco *in vitro*, en la Universidad Central del Ecuador, indican la posibilidad de obtener plantas completas de babaco, cultivando en el medio MS con modificación para Caricáceas, utilizando la interacción de auxinas, citocininas y azúcar (Martínez y Tafur, 2002). Otras investigaciones, se han realizado en los laboratorios de la Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA, tendientes a la producción de plantas libres de enfermedades, existiendo trabajos preliminares de propagación *ex vitro* de babaco para su posterior injertación sobre patrones de papaya, incrementando la resistencia del babaco a

ciertas enfermedades, contribuyendo a incrementar su producción (Chávez, 2006; Falconí *et al.*, 2006).

La micropropagación es una de las principales alternativas para la producción de plantas con un menor riesgo de enfermedades en un corto lapso de tiempo. Para el caso del babaco ésta técnica ya se ha difundido en Europa, principalmente en Italia. Cohen y Cooper (1982) citados en Cossio (1987), publicaron el método de cultivo *in vitro*, en donde el explante constituye un pequeño segmento del tallo con un nudo sembrado en éste medio de cultivo, constituido principalmente por macroelementos de Knop, microelementos y vitaminas de Murashige y Skoog, caseína hidrolizada y citocininas; además, reporta una tasa de multiplicación *in vitro* de 3x, llegando a obtener 100000 plantas listas para campo en un año. En Ecuador se han hecho algunos intentos de micropropagación, reportando considerables avances en ésta técnica (Cañizares, 1998).

El presente estudio plantea a la micropropagación como una opción viable para la producción de plantas completas de babaco, libres de enfermedades. A continuación se experimenta con diferentes reguladores de crecimiento y medios para enraizamiento, para generar material sano, en un lapso corto de tiempo.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Incrementar el número de brotes de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv BABACO) *in vitro* mediante la interacción de reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas completas

### 2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar el protocolo de desinfección más adecuado para la introducción de explantes de babaco *in vitro*.

Determinar la dosis óptima de auxinas en la fase de multiplicación que permita obtener el mayor número de brotes.

Determinar el medio adecuado y la dosis óptima de auxina para el enraizamiento y obtención del mayor número de raíces.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. BABACO

##### 3.1.1. Generalidades

El babaco es una planta que es apreciada principalmente por su aroma y sabor exclusivos, que permite aprovecharlo en diversos productos, lo que ha despertado el interés tanto nacional como internacional. En las últimas décadas éste cultivo ha sido introducido a diversos países. En el año 1973 inicia su cultivo en Nueva Zelanda y en los años 80s se introduce a Italia, Australia, España, Francia, Sudáfrica y Suiza. Conjuntamente Holanda y Canadá empezaron sus ensayos bajo invernadero. Además, se inicia la producción por vía meristemática en laboratorio para venta de plantas. Ecuador empezó a cultivar el babaco de forma comercial en los años 90s. A finales de la misma década fue introducido a invernadero, con altibajos tanto en rendimiento como en problemas fitosanitarios. (Fabara *et al.*, 1985; Cacioppo, 1987; Scheldeman *et al.*, 2003).

##### 3.1.2. Origen

El género *Vasconcellea* es endémico de las regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica, principalmente de la cordillera de los Andes. Con excepción de una especie originaria de México, posee entonces 21 especies que se distribuyen desde México hasta Chile (Badillo, 2000 citado en Scheldeman y Van Damme, 2003)

El babaco es una planta originaria del Ecuador, de la región centro-sur, específicamente de la provincia de Loja (Fabara *et al.*, 1985; Cacioppo, 1987; MAG, 2001). De acuerdo a estudios realizados por Morales *et al.* (2004), la provincia de Loja es la más rica en diversidad de especies, pues esta zona goza de variedad de climas y microclimas, que constituyen en

el ecosistema ideal para el desarrollo de muchas especies, subespecies y ecotipos de plantas.

Este frutal se cultiva principalmente en la región sierra en las provincias de Tungurahua, Loja, Imbabura, Pichincha, Chimborazo, Carchi, entre otras (Fabara *et al.*, 1985; Soria y Viteri, 1999; MAG, 2001).

### 3.1.3. Taxonomía

Actualmente el género *Vasconcellea* fue rehabilitado como tal, en lugar de una sección del género *Carica*, dentro de la familia Caricaceae (Badillo 2000 citado en Scheldeman y Van Damme, 2003; Scheldeman *et al.*, 2003).

Una clasificación basada en un análisis AFLP, determinó alta inconsistencia en la clasificación de las especies *V. cundinamarcensis*, *V. stipulata* y *V. × heilbornii*, debido a su alta variabilidad genética (Van Droogenbroeck *et al.*, 2000 *in* Scheldeman *et al.*, 2003). Esta variabilidad se amplió, a causa de la descripción de nuevas especies de *Vasconcellea*, durante un último estudio etnobotánico. En la última revisión de la familia Caricaceae, Badillo (1993) *in* Scheldeman *et al.* (2003), menciona los numerosos notomorfos o variedades del híbrido natural babaco (*Vasconcellea x heilbornii cv babaco*) en la zona sur del Ecuador que aun no han sido descritos. Debido al alto porcentaje de hibridación natural y las posibles retrocruzas al sur del país, resulta muy complicado establecer una clasificación taxonómica sólida.

La primera descripción taxonómica del babaco fue realizada por Heilborn (1922), al creer que era una nueva especie le asignó el nombre de *Carica pentagona*; Badillo en el año

1987, determinó que el babaco es un híbrido natural del cruce entre chamburo (*Vasconcellea pubescens*) y el toronche (*V. stipulata*) por lo que se lo clasificó como *Carica x Heilbornii* (Badillo) variedad *pentagona* (Heilborn) (Soria y Viteri, 1999). Pero de acuerdo a las correcciones recientes el babaco ha sido clasificado de la siguiente manera (Badillo, 1993 in Scheldeman *et al.*, 2003):

Reino:	Plantae
División:	Anthophyta
Clase:	Angiospermae
Subclase:	Magnoliopsida (Dicotiledónea)
Orden:	Parietales
Familia:	Caricaceae
Género:	<i>Vasconcellea</i>
Nombre científico:	<i>Vasconcellea x heilbornii cv babaco</i>
Nombres comunes:	Babaco
	Papaya de montaña
	Papayuela

#### 3.1.4. Descripción Morfológica

El babaco es una planta arbustiva semi-perenne, con un tallo herbáceo mayor a dos metros de altura. Su sistema radical está conformado por raíces carnosas y gruesas con una longitud de 1m aproximadamente, es muy sensible a enfermedades y al encharcamiento del suelo (Merino, 1989; Soria y Viteri, 1999; PROEXANT, s.f.).

Su tallo es erecto, cilíndrico, no es leñoso, puede alcanzar una altura de 2.5m en un año y un diámetro entre 30 y 40cm. (Soria y Viteri, 1999; PROEXANT, s.f.). Es considerada como una planta siempre verde, sus hojas se encuentran ubicadas en forma de espiral

alternas a lo largo del tallo; el pecíolo es largo y carnosos, las hojas son de forma lobulada con 5 a 7 lóbulos (Fabara *et al.*, 1985; Merino, 1989; PROEXANT, s.f.).

El babaco es una planta monoica, ya que produce solo flores femeninas; éstas aparecen cuando termina la fase juvenil de la planta en la axila de las hojas. Son de forma acampanada, tienen cinco pétalos de color verde blanquecino y su cáliz es de color verde oscuro. (Fabara *et al.*, 1985; Merino, 1989; PROEXANT, s.f.). Produce un fruto por flor, es una baya sin semillas (partenocárpica) que se desarrolla sin necesidad de polinización, es alargado, posee cinco caras y cinco aristas, es un fruto climatérico de color verde tornándose amarillo cuando madura. (Merino, 1989; Cañizares, 1998; Soria y Viteri, 1999; PROEXANT, s.f.)

### **3.1.5. Condiciones ambientales**

El babaco se cultiva principalmente en la región sierra del Ecuador, además de los valles subtropicales y el oriente del país. Es cultivado generalmente a altitudes entre 800 y 2600 m.s.n.m. Prefiere una temperatura entre 15-20°C, bajo invernadero la temperatura adecuada es de 20-25°C. El cultivo se adapta fácilmente a zonas con una precipitación que puede variar entre 400-1200mm anuales, y una humedad relativa entre 50-100% (Cacioppo, 1987; Soria y Viteri, 1999).

### **3.1.6. Propagación**

El babaco al poseer un fruto partenocárpico, es decir que no producen semilla, se propaga exclusivamente de forma asexual o vegetativa (Fabara, *et al.*, 1985; Merino, 1989; Soria y Viteri, 1999), existiendo cuatro tipos de propagación:

### **3.1.6.1. Propagación por estacas maduras**

Esta forma de multiplicación consiste en obtener estacas de plantas maduras, que hayan terminado su ciclo de producción. La longitud de las estacas varía entre 25 - 30cm y su diámetro entre 4-6cm. El corte superior se lo realiza en bisel para evitar que se empoce el agua y, el corte basal es transversal para ofrecer una mayor superficie para enraizamiento. Se realiza la desinfección de las estacas y se siembra en un sustrato adecuado, constituido por tierra, pomina y humus, en la relación 3:1:1. La estaca habrá enraizado en diez semanas (Soria y Viteri, 1999; PROEXANT, s.f.).

### **3.1.6.2. Propagación por estacas tiernas**

En este método se obtienen las estacas de plantas en crecimiento o plantas en producción de brotes, la longitud de las estacas es de 10cm y su diámetro varía entre 1.5 – 2.5cm. Las estacas son desinfectadas previamente, y sembradas en un sustrato estéril, compuesto por tierra y pomina (2:1), finalmente son cubiertas con plástico para mantener la humedad de 90% y temperatura necesarias de 22°C. Las estacas estarán listas para el transplante a las 6 o 7 semanas (PROEXANT, s.f.). Soria y Viteri (1999), recomiendan el uso de aserrín de pino como sustrato y la hormona Acido Indol butírico (IBA) en dosis de 1500 ppm para mejorar el enraizamiento.

### **3.1.6.3. Propagación por injertación**

La injertación en babaco se utiliza principalmente para el control de MVB, buscando fuentes de resistencia. Con este fin se han utilizado como patrones al chamburo (*Vasconcellea cundinamarcensis*), toronche (*V. stipulata*), chigualcan (*V. pubescens*), mausha (*V. weberbaueri*) (Scheldeman, *et al.*, 2003) y papaya (*Carica papaya*) (Soria y Viteri, 1999; Galarza, 2002; Falconí, *et al.*, 2006; PROEXANT, s.f.). Scheldeman, *et al.*

(2003), reportan una combinación de resistencia media a *Fusarium oxysporum* y susceptibilidad alta a *Meloidogyne incognita* para *V. cundinamarcensis* y *V. stipulata*, y presentan resistencia contra *F. oxysporum* y baja susceptibilidad a *M. incognita* para *V. monoica* y especialmente para *V. weberbaueri*.

El injerto de púa terminal es el más utilizado en el caso de babaco. Esta técnica consiste en la decapitación del patrón a los 10-15cm; sobre éste se realiza un corte longitudinal transversal donde se coloca el injerto, el injerto (babaco) debe tener una longitud de 10cm y un diámetro entre 1-1,5cm, en éste se realiza un corte en bisel, se coloca sobre el patrón y se cubre con una cinta plástica (Soria y Viteri, 1999; PROEXANT, s.f.). Chávez (2006), reporta para el injerto de púa terminal decapitar al patrón a los 5cm, y para el injerto haber utilizado diámetros entre 1,04 y 0,77cm, siendo el mayor diámetro el que presentó el promedio más alto de crecimiento.

En estudios realizados por Chávez (2006), sobre la injertación de babaco sobre tres variedades de papaya como se concluyó que la papaya hawaiana presenta un mejor rendimiento con un 85%, seguido por la papaya criolla con un 73%. Además el patrón papaya criolla presenta los mejores incrementos en altura y diámetro, tanto en laboratorio como en campo, seguidos por el patrón papaya hawaiana. Mientras papaya Maradol presenta los valores más bajos de las variables tomadas, el patrón babaco siempre superó a los demás patrones en todos los casos.

#### **3.1.6.4. Cultivo de tejidos**

Con el fin de obtener una propagación de forma rápida, a gran escala y de plantas sanas, libres de virus, bacterias, entre otros; la micropropagación y el cultivo de meristemas, son

excelentes opciones explotadas para la multiplicación del cultivo de babaco (Fabara, *et al.*, 1985; Soria y Viteri, 1999). Países como Italia, Nueva Zelanda y Australia, han obtenido óptimos resultados en la micropropagación de babaco (Cacioppo, 1987).

Según estudios realizados por Vega y Kitto (1990), sembraron óvulos en varios estados de desarrollo y secciones nodales del pedúnculo de babaco, en medio Murashige y Skoog (MS) adicionando reguladores de crecimiento, y lograron obtener callos y brotes. La iniciación de callos a partir de los óvulos fue inducida mediante un pretratamiento en frío (4°C), incubados en la oscuridad, estos finalmente formaron brotes primordiales. De los pedúnculos se obtuvieron brotes axilares.

Jordan y Velozo (1997), reportan el cultivo *in vitro* de yemas axilares y explantes de hojas de *Vasconcellea pubescens* y *V. pentagona*, las yemas axilares fueron sembradas en medio MS y luego, con éstas se realizaron suspensiones celulares en el medio Nitsch y Nitsch (NN), mientras que las hojas fueron sembradas en el medio Woody Plant Medium (WPM). Las yemas axilares de babaco sembradas en medio MS formaron callos no embriogénicos pero iniciaron la formación de brotes. El cultivo de células a partir de yemas de babaco solo formó microcallos algunos desarrollaron, pero se tornaron oscuros. El cultivo de hojas de babaco adicionado TDZ indujo a la formación de brotes, mientras el resto de cultivos adicionando otros reguladores de crecimiento no fueron efectivos. Otros estudios realizados sobre babaco *in vitro*, en la Universidad Central del Ecuador, indican la posibilidad de obtener plantas completas de babaco en 120 días, cultivando en el medio MS con modificación para Caricáceas, utilizando una interacción de auxinas, citocininas y azúcar, en una relación 1: 1,13: 75000 (Martínez y Tafur, 2002).

### 3.1.7. Plagas y enfermedades

En el babaco se han detectado algunas plagas y enfermedades. Pero es importante recalcar que este frutal es sensible a la fitotoxicidad y defoliándose con facilidad (Merino, 1989).

Entre las principales plagas se encuentran los nematodos y los ácaros. *Meloydogine*, es el género de nematodo que usualmente es detectado en plantaciones de babaco afectadas, éste provoca agallas en las raíces que impiden la absorción de nutrientes, provocando menor crecimiento y producción, incluso la muerte de la planta. El control de una población baja de nemátodos, puede realizarse con un hongo nematófago (*Arthrobotrys irregularis*), también se puede aplicar *Bacillus penetrans* ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) o *Paecilomyces lilacinus* ( $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>), pero si la densidad poblacional es alta se controla con nematicidas como Carbofurán ( $20-30\text{g planta}^{-1}$ ). Los ácaros también conocidos como araña roja (*Tetranychus urticae*), atacan principalmente a las hojas provocando clorosis hasta una coloración plateada. Cuando su ataque es fuerte puede causar la caída de las hojas y defoliación total, además ataca a los frutos causando los mismos daños, disminuyendo la calidad del fruto y provocando pérdidas económicas. Su control en etapas iniciales puede ser biológico con depredadores (*Phytoseiulus persimilis*, *Amblyseius* sp., *Neoseiulus* sp.), pero en etapas avanzadas se utiliza acaricidas (productos azufrados). Una vez más, se debe tener cuidado con la dosis ya que el babaco es muy sensible a la fitotoxicidad (Merino, 1989; MAG, 2001).

Entre las enfermedades del babaco, están la Alternariosis, más conocida como lancha. Esta es causada por hongos (*Alternaria* sp), mostrando clorosis y manchas de anillos concéntricos en las hojas, en casos extremos puede provocar la caída de las hojas hasta una defoliación total. Su control puede ser biológico mediante el uso de controladores como

*Bacillus* spp. ó *Aureobasidium pullulans*; sin embargo generalmente su control es completamente químico, aplicando ácidos grasos en dosis de 2L 100L<sup>-1</sup> de agua, oxiclóruo de cobre 0,5kg 100L<sup>-1</sup> de agua o productos como Thiram, Maneb, Mancozeb, Metiran o Propineb en una dosis de 0,25% (Merino, 1989; MAG, 2001).

La marchitez vascular del babaco (MVB) es una enfermedad producida por *Fusarium oxysporum*. Este hongo, provoca la pérdida de la mayoría de raíces, con lo que se debilita la planta, se amarillan las hojas y se defolian, pudiendo provocar hasta la muerte de la planta. La MVB es la enfermedad más importante del cultivo por su amplia distribución y es de fácil transmisión por el material de propagación contaminado (Fabara *et al.*, 1985). Su control es químico, con el uso de productos como Basamid (40g m<sup>2</sup>), Benlate (0,1%) o Carbendazin (5g L<sup>-1</sup>). El control biológico puede realizarse con *Trichoderma viride* (10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), *T. harzianum* (10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) o *Gliocladium virens* (10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) (MAG, 2001). El método más efectivo para el control de los marchitamientos, ha sido el uso de variedades resistentes, ya que los fungicidas de contacto son inútiles puesto que el hongo se encuentra en el interior de la planta (Soria y Viteri, 1999)

### **3.2. CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro***

#### **3.2.1. Generalidades**

El cultivo *in vitro* se basa en la “totipotencia celular”, esto es la capacidad de las células para regenerarse en una planta completa. Este tipo de propagación se realiza en estrictas condiciones de asepsia, con medios de cultivo nutritivos y condiciones artificiales controladas, simulando el medio de la planta madre (Jordan y Goreaux, 1990; Reyes y Hewstone, 1994 citados por Toro, 2004).

### 3.2.2. Usos

El cultivo de tejidos es utilizado para el mejoramiento genético, la obtención de material sano, la conservación de germoplasma y la micropropagación.

El mejoramiento genético favorece a la recuperación de características deseables, puesto que existe la variación somaclonal, que está dada por diferencias genéticas preexistentes en las células somáticas. Además, ofrece la oportunidad de obtener rápidamente líneas homocigóticas verdaderas, que pueden ser utilizadas para la obtención de cultivares híbridos (Roca, *et al.* 1991; Gutiérrez, *et al.* 2003). El mejoramiento genético facilita también la selección celular *in vitro*, y mediante el rescate de embriones evita el proceso de aborto así como favorece la germinación; existe también la transformación genética que permite introducir genes de interés a una célula o tejido mediante el uso de un vector, para obtener plantas transgénicas (Gutiérrez, *et al.* 2003).

La obtención de plantas sanas, es decir de plantas libres de patógenos, se obtiene mediante el cultivo de meristemas (Roca y Mroginski, 1991b).

La conservación *in vitro* de los recursos genéticos, en forma de semilla o en estado vegetativo, permite el mantenimiento de grandes colecciones de germoplasma en espacios reducidos, mediante el sistema de crioconservación, durante largos períodos de tiempo y en buen estado (INTA, 2003©).

Según Kleyn (1996) *in* Fontúrbel (2002), la micropropagación es una técnica basada en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, que permite la reproducción de cientos de clones de plantas de una misma especie, a partir de cualquier parte aislada de la planta, sean trozos de

tejidos, ápices meristemáticos o hasta células aisladas. El principal objetivo es la obtención de un gran número de plantas en corto tiempo y espacio (Toro, 2004). La micropropagación ofrece algunas ventajas como acortar el tiempo de producción y economizar el espacio. Además, éste es un método rápido y efectivo que permite la multiplicación masiva de plantas uniformes, permite la producción de plantas sanas (libres de virus y enfermedades), mejora el enraizamiento para plantas que son difíciles de enraizar, se puede propagar durante todo el año sin necesidad de interrumpir su producción, se mantienen bajo condiciones controladas, facilita la exportación de plantas *in vitro*, ayuda en la geminación y rompe la dormancia (Macdonald, 1990; Toro, 2004).

Algunas de las desventajas y limitaciones que presenta la micropropagación son: el capital inicial para laboratorios y equipos puede ser muy elevado, además de los costos de mantenimiento y requerimiento de personal especializado; aún no es un proceso económicamente rentable, a pesar que esto depende del cultivo y del mercado. Existen otros problemas en las fases de enraizamiento y adaptación, por el cambio de un ambiente estéril a un ambiente diferente con menor control; no se puede usar en especies recalcitrantes y puede haber variación genética respecto a la planta madre (Macdonald, 1990; Toro, 2004).

### **3.2.3. Tipos de cultivo de tejido *in vitro***

Existen diversas metodologías de cultivo de tejido *in vitro*, de igual manera que existen diferentes materiales que constituyen las plantas útiles para el mismo. Así tenemos los siguientes tipos de cultivos:

### **3.2.3.1. Cultivo de plantas intactas**

Se basa en el cultivo *in vitro* de semillas, obteniéndose una plántula y finalmente una planta completa (Pierik, 1990).

### **3.2.3.2. Cultivo de embriones**

Se inició en 1940, cuando Hanning demostró la posibilidad de remover embriones maduros de los óvulos de planta y cultivarlos en un medio estéril con los nutrientes necesarios, logrando que se desarrollen y germinen normalmente, para finalmente obtener plántulas a los 2 ó 3 semanas. Existe también la posibilidad de dividir longitudinalmente a los embriones, en éste caso se obtendrían dos plantas idénticas. (Litz, 1991).

El cultivo de ovarios y óvulos, resulta en ciertos aspectos más fácil y rápido que el cultivo del embrión propiamente dicho. El cultivo de embriones requiere mayor tiempo y personal capacitado, medios más complicados, con los nutrientes necesarios y condiciones específicas de incubación; además, durante el rescate del embrión, éste puede resultar dañado, indiferenciado o muy pequeño, haciendo difícil su desarrollo *in vitro* (Pierik, 1990).

### **3.2.3.3. Cultivo de meristemas y yemas axilares**

Se inició en los años 60, con el cultivo aséptico de los brotes y meristemas de la orquídea *Cymbidium* sp., que cortados y sembrados correctamente *in vitro*, poseían la capacidad de producir protocormos que originaron en una plántula. Desde entonces, en diversos cultivos, se utiliza éste sistema de propagación a partir de una punta de brote y meristemas, para obtener plantas completas o brotes múltiples. En cualquier caso, se espera la formación de ramas axilares, que puedan ser separadas y enraizadas, teniendo con este sistema una

fuerente permanente de yemas axilares capaces de producir una plántula, de forma rápida y en grandes cantidades (Krikorian, 1991b).

#### **3.2.3.4. Organogénesis**

La organogénesis se basa en el cultivo *in vitro* de explantes o callos, que da como resultado el desarrollo de yemas o de meristemas radicales (Litz, 1991).

##### **3.2.3.4.1. Organogénesis directa**

Es el proceso mediante el cual se puede obtener brotes a partir de un explante, sin antes haber pasado por callos. Se pueden utilizar explantes u órganos que, cuenten con yemas rudimentarias o con la capacidad para producir meristemas; han sido utilizados explantes de pecíolo o de la base foliar, para la propagación de la violeta africana. Otro ejemplo es el uso de explantes foliares para la regeneración de algunas begonias (Litz, 1991).

##### **3.2.3.4.2. Organogénesis indirecta**

Este método fue iniciado en los años 50, se fomenta en la estimulación de la formación de órganos a partir de callos, para esto debe producirse cierta organización celular, se desarrolla mediante el uso de reguladores de crecimiento como auxinas y citocininas. Aunque los resultados de la regeneración pueden ser aleatorios, favoreciendo tanto a la diferenciación de yemas como a la formación de raíces; esto puede controlarse mediante la adición de hormonas al medio de cultivo, específicamente se basa en la relación citocinina:auxina, sin embargo este sistema no es universalmente efectivo (Litz, 1991). Una relación alta de auxina comparada con la citocinina favorece la formación de raíces, mientras una relación baja favorece la formación de yemas (Litz, 1991). La relación

citocinina:auxina, recomendada por Martínez y Tafur (2002) para la obtención de plantas completas de babaco *in vitro*, es 1,125:1.

En estudios realizados por Jordan y Velozo (1997), reportan el cultivo *in vitro* de yemas axilares y hojas, las primeras sembradas en medio MS adicionado con adenina sulfato ( $40\text{mg L}^{-1}$ ), BA ( $2,2\mu\text{M}$ ), AIB ( $0,05\mu\text{M}$ ) y  $\text{GA}_3$  ( $0,29\mu\text{M}$ ) formaron callos no embriogénicos pero iniciaron brotes, además con estos se realizaron suspensiones celulares en medio NN en presencia de ANA ( $2.69\mu\text{M}$ ) y BA ( $4.44\mu\text{M}$ ), que produjeron microcallos que al desarrollar se tornaron oscuros. Las hojas fueron sembradas en medio WPM, los tratamientos fueron suplementados con TDZ en altas concentraciones ( $22,71 - 45,41\mu\text{M}$ ) produjeron pequeños callos verdes, mientras altas concentraciones de 2,4-D (mayor a  $0,45\mu\text{M}$ ) resultaron en la formación de un tejido grande y suave de color oscuro. En 8 semanas formaron callos en presencia de TDZ, en combinación con AIA o AIB más no con 2,4-D. Entonces, para inducir la brotación en el cultivo de yemas axilares, sugiere una relación citocinina:auxina de 365:1, y para enraizamiento una relación 6,5:1; mientras para callogénesis en el cultivo de hojas recomienda una relación mayor a 39:1.

### **3.2.3.5. Embriogénesis somática**

Este método consiste en el desarrollo de embriones a partir de células, que no son producto de fusión gamética, es decir es la producción de un embrión a partir de una célula somática, mismo embrión que tiene la capacidad de crecer y formar plantas completas (Litz, 1991; Muñoz, 2003). Dicho embrión contará con las características básicas que son, tener autonomía frente al tejido generador y ser una estructura bipolar con un eje radial-apical (Muñoz, 2003).

### **3.2.3.6. Cultivo de células aisladas y protoplastos**

El cultivo de células aisladas está basado en el crecimiento de células individuales, provenientes de tejidos, callos o cultivos en suspensión, mediante enzimas o mecánicamente. Los cultivos en suspensión pueden ser permanentes, mientras se mantenga un continuo suministro de nutrientes (Pierik, 1990; Szabados *et al.*, 1991).

El cultivo de protoplastos se obtiene a partir de células vegetales carentes de pared celular, producidos por degradación enzimática. La mayoría de protoplastos son capaces de regenerar la pared celular, dividirse y formar colonias y hasta regenerar plantas completas (Szabados, 1991).

### **3.2.4. Medios de cultivo y componentes**

El medio de cultivo es el sustrato donde se va a colocar al explante seleccionado, tienen diversos componentes generales y específicos que dependen del objetivo que se persiga en el cultivo. El medio de cultivo cumple con dos funciones principales: proporciona soporte físico y todos los nutrientes necesarios para el desarrollo del explante (Cañizares, 1998; González, 2003; Toro, 2004).

El cultivo de tejidos precisa de medios de cultivo relativamente complejos, constituidos por macroelementos, microelementos, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento y gelificante (Roca y Mroginski, 1991b).

Para la propagación de babaco se han formulado algunos medios como el sustrato establecido por Cohen y Cooper (1982) que divide a la micropropagación en cuatro fases, que son introducción, multiplicación, elongación y enraizamiento; cada una de las fases

está constituida por macroelementos del Medio Knop (1965), microelementos y vitaminas del Medio Murashige-Skoog (1962). Existe también el medio formulado por Quoirin y Lepoivre (1977) para babaco, constituido por macronutrientes, microelementos, vitaminas y sacarosa

#### **3.2.4.1. Constituyentes minerales**

El medio de cultivo debe cubrir las necesidades del explante, en forma general éste se encuentra compuesto principalmente por sustancias inorgánicas como: los macronutrientes que los conforman seis elementos mayores nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y Azufre (S), y los micronutrientes que son necesarios para el crecimiento del explante, pues juegan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas; entre estos se encuentran: hierro (Fe), manganeso (Mn), cobalto (Co), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu) y molibdeno (Mo) (Cañizares, 1998; González, 2003).

#### **3.2.4.2. Constituyentes orgánicos**

##### **3.2.4.2.1. Carbohidratos o azúcares**

Un medio se encuentra formado por sustancias orgánicas como los carbohidratos o azúcares, entre los cuales se hallan la glucosa, fructosa, pero principalmente en el cultivo *in vitro* se utiliza la sacarosa, ya que ésta se sintetiza y transporta de forma natural en las plantas, cuya función principal es ser fuente de energía, siendo esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, puesto que en éstas condiciones el tejido verde no es suficientemente autotrófico (Kenneth y Torres, 1989 citados por Cañizares, 1998; Pierik, 1990).

La concentración de azúcar depende del tipo y edad del tejido, el crecimiento y desarrollo aumenta con la concentración de azúcar (Pierik, 1990). Una dosis de sacarosa de 20 a 60g L<sup>-1</sup> se recomienda para un buen desarrollo en cultivo de callos (Kenneth y Torres, 1989 citados por Cañizares, 1998). Para el cultivo de babaco se recomienda la presencia de 3% de sucrosa en el medio (Cohen y Cooper, 1982; Jordan y Velozo, 1997).

#### **3.2.4.2.2. Vitaminas y aminoácidos**

Las vitaminas son necesarias para la preparación del medio de cultivo, ya que favorecen el crecimiento y su ausencia podría ser un factor limitante. Entre las vitaminas utilizadas para el cultivo *in vitro* están: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y myo-inositol. (Kenneth y Torres, 1989 citados por Cañizares, 1998; Krikorian, 1991a; González, 2003). Se utilizan también el ácido cítrico y el ácido ascórbico, pero no como vitaminas sino como antioxidantes; una de las prácticas más comunes para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica, es agregar antioxidantes al medio de cultivo, los que son inhibidores de la polifenoloxidasas o adsorbentes (González, 2003).

Los aminoácidos favorecen la formación de callos, y la mezcla de los mismos parece presentar efectos sinérgicos ya que estimula la proliferación de callos y la organogénesis (González, 2003).

#### **3.2.4.3. Reguladores de crecimiento**

Los reguladores de crecimiento están conformados por hormonas, que son compuestos orgánicos sintetizados por plantas superiores y otros de tipos sintético; ambos tienen una actividad semejante, distribuyen los compuestos que la planta biosintetiza y determinan el crecimiento de los órganos de la planta en concentraciones muy por debajo de otros

compuestos (Pierik, 1990). Los reguladores de crecimiento se han dividido en diversos grupos, como: auxinas, citocininas, giberelinas, otros (Pierik, 1990; Krikorian, 1991a).

#### **3.2.4.3.1. Auxinas**

Las auxinas son compuestos naturales que poseen un núcleo indólico, sintetizadas a partir del aminoácido triptófano o a partir de las triptamina. Entre estas el AIA es la sustancia de mayor uso, a pesar de contar con otras como IBA, ácido fenilacético y ácido 4 cloroindolacético. Además, existen compuestos sintéticos que actúan como auxinas, entre estas las más comunes son el AIB, el ANA y el 2,4-D (Krikorian, 1991a; González, 2003; Marassi, 2004©).

La palabra auxina en griego significa crecer, se la utiliza para designar a las sustancias de elongación celular (Marassi, 2004©). En forma general las auxinas tiene la capacidad de promover el agrandamiento y alargamiento celular, además de la división celular (Krikorian, 1991a). En el cultivo de tejidos sus principales y mayores efectos son formación de raíces y brotes adventicios, embriogénesis, formación y crecimiento de callos, inhibición del desarrollo de yemas axilares y del crecimiento de la raíz (González, 2003).

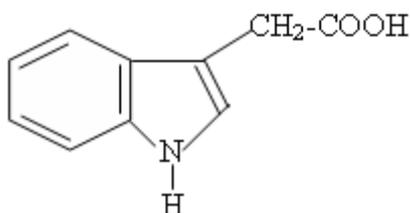
##### **3.2.4.3.1.1.AIA**

El Acido Indol Acético (AIA), fue la primera hormona en ser aislada e identificada en el año 1934, fue denominada auxina natural. Esta es sintetizada en los meristemas y en los tejidos en crecimiento, su movimiento es lento y basípeto (Gargia, 1991; Marassi, 2004©). El AIA actúa al ligarse a un receptor de naturaleza proteica, forma un complejo receptor-hormona que es específico, reversible, saturable y de alta afinidad; éste activa un promotor

que controla la expresión de los genes que codifican la síntesis de las enzimas catalizadores de los compuestos de la pared. Durante la elongación celular, el AIA actúa momentáneamente sobre la bomba de protones ATPasa en la membrana plasmática, con un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas (Marassi, 2004©).

En forma natural sus principales acciones son inducción a partenocarpia en los frutos, incrementa la producción de etileno, incrementa la dominancia apical, favorece la elongación celular, retarda la abscisión, entre otras (Marassi, 2004©). El AIA es ampliamente utilizado en la formulación de medios, pero es sensible a la degradación enzimática y a la fotoxidación (Krikorian, 1991a; Gonzáles, 2003)

A pesar de no poder establecer una concentración particular para su uso, el AIA se utiliza en concentraciones entre 0,001 a 10mg L<sup>-1</sup>, siendo la óptima alrededor de 0,1 -1 ppm (Krikorian, 1991a).



**Figura 3.2.4.3.1.1. Molécula de AIA**

#### **3.2.4.3.1.2.AIB**

El Acido Indol Butírico forma parte tanto de las auxinas naturales como de las sintéticas (Marassi, 2004©), sus principales acciones son inducción al enraizamiento y la brotación (Gargia, 1991).

Piagnani *et al.* (1996) citado en Toro (2004), reporta el uso de AIB en una concentración de 100 ppm, junto con 2,4-D y ANA sin obtener buenos resultados. Kumar *et al.* (1998), indica que una concentración de  $2\text{mg L}^{-1}$  de AIB en el medio, para regeneración de plantas *in vitro*, resulta exitosa en conjunto con carbón activado.

#### **3.2.4.3.1.3.ANA**

El Acido Naftalenacético es una de las principales auxinas sintéticas, utilizado principalmente para inducción de enraizamiento, incremento de la precocidad en las fases de floración y fructificación, y previene la brotación de yemas en la papa (Gargia, 1991; García, 2004). Krikorian (1991a), reporta el uso de ANA en concentraciones entre  $1\text{-}10\text{mg L}^{-1}$ , siendo su punto óptimo  $2\text{mg L}^{-1}$ .

#### **3.2.4.3.1.4. 2,4 – D**

El Acido 2,4 Diclorofenoxiacético forma parte de las auxinas sintéticas, en el cultivo de tejidos es utilizado principalmente para inducir la brotación, a pesar de ser de uso limitado puesto que puede inducir mutaciones, además puede inhibir la fotosíntesis (Pierik, 1990). Las concentraciones utilizadas varían entre  $0,1\text{-}10\text{mg L}^{-1}$ , hallándose su punto óptimo entre  $1\text{-}5\text{mg L}^{-1}$  (Krikorian, 1991a).

#### **3.2.4.3.2. Citocininas**

El nombre citocininas fue adoptado en el año 1956, para designar a las sustancias de división celular (citocinesis) (Gargia, 1991; Krikorian, 1991a; Marassi, 2004©).

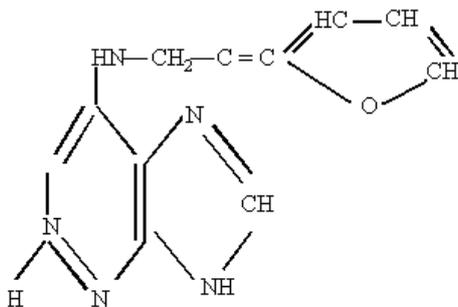
La citocininas son hormonas naturales derivadas de adeninas sustituidas, producidas en los órganos en crecimiento y en el tejido meristemático radicular. Su traslado es mínimo, se

encuentran en el xilema (cuando son sintetizadas en la raíz) y en el floema; cuando se encuentra en las hojas están inmóviles (Marassi, 2004©). Existen también citocininas no purínicas como los son el thidiazuron (TDZ) y el CPPU (N-(2-cloro-4-piridil)-N-fenil urea), que tienen una actividad histoquímica muy fuerte (González, 2003).

Entre las principales citocininas se encuentran el BAP, IPA, Zeatina y Kinetina. Estas hormonas están involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, específicamente en la síntesis de ADN, de aquí su acción en la división celular y organogénesis; además promueven la germinación, la formación y crecimiento de callo, el desarrollo de yemas laterales, retardan la senescencia, inhiben el desarrollo de raíces adventicias, en presencia de auxinas promueven la división y elongación celular (Gargia, 1991; Marassi, 2004©).

#### 3.2.4.3.2.1. KIN (6-furfunil aminopurina)

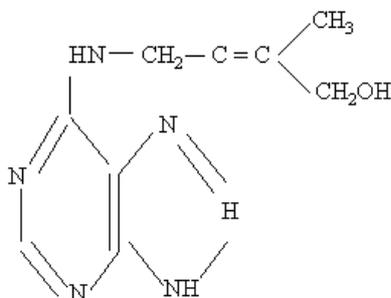
La kinetina es una hormona natural, fue aislada en 1955, ha llamado mucho la atención por promover la división celular. No se ha podido encontrar como un compuesto natural, pero se ha logrado aislar sustancias relacionadas a partir de preparaciones de ADN. La KIN se usa en concentraciones de 0,1 a 2mg L<sup>-1</sup>, en conjunto con AIA y 6-anilinpurina (Krikorian, 1991a).



**Figura 3.2.4.3.2.1. Molécula de KIN**

### 3.2.4.3.2.2. ZEA

La zeatina es considerada el prototipo de las adenilcitosininas, se produce naturalmente, ésta es hasta diez veces más potente que la KIN. La zeatina se utiliza generalmente en concentraciones similares a la kinetina, aunque por ser bastante activa se encuentra un rango más bajo (Krikorian, 1991a; Marassi, 2004©).

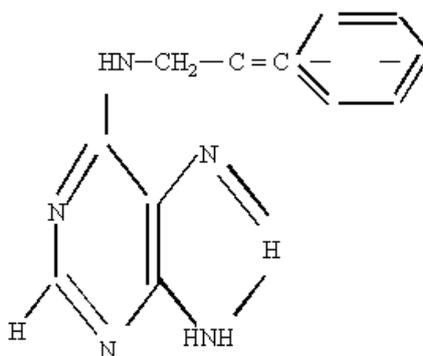


**Figura 3.2.4.3.2.2. Molécula de ZEA**

### 3.2.4.3.2.3. BAP o BA

La N-6- bencil aminopurina (BAP) o N6-benciladenina (BA), es una hormona sintética aunque recientemente ha sido aislada de forma natural; actualmente es utilizada con mayor frecuencia que la KIN o la ZEA, por su alta actividad y bajo costo (González, 2003; Marassi, 2004©).

Cohen y Cooper (1982) reporta el uso de BAP en la formulación del medio para babaco, con concentraciones que varían entre 0,1 – 1 ppm, según la fase, utilizando la dosis más alta para la fase de multiplicación, y la dosis más baja para las fases de introducción y elongación, mientras para enraizamiento no recomienda el uso de citocininas.



**Figura 3.2.4.3.2.3. Molécula de BAP**

#### **3.2.4.3.2.4. Adenina sulfato**

La adenina sulfato fue usada por primera vez para el crecimiento de explantes de tabaco, para la estimulación de formación de vástagos adventicios. Esta se ha utilizado en concentraciones que varían entre 2 – 120mg L<sup>-1</sup> (Pierik, 1990).

Cohen y Cooper (1982) formula el medio para tabaco con adenina sulfato, usando 40 ppm en la fase de introducción y 80 ppm para las fases de multiplicación y elongación, para enraizamiento no recomienda el uso adenina sulfato.

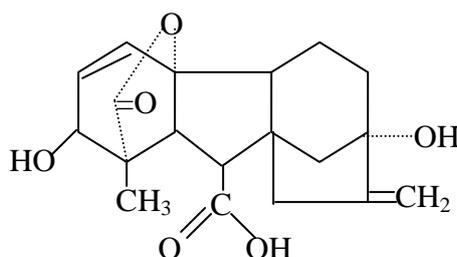
#### **3.2.4.3.3. Giberelinas**

Las giberelinas fueron aisladas a partir del extracto del hongo *Gibberella fujikutoi*, de éste su nombre. Son poco utilizadas en el cultivo de tejidos, debido a su efecto inhibitorio y por ser termolábiles, es decir que pierden cerca del 90% de su actividad biológica después del autoclavado (Pierik, 1990; Krikorian, 1991a; González, 2003; Marassi, 2004©). Al momento existen más de 150 formas conocidas de esta hormona, siendo la más usada la GA<sub>3</sub> (Marassi, 2004©).

Las giberelinas son diprtenos con  $C_{20}$  ó  $C_{19}$ , derivadas de la vía isoprenoide, cuya estructura básica es el esqueleto giberelano (González, 2003). Se trasladan a través del floema y del xilema (Marassi, 2004©).

Los principales efectos de las giberelinas son división y elongación celular, es decir que actúa como un acelerador de crecimiento. Además, actúa sobre la ruptura de la dormancia, induce a la floración e inhibe la formación de raíces adventicias (Pierik, 1990; Gargia, 1991; Krikorian, 1991a; González, 2003; Marassi 2004©).

Krikorian (1991a), reporta el uso de giberelinas en cultivo *in vitro* en una concentración que varía entre  $0,01-1\text{mg L}^{-1}$ , con un punto óptimo de  $0,1\text{mg L}^{-1}$ . Además, indican que en combinación GA con AIA (25:1) estimula la formación de callos.



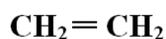
**Figura 3.2.4.3.3. Molécula de GA<sub>3</sub>**

#### **3.2.4.3.4. Otros**

##### **3.2.4.3.4.1. Etileno**

El etileno es un hidrocarburo derivado de la metionina, producido por todas las partes vivas de las plantas superiores, su tasa varía según el órgano, tejido y estado fisiológico (Marassi, 2004©).

Es una hormona gaseosa que se sabe se produce en el cultivo de tejidos (Pierik, 1990). Actúa principalmente favoreciendo la senescencia de las hojas, la maduración de los frutos, promueve o inhibe la formación de callos, inhibe la embriogénesis somática, induce las raíces y puede producir hipertrofias (González, 2003; Marassi, 2004©).

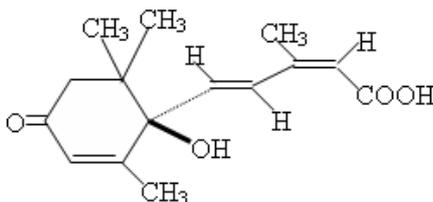


**Figura 3.2.4.3.4.1. Molécula de Etileno**

#### 3.2.4.3.4.2.ABA

El Acido abscísico es considerado como un inhibidor, generalmente produce efectos negativos en el cultivo *in vitro* (Pierik, 1990).

González (2003), reporta sus principales efectos en el cultivo de tejidos; así, actúa sobre la maduración de embriones somáticos, facilita aclimatación, formación de bulbos, promueve la dormancia.



**Figura 3.2.4.3.4.2. Molécula de ABA**

#### 3.2.4.4. Gelificantes

El medio de cultivo puede ser líquido, sólido o semi-sólido, según el contenido del soporte, para solidificar y mantener el tejido en la superficie, el agar es la sustancia más utilizada en el cultivo *in vitro* (González, 2003).

Generalmente se utiliza el agar en concentraciones de 0,6 a 0,8 %, es decir, 6-8 g L<sup>-1</sup>. Concentraciones menores a 0,4% y con un pH bajo no cuajan, mientras concentraciones muy altas, mayores a 1%, dificulta a los explantes establecer contacto con el medio (Pierik, 1990). Además, altas concentraciones de agar pueden afectar negativamente el crecimiento *in vitro* (Stolz, 1967 citado por Pierik, 1990).

### **3.2.4.5. Otros**

#### **3.2.4.5.1. Caseína hidrolizada**

La caseína hidrolizada se utiliza en el cultivo *in vitro*, como suplemento para las plantas, con el fin de aumentar el crecimiento mediante el suministro de una fuente de nitrógeno reducido. A pesar del desconocimiento de la importancia como promotoras de crecimiento, de algunas de las sustancias presentes en su composición, aporta al suministro de nitrógeno disponible total. Además, puede contener concentraciones bajas de algunos aminoácidos (metionina, triptófano y fenilalanina) (Krikorian, 1991a).

Se recomienda una adición al medio de 200mg L<sup>-1</sup> (Krikorian, 1991a). Cohen y Cooper (1982), sugieren la adición de 500mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada para el cultivo de babaco *in vitro*.

### **3.2.5. Etapas de la propagación *in vitro***

Murashige (1974) citado en Krikorian (1991a), señala cinco etapas para la multiplicación de plantas mediante el cultivo de tejidos.

### 3.2.5.1. Etapa 0

Comprende la selección de la planta madre y acondicionamiento de la misma para iniciar los cultivos *in vitro*. Al partir de una planta con características superiores al promedio, las plantas regeneradas tendrán características superiores también, por tanto tendrán mayor valor (Murashige, 1974 citado en Krikorian, 1991b).

Para adaptar a la planta madre o donante, se puede establecer su cultivo en invernaderos con luz adicional, para que se acostumbren al crecimiento continuo; esto facilita la adaptación de los explantes al cultivo *in vitro* (Ellena, 1998 citado por Toro, 2004).

### 3.2.5.2. Etapa I

Es la etapa inicial en la cual se establece el cultivo inicial, es una etapa crucial, se selecciona el explante y se establece un pretratamiento de desinfección, puesto que los explantes obtenidos de plantas adultas pueden estar contaminados con hongos o bacterias. El medio utilizado en esta fase generalmente no contiene hormonas (Murashige, 1974 citado en Krikorian, 1991b).

#### 3.2.5.2.1. Selección del explante

La elección del explante se basa principalmente, en el objetivo que se persigue y la especie utilizada (Roca y Mroginski, 1991b). Así la elección del explante puede verse influenciada por:

**Genotipo:** la capacidad para regenerarse y de división celular es muy variada dentro de una misma especie. Las dicotiledónea tienen mayor capacidad de regeneración que las

monocotiledóneas. Una planta que se regenera fácilmente *in vivo*, se espera regenere de igual manera *in vitro* (Pierik, 1990).

**Edad de la planta:** la capacidad de regeneración de un explante es inversamente proporcional a la edad del cultivo, es por ello que se tiende a utilizar material juvenil, embriones y semillas para regeneración *in vitro* (Pierik, 1990).

**Edad del órgano o tejido:** se prefieren los tejidos jóvenes, no lignificados; a pesar de existir algunas excepciones. Independientemente de la edad, la capacidad regenerativa incrementa durante la floración (Pierik, 1990).

**Estado fisiológico:** se ha demostrado que los explantes en estado vegetativo tienen mayor capacidad de regeneración *in vitro*, que los explantes en estado generativo. Las yemas en estado de reposo presentan mayor dificultad para regenerar *in vitro* (Pierik, 1990). El potencial organogénico del explante es inverso a su edad fisiológica (Roca y Mroginski, 1991b).

**Estado sanitario:** es importante seleccionar explantes sanos, pues esto repercute en el éxito del cultivo y en la contaminación del mismo (Pierik, 1990).

**Topósis:** se refiere a la ubicación del explante dentro de la planta, se recomienda el uso de vástagos cercanos a la base y meristemas apicales (Pierik, 1990).

**Tamaño del explante:** mientras mayor es el tamaño del explante es más fácil su regeneración, puesto que tienen sus propias reservas y hormonas (Pierik, 1990). Los

explantes pequeños son más fáciles de desinfectar, pero su viabilidad tiende a ser baja además se dañan fácilmente (Roca y Mroginski, 1991b).

#### **3.2.5.2.2. Protocolo de desinfección**

El principal objetivo es evitar la contaminación en el cultivo de tejidos, para el éxito de éste. Este proceso debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible, mediante la desinfección superficial. No existe un protocolo general para la desinfección, pero para esto se debe tener en cuenta la especie y el tipo de explante (Roca y Mroginski, 1991b).

Pierik (1990), sugiere para este propósito utilizar algunas sustancias químicas. Etanol (alcohol) al 70% para material vegetal, se debe sumergir durante unos segundos, aunque esto no es suficiente para matar todos los microorganismos. Hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ), se puede utilizar concentraciones entre 1 – 3%, durante algunos minutos que varían según la concentración (a mayor concentración menos tiempo de inmersión). Hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ), se utiliza en una concentración de 35 – 100 g L<sup>-1</sup>, durante 5 – 30 minutos, éste penetra en el tejido más lentamente que el hipoclorito de sodio.

Cloruro mercuríco ( $\text{HgCl}_2$ ), es altamente tóxico para plantas y animales, se utiliza en concentraciones de 0,01 – 0,05% durante 2 – 12 minutos. Tween 20 u 80, es un líquido esterilizante que se utiliza en concentraciones entre 0,08 – 0,12%, éste disminuye la tensión superficial incrementando el contacto superficial. En el proceso de asepsia del explante, se puede utilizar agua oxigenada o peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en una concentración entre 10 – 12%, siendo éste más fácil de eliminar y cuya eficiencia depende del tipo de tejido (Barrueto y Jordan, 2006).

Otra vía como tratamiento de desinfección de los explantes, es el uso de agua caliente (baño maría), con una temperatura entre 42-45°C, durante 1-2 horas. El tiempo de permanencia en el agua caliente, depende del tipo de tejido para no causar daño (Barrueto y Jordan, 2006).

En el cultivo *in vitro*, para el control de contaminación bacteriana se adiciona antibióticos al medio de cultivo, la dosis de éstos puede variar entre 100-500mg L<sup>-1</sup>, en el caso de la estreptomicina se utiliza en rangos de 50-400mg L<sup>-1</sup>; mientras para la contaminación fúngica Benlate (Benomil) ofrece un buen control (Barrueto y Jordan, 2006). Ramírez y Salazar (1997), recomiendan para el control de contaminación de cultivos *in vitro*, la adición al medio de sulfato de gentamicina (250mg L<sup>-1</sup>) y Benomil (250g L<sup>-1</sup>), y el tratamiento de los explantes en una solución antioxidante de ácido cítrico (75mg L<sup>-1</sup>), y ácido ascórbico (50mg L<sup>-1</sup>) más sulfato de gentamicina (250mg L<sup>-1</sup>) durante 15 minutos. Enríquez *et al.* (1997) reporta la adición de nitrato de plata al medio (1mg L<sup>-1</sup>), como un bactericida eficaz, sobretodo para control de bacterias gram-negativas, además favorece al incremento de número de brotes por explante.

Los compuestos amonio cuaternario, representan una familia de compuestos antimicrobianos, son agentes activos catiónicos, potentes en su acción desinfectante para eliminar bacterias. Son antisépticos, bactericidas, fungicidas y virucidas. El cloruro de benzilaconio también conocido como cloruro de N-Alquil dimetil bencil amonio, en las concentraciones recomendadas no son tóxicos, soluciones al 0,1% son más eficaces que el alcohol etílico al 60%. Su modo de acción es afectar el metabolismo de las células y en

particular descomponen el mecanismo de transporte activo de nitrógeno y de fósforo a través de las membranas (Salager y Fernández, 2004).

Cañizares (1998) recomienda para babaco el siguiente protocolo de desinfección: primero lavar los explantes con jabón líquido y enjuagar tres veces con agua destilada, desinfectar con yodo (10 gotas) durante 10 minutos y lavar en agua destilada. Posteriormente suspender los explantes en una solución de Benlate ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ) durante 10 minutos, aclarar en agua destilada tres veces. En la cámara de flujo laminar encendida desinfectar con hipoclorito de sodio al 18%, por 15 minutos y finalmente enjuagar cuatro veces con agua destilada estéril.

Roque (s.f.), recomienda como protocolo de desinfección para papaya, seleccionar los explantes, eliminar hojas, lavar con agua y detergente, cepillar, lavar con agua destilada, agitar durante 1 minuto en alcohol al 70%, enjuague con agua destilada estéril, mantener 24 horas en NaOCl 0,1% + 4 gotas de TWEEN 80, baño con agua destilada estéril, 30 minutos NaOCl 0,01% + 4 gotas de TWEEN 80, en cámara de flujo durante los últimos 15 minutos, enjuagar con agua destilada estéril, inmersión en sulfato de gentamicina por 4 horas, finalmente tres enjuagues con agua destilada estéril e introducir al medio de cultivo.

López *et al.* (2002) reportan como germicidas alternativos, el uso de extracto de semilla de toronja (400 ppm), ácido peracético (2000 ppm) y ácido láctico (2000 ppm); siendo las bacterias Gram positivas las más sensibles a dichos productos. Entre estos productos alternativos, se debe mencionar el uso de la manzanilla, que es considerada como una planta medicinal, dentro de sus componentes están azuleno, alfa bisabolol, ácido cafeico, ácido tánico, ácido clorogénico, umbelliferona, apigenina, herniarina, luteolina, ligeras

cantidades de carotenos, vitamina C y alcohol sesquiterpénico; entre estos componentes se conoce que al alfa bisabolol se le atribuye una acción antiséptica y antifúngica. Además, se conoce reportes que el extracto de la flor de manzanilla *in vitro* produce una acción sobre el *Streptococcus mutans*, Pseudomona, Klebsiellas y Candidas, y el ácido cafeico según otro estudio *in vitro* posee acción contra el *Streptococcus mutans* (Gispert *et al.*, 1998).

### **3.2.5.3. Etapa II**

Esta es la fase de multiplicación simplemente o multiplicación de brotes y callos (Murashige, 1974 citado en Krikorian, 1991b). Para la multiplicación *in vitro* existen tres vías: organogénesis, embriogénesis y la multiplicación por yemas, ápices o meristemas. En esta etapa se emplean medios con reguladores de crecimiento: como las citocininas y auxinas (Krikorian, 1991b). La fase de elongación se ve incluida en esta etapa (elongación de brotes), es de gran importancia puesto que prepara a las yemas para el enraizamiento, su duración es de 10-15 días, su medio tiene alto contenido de citocininas (Ellena, 1998 citado por Toro, 2004).

### **3.2.5.4. Etapa III**

Es la fase de enraizamiento o de pretransplante, es la fase en la que se pretende que la planta sea autotrófica, para que sea capaz de adaptarse al medio externo (Murashige, 1974 citado en Krikorian, 1991b). Para la fase enraizamiento se requiere un medio adicionado auxinas, ANA y AIB son más efectivos en rizogénesis que AIA, además requiere una fuente de carbohidratos, como lo es la sacarosa (Hartmann y Kester, 1997 citados por Henríquez, 2004).

### **3.2.5.5. Etapa IV**

Es la etapa de adaptación de la vitroplanta al medio externo, es decir la fase de transferencia final (Murashige, 1974 citado en Krikorian, 1991b). Esta fase es importante, ya que una planta regenerada *in vitro*, difiere en varios aspectos de una planta origina *in vivo*, por lo tanto su adaptación al medio externo es complicada. La vitroplanta debido a la alta humedad relativa (90-100%), posee una cutícula poco desarrollada y su sistema de cierre de estomas está atrofiado. Además no realizan un proceso de fotosíntesis normal, ya que su fuente de carbono esta dispuesta en el medio, tienen hojas delgadas y con menor contenido de clorofila; por lo tanto es necesario activar paulatinamente su autotrofia para su adaptación al medio externo. El mecanismo de defensa de estas plantas no está activado, ya que se desarrollan en un medio estéril, por lo que resulta importante trabajar en condiciones asépticas, para obtener una alta tasa de sobrevivencia al cambiar las plantas *in vitro* a suelo (Pierik, 1990).

### **3.2.6. Factores físicos**

El crecimiento de los tejidos en el cultivo *in vitro* durante la incubación puede verse afectada por factores físicos, como: luz, temperatura, humedad relativa, pH, entre otros (Pierik, 1990; Toro, 2004).

#### **3.2.6.1. Luz**

La iluminación en el cuarto de crecimiento es suministrada mediante tubos fluorescentes, tipo blanco frío (Margara, 1988 citado por Toro, 2004; Pierik, 1990).

Krikorian (1991b), recomienda se utilice una fuente luminosa compuesta por lámparas fluorescentes y lámparas incandescentes que provean entre 100 y 4000 lux de iluminación.

Se ha demostrado al añadir AIA al medio, que las luces verde y roja son más efectivas que la luz azul, puesto que la última descompone a esta auxina, a pesar de no suceder lo mismo con el ANA. Además, la luz roja favorece a la formación de raíces adventicias mientras la luz blanca inhibe este proceso, pero la luz blanca promueve la formación de vástagos adventicios (Pierik, 1990).

En el cultivo *in vitro* las irradiancias altas son dañinas ( $30-70 \text{ W m}^{-2}$ ), aunque para especies leñosas, una irradiancia mayor a la aconsejada ( $8-15 \text{ W m}^{-2}$ ) resulta ser más ventajosa (Pierik, 1990).

### **3.2.6.2. Temperatura**

La temperatura óptima del cuarto o cámara de crecimiento se encuentra entre  $20-28^{\circ}\text{C}$ . Una buena incubación o crecimiento *in vitro* del cultivo, debe proporcionar un buen control de temperatura, esto se puede lograr mediante un sistema de aire acondicionado, alarmas y controles. Las fluctuaciones entre temperaturas del día y la noche pueden estimular la organogénesis, también los tratamientos con temperaturas bajas (Roca y Mroginski, 1991a).

### **3.2.6.3. Humedad relativa**

Los cultivos se incuban en un cuarto apropiado o cámaras de crecimiento, éstos pueden ser eficientes en el control ambiental, la humedad relativa en éstos debe encontrarse entre 70-80%, una humedad menor puede provocar la desecación del medio (Seemann y Barriga, 1993 citados por Toro, 2004). Aunque una alta humedad puede favorecer a las infecciones (Pierik, 1991).

#### **3.2.6.4. pH**

En el cultivo *in vitro* se recomienda un pH entre 5,0 y 6,5, apto para el crecimiento, que se ha visto frenado a un pH menor de 4,5 y mayor de 7,0 (Pierik, 1990). Roca y Mroginski (1991a) recomiendan se ajuste el pH del medio a 5,5, 5,8 ó 6,3.

Un pH ácido, puede afectar en la estabilidad de algunos reguladores de crecimiento como AIA y ácido giberélico, la estabilidad de vitaminas como B1 y ácido pantoténico, facilita la precipitación de sales de fosfato o hierro, licuación del medio y retarda la absorción de iones amonio (Butenko, 1968 citado por Roca y Mroginski, 1991a; Quak, 1977 citado en Toro, 2004).

#### **3.2.6.5. Otros**

##### **3.2.6.5.1. CO<sub>2</sub>**

El suministro de dióxido de carbono en el cultivo de tejidos es de poca importancia, puesto que la concentración de este gas *in vitro* es elevada, además la fotosíntesis es baja debido a la poca irradiancia, por lo tanto no es necesario su adición; aunque éste puede ser utilizado como fuente de carbono, la sucrosa es un mejor material (Pierik, 1990).

##### **3.2.6.5.2. Oxígeno**

El oxígeno es un elemento importante en el crecimiento *in vitro*. La aireación se puede ver beneficiada por el uso solo de tapas metálicas y no tapones de algodón, también la favorece el uso de medios líquidos, la inoculación sobre puentes de papel o la inoculación apolar del explante, es decir al inocular el explante invertido con la parte apical sobre el medio, esto mejora el enraizamiento (Pierik, 1990).

### **3.2.6.5.3. Subcultivos**

Los subcultivos se refieren al repique o cambio a un nuevo medio. Roca y Mroginski (1991a), reportan incubaciones de hasta 30 días. Según De Paoli *et al.* (1994) citados en Toro (2004), el explante debe cambiarse entre los 14-16 días de incubación, hasta un máximo de 20 días.

### **3.2.6.5.4. Corriente eléctrica**

Pierik (1990), reporta incremento en el crecimiento del callo, de hasta un 70%, con el uso de corriente eléctrica; aplicada entre el tejido y el medio de cultivo, en el orden de  $1\mu\text{A}$ .

## **3.2.7. Factores limitantes**

### **3.2.7.1. Fenolización**

Durante el cultivo *in vitro*, algunas plantas al sufrir heridas producen exudados de color marrón o negro, como producto de la liberación y oxidación de polifenoles y taninos, que resultan en compuestos quinónicos que son tóxicos y frecuentemente afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, pudiendo ocasionar la muerte del explante (Pierik, 1990; Seeman y Barriga, 1993 citados por Toro, 2004).

La fenolización u oxidación, es el pardeamiento de los tejidos, más común en especies leñosas, se debe a diversos factores como la luz, la especie, la concentración de amonio en el medio, entre otros (Margara, 1986 y Seeman y Barriga, 1993 citados por Toro, 2004). Entre los controles de la oxidación, se encuentran los subcultivos y eliminación de tejidos senescentes de la base de los brotes (Angarita y Perea, 1991), adicción al medio de carbono activado (0,2-0,3%), PVP (250-1000ppm), antioxidantes (ácido cítrico, ácido ascórbico, tiourea o L-cistina), dietil-tiocarbamato ( $2\text{g L}^{-1}$ ) o aminoácidos (glutamina, arginina y

asparagina); también es útil el uso de medios líquidos, el mantener los vástagos en la oscuridad, la reducción del tejido herido, el reducir la concentración de sales y el uso de reguladores, y lavar los explantes antes introducir (Pierik, 1990).

### **3.2.7.2. Contaminación**

Existen cuatro fuentes de contaminación, el explante, el medio, el aire y el operador; la más importante es el material vegetal (Pierik, 1990).

La contaminación puede presentarse por un inadecuado protocolo de desinfección, cuando es una contaminación exógena y, al ser una contaminación endógena cuando se trata de contaminantes sistémicos (Seeman y Barriga, 1993 citados por Toro, 2004).

#### **3.2.7.2.1. Contaminación exógena**

Este tipo de contaminación externa puede verse eliminada mediante un correcto protocolo de desinfección y esterilización del material vegetal, con el uso de desinfectantes (yodo), fungicidas, bactericidas u otros productos químicos (Pierik, 1990; Barrueto y Jordan, 2006).

#### **3.2.7.2.2. Contaminación endógena**

Esta se produce cuando la infección está en los tejidos internos de la planta, generalmente se presenta cuando los tejidos internos contaminados se ponen en contacto con el medio, son difícilmente eliminados por esterilización externa. El crecimiento pobre y la clorosis, pueden ser indicadores de infección interna, como sucede con bacterias como *Erwinia carotovora*; aunque frecuentemente se debe a bacilos como *Bacillus lincheiformis* o

*Bacillus subtilis* (Pierik, 1990). Además de las ya mencionadas, se pueden adicionar como agentes contaminantes las especies *Pseudomonas* y *Xantomonas* (Barrueto y Jordan, 2006). Para controlar la contaminación endógena existen principalmente tres opciones, el cultivo de meristemos, el uso de antibióticos en el medio y el uso de plantas sanas, siendo el último el más efectivo. El cultivo de meristemas es muy complicado y el uso de antibióticos no es muy efectivo, puesto que éstos pueden inhibir el crecimiento y desarrollo de la planta (Pierik, 1990; Barrueto y Jordan, 2006).

La termoterapia ha sido útil en la contaminación por el virus (PVX) en papa y ornamentales, al exponer a los explantes a una temperatura de 35°C durante 6-8 semanas (Barrueto y Jordan, 2006).

### **3.2.7.3. Vitrificación**

La vitrificación es la alteración de características físicas, anatómicas y fisiológicas, que se producen tanto en plantas herbáceas como leñosas, se describe como cambios en las hojas, tallo y raíces que presentan una apariencia cristalina, acuosa, húmeda y traslúcida; principalmente afecta a las hojas en sus dos funciones principales (fotosíntesis e intercambio de gases). Esta puede deberse a factores nutricionales, elevadas dosis de reguladores baja intensidad luminosa y humedad relativa, y alteraciones en las rutas metabólicas. Como solución a este problema se ha propuesto el control de las condiciones físico-ambientales, como por ejemplo incrementar la concentración de agar, incrementar el gradiente de vapor de agua, eliminar las fuentes externas de carbono, regular los niveles de citocininas, aumentar la intensidad luminosa, entre otros (Seeman y Barriga, 1993 citados por Toro, 2004; López, 1996).

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA.

El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Control Biológico de la Carrera de Ciencias Agropecuarias - IASA, de la Escuela Politécnica del Ejército ESPE, ubicada en Ecuador, Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando, en la Hacienda “El Prado”, a 78°24'44'' (O) y 0°23'20'' (S), a una altitud de 2748 m.s.n.m. En el laboratorio bajo condiciones controladas, en un cuarto de crecimiento con una temperatura entre 20 – 25° C y humedad relativa entre 43 y 60%.

### 4.2. MATERIALES.

El equipo y los materiales de laboratorio utilizados en el desarrollo del proyecto fueron los siguientes: cámara de flujo laminar, cuarto de crecimiento, autoclave, estufa, balanza analítica, refrigerador, microondas, agitador, pHmetro, destilador de agua, baño maría, estereomicroscopio, micropipetas, tubos de ensayo, cajas petri, frascos de vidrio, botellas, vasos de precipitación, goteros, probetas, bandejas, portatubos, pinzas, tijeras, mangos de bisturí, asa de platino, atomizador y mechero.

Los medios y reactivos utilizados para el cultivo de babaco fueron medio de Cohen y Cooper (Anexo 1), medio de Quoirin y Lepoivre, yodo, Benomil (Benlate), hipoclorito de sodio, hipoclorito de mercurio, peróxido de hidrógeno + ácido acético (Bioper), hidróxido de sodio, ácido nicotínico, piridoxina, tiamina, glicina, sucrosa, agar, caseína hidrolizada, adenina sulfato, BA (Benzil adenina), IBA (Acido indol butírico), ANA (Acido-naftalenacético), AIA (Acido indol acético), 2,4 – D, oxitetraciclina, Sulfato de gentamicina y clorhidrato de oxitetraciclina (Agry-gent). El medio utilizado para el cultivo

de bacterias fue agar nutritivo y PCA, los reactivos utilizados para realizar tinción Gram convencional, Gram KOH, prueba de oxidasa (Anexo 2) y Test API (Anexo 2.1-2.2).

Los insumos utilizados durante el desarrollo del proyecto fueron los siguientes: estacas de babaco (longitud mínima de 5cm y máxima de 13cm, y un diámetro mínimo de 0,3cm y máximo de 1cm), tijera podadora, guantes de caucho, papel celofán, papel aluminio, parafilm, papel toalla, plástico, mascarillas, fertilizantes, funguicidas, cinta masking, etiquetas, cubetas, jeringuillas, ligas elásticas, bisturís, regla, marcadores, jabón antibacterial líquido, alcohol antiséptico, alcohol potable y agua destilada estéril (ADE) .

#### **4.3. METODOLOGÍA.**

##### **4.3.1. Determinación del protocolo de desinfección más adecuado para la introducción de explantes de babaco *in vitro***

El material vegetativo para la introducción se obtuvo de un invernadero de babaco de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, IASA I.

Las fases de micropropagación del babaco para ésta investigación fueron: introducción, y multiplicación, mismas que se desarrollaron en el medio descrito por Cohen y Cooper (1982), por otro lado, la fase de enraizamiento se probó en los medios Quoirin y Leproive (1977), y Cohen y Cooper (1982) según lo recomendado por Cossio (1987).

El medio formulado por Cohen y Cooper (1982), fue el mismo para las cuatro fases, únicamente variando concentraciones de citocininas y auxinas. La composición de éste medio estuvo dado por los macroelementos de Knop (medio Knop, 1965), microelementos

y vitaminas MS (medio Murashige-Skoog, 1962), y suplementado con caseína hidrolizada, sulfato de adenina, BAP, AIB y sacarosa (Anexo 1).

Los explantes seleccionados fueron cultivados en el medio de introducción donde permanecieron 15 días; posteriormente se cambiaron los explantes, al medio de multiplicación.

#### **4.3.1.1. Fase de introducción**

##### **4.3.1.1.1. Elección de los explantes**

Los explantes fueron tomados de la base de plantas de babaco, en la fase de producción de brotes. Los brotes seleccionados tuvieron una longitud mínima de 5cm y máxima de 13cm, con un diámetro mínimo de 0,3cm y máximo de 1,0cm. El número de yemas varió entre 1 y 13.

##### **4.3.1.1.2. Desinfección de los explantes**

En los explantes seleccionados se probaron diferentes protocolos de desinfección. Los tratamientos consistieron en la interacción de los diferentes productos comerciales, diferentes dosis y tiempos de exposición (Cuadro 4.3.1.1.2.1).

Las variables evaluadas durante la fase de introducción, fueron: el porcentaje de contaminación de bacterias, porcentaje de contaminación de hongos y porcentaje de mortalidad. Las evaluaciones se realizaron cada 5 días por 3 ocasiones.

**Cuadro 4.3.1.1.2.1. Protocolos de desinfección para la introducción de los explantes de babaco, IASA 1, Ecuador, 2007**

Nº tratamiento	Descripción	Número de explantes por tratamiento <sup>a</sup>
T <sub>1</sub>	Explantes lavados con jabón líquido durante 10 min, desinfectados durante 15 min en yodo (10 gotas L <sup>-1</sup> ), sumergidos en una solución con Benlate (1g L <sup>-1</sup> ) durante 20 min y lavados en ADE. En cámara de flujo laminar, desinfectados en hipoclorito de sodio al 20% durante 1min y finalmente lavados en ADE	196
T <sub>2</sub>	Explantes refrigerados durante 24h, posteriormente sumergidos en una solución de ácido cítrico a 1000ppm durante 1h + T <sub>1</sub>	47
T <sub>3</sub>	Explantes refrigerados durante 48h + T <sub>1</sub> + sumergidos en alcohol al 70% durante 10s, lavados en ADE.	55
T <sub>4</sub>	Explantes sumergidos en extracto concentrado de manzanilla durante 1min y en hipoclorito de sodio al 20% durante 1min, finalmente lavados en ADE.	67
T <sub>5</sub>	T <sub>1</sub> + adición al medio de cloruro de alquil dimetil bencil amonio 50% (BIOCID DGN)	56
T <sub>6</sub>	Baño maría: exposición de los explantes al calor durante 1h (temperatura de 45°C ± 0,3°C).	2
T <sub>7</sub>	Baño maría: exposición de los explantes al calor durante 1h (temperatura de 45°C ± 0,3°C) + T <sub>1</sub>	4
T <sub>8</sub>	Baño maría: exposición de los explantes al calor durante 1h y 30min (temperatura de 45°C ± 0,3°C).	2
T <sub>9</sub>	Baño maría: exposición de los explantes al calor durante 1h y 30min (temperatura de 45°C ± 0,3°C) + T <sub>1</sub>	4
T <sub>10</sub>	Baño maría: exposición de los explantes al calor durante 2h (temperatura de 45°C ± 0,3°C).	4
T <sub>11</sub>	Baño maría: exposición de los explantes al calor durante 2h (temperatura de 45°C ± 0,3°C) + T <sub>1</sub>	4
T <sub>12</sub>	T <sub>1</sub> + desinfectados en una solución con peroxido de hidrogeno + ácido acético (Bioper) (1ml L <sup>-1</sup> ) durante 1h y lavados en ADE.	152
T <sub>13</sub>	T <sub>12</sub> + desinfectados en hipoclorito de mercurio al 0,8% durante 3min y lavados en ADE.	75
T <sub>14</sub>	T <sub>12</sub> + ácido acético (1ml L <sup>-1</sup> ) durante 1h y lavados en ADE	30
T <sub>15</sub>	T <sub>12</sub> + ácido acético (2ml L <sup>-1</sup> ) durante 1h y lavados en ADE	31
T <sub>16</sub>	T <sub>12</sub> + ácido acético (3ml L <sup>-1</sup> ) durante 1h y lavados en ADE	33
T <sub>17</sub>	T <sub>15</sub> + adición al medio de cultivo nitrato de plata (1mg L <sup>-1</sup> )	4
T <sub>18</sub>	Se eliminaron las hojas del explante, lavaron con agua y jabón líquido, cepilló cada explante y enjuagó con ADE. Los explantes fueron colocados en hipoclorito de sodio al 0,1% durante 24h, lavados durante 15min en ADE, sumergidos en hipoclorito de sodio al 0,01% durante 30min. En la cámara de flujo laminar, enjuagados durante 15min en ADE, y sumergidos en sulfato de gentamicina durante 4h, finalmente tres enjuagues en ADE.	5

<sup>a</sup> Cada explante se contó como una repetición por tratamiento.

Los tratamientos tuvieron diferente número de repeticiones debido al limitado material vegetativo, en las diferentes etapas de corte.

La unidad experimental fue un tubo de vidrio (25 x 150mm), con un explante de babaco.

Las variables evaluadas a los quince días posteriores a la introducción, fueron el porcentaje de mortalidad y la contaminación (formación y presencia de colonias bacterianas o fúngicas en la superficie del medio o sobre el explante; el área del explante y del medio, que cubría la bacteria u hongo, mediante una escala de porcentaje) (Anexo 3).

#### **4.3.1.1.3. Pruebas de caracterización de la bacteria contaminante**

Se aisló y sembró la bacteria contaminante en cajas con Plate Count Agar (PCA), e incubaron a 25°C, durante 24h. Luego se realizaron las siguientes pruebas:

**Reacción Gram KOH:** En una placa portaobjetos se agregó una gota de KOH al 3% y sobre ésta se realizó un frotis de la bacteria, luego de 10s se observó la reacción. La formación de un hilo viscoso se consideró como bacteria Gram negativa y la no formación del hilo como bacteria Gram positiva (Oleas, 1991).

**Tinción Gram convencional:** Sobre una placa portaobjetos se realizó un frotis de la bacteria, luego se adicionó una gota de agua y flameó. Se agregó violeta de genciana (0,5%) durante 1min, se lavó con agua corriente, se colocó lugol durante 1min, se lavó con alcohol cetona y se agregó safranina durante 1min, finalmente se lavó y secó. Las bacterias fueron observadas bajo el microscopio con el lente de inmersión 1000x. La

coloración púrpura oscura fue considerada como bacterias Gram positivas y la coloración roja como bacterias Gram negativas (Oleas, 1991).

**Test API 20 E:** este sistema estandarizado, permite la identificación de *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram negativas no exigentes. Consta de 21 test bioquímicos, con sustratos deshidratados ubicados en microtubos, en cada tubo se inoculó una dilución bacteriana de 100µL con una micropipeta. Se incubaron durante 24h a 36°C ± 2°C. Las reacciones producidas, se traducen mediante cambios de color; la lectura se llevó a cabo mediante la Tabla de lectura API 20 E (Anexo 2.1) y otras tablas de la familia *Enterobacteriaceae* (Anexo 2.2) (Holt, 1977; BioMérieux, 2002).

**Prueba de oxidasa:** para esta prueba se utilizaron dos cajas petri sembradas con la bacteria. Con una pipeta se colocó sobre la bacteria, una gota de solución de hidrocloreto de tetrametil-p-fenilenodiamina al 1%. La reacción fue positiva al teñirse de color violáceo en 5-10s, fue considerada una reacción intermedia al teñirse de color violáceo entre 10-20s, y si no se tiñe de color violáceo o no cambia de coloración después de 60s, es una reacción negativa. (Oleas, 1991).

#### 4.3.1.1.4. Antibiogramas

Debido a la alta contaminación con bacterias en las introducciones, se realizaron antibiogramas con el fin de comprobar si los tratamientos aplicados fueron eficientes; para el control de bacterias, se utilizaron los siguientes productos comerciales como Bacterol (Trimetoprim + Sulfametoxazol), Agry-gent (Sulfato de gentamicina + clorhidrato de oxitetraciclina), Bioper (peróxido de hidrógeno + ácido acético) y otros como peróxido de hidrógeno.

En el antibiograma con Bacterol se probaron tres dosis diferentes y un control, la primera dosis de  $25 \mu\text{L L}^{-1}$ , la segunda una dilución a la  $10^{-1}$  y la tercera una dilución a la  $10^{-2}$ . Se preparó una solución bacteriana madre (obtenida de un explante contaminado), en suero fisiológico (NaCl al 1%), de la que se realizaron diluciones crecientes hasta  $10^{-5}$ . De esta última se tomaron  $25 \mu\text{L}$  para sembrar en cada caja petri, en las que finalmente se dispensó el medio y se colocó cuatro trozos de papel toalla estéril sumergidos con su respectiva dosis de Bacterol. Las cajas fueron incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 48h, para su evaluación.

El antibiograma con Agry-gent se realizó con una dosis de  $1,25 \text{ g L}^{-1}$ , contando con un control. Para este caso se sembró la bacteria de igual forma a la detallada en el primer antibiograma, posteriormente se dispensó el medio y se colocó cuatro trozos de papel toalla estéril sumergidos en la dosis comercial recomendada de Agry-gent. Los ensayos tuvieron dos repeticiones, fueron incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 48h.

El antibiograma con peróxido de hidrógeno se ensayó con tres concentraciones: al 10%, 1,0% y 0,1%. Se sembró la bacteria como en el primer antibiograma, posteriormente se dispensó el medio con cada una de las dosis de peróxido de hidrógeno. Los ensayos fueron incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 48h, posterior a las cuales fueron evaluados. Se incluyó un control.

El antibiograma con Bioper (peróxido de hidrógeno + ácido acético) se realizó con tres dosis del producto:  $0,5\text{mL L}^{-1}$ ,  $1\text{mL L}^{-1}$  y  $2\text{mL L}^{-1}$ . Se preparó una solución madre bacteriana, en suero fisiológico (NaCl al 1%), de la cual se tomó  $50 \mu\text{L}$  para sembrar en cada caja petri, en las que finalmente se dispensó el medio. Se colocaron cuatro trozos de

papel toalla estéril sumergidos en cada una de las dosis mencionadas. Los ensayos fueron incubados a 25°C durante 48h, posterior a las cuales fueron evaluados.

Todos los antibiogramas, fueron evaluados a las 48h posteriores a la siembra mediante la presencia o ausencia de halo alrededor del producto evaluado.

#### **4.3.1.1.5. Baño maría**

Por la elevada contaminación bacteriana, se realizó un ensayo de tratamiento con agua caliente para reducir la población bacteriana con cuatro diferentes tiempos de exposición: 10, 20, 30 y 40mins, a una temperatura de  $45\pm 0,3^{\circ}\text{C}$  (baño maría); cada ensayo constó de dos repeticiones.

### **4.3.2. Fase de multiplicación**

#### **4.3.2.1. Determinación de la dosis óptima de auxinas en la fase de multiplicación.**

En esta fase se seleccionaron los brotes adaptados al medio de introducción, de los cuales se obtuvieron entre uno y cuatro explantes obteniéndose un apical, uno o dos medios y un basal (longitud entre 0,9-2,5cm y diámetro entre 0,3 y 1,2cm). Los explantes pasaron al medio de multiplicación de Cohen y Cooper (1982), en donde permanecieron durante 21 días.

Los tratamientos consistieron de tres fuentes vegetativas (apical, media o basal), tres auxinas (ANA, AIA o 2,4 - D), cada una con tres dosis. Se contó con tres testigos, uno para cada fuente sin auxinas en el medio (Cuadro 4.3.2.1.1).

**Cuadro 4.3.2.1.1. Fuente vegetativa, auxinas y dosis utilizadas para la inducción de brotes de babaco en la fase de multiplicación. IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Nº tratamiento</b>	<b>Fuente vegetativa</b>	<b>Auxina</b>	<b>Dosis (ppm)</b>
T <sub>1</sub>	Apical	AIA	0.167
T <sub>2</sub>	Basal	AIA	0.167
T <sub>3</sub>	Media	AIA	0.167
T <sub>4</sub>	Apical	AIA	0.333
T <sub>5</sub>	Basal	AIA	0.333
T <sub>6</sub>	Media	AIA	0.333
T <sub>7</sub>	Apical	AIA	0.5
T <sub>8</sub>	Basal	AIA	0.5
T <sub>9</sub>	Media	AIA	0.5
T <sub>10</sub>	Apical	ANA	0.5
T <sub>11</sub>	Basal	ANA	0.5
T <sub>12</sub>	Media	ANA	0.5
T <sub>13</sub>	Apical	ANA	1.0
T <sub>14</sub>	Basal	ANA	1.0
T <sub>15</sub>	Media	ANA	1.0
T <sub>16</sub>	Apical	ANA	1.5
T <sub>17</sub>	Basal	ANA	1.5
T <sub>18</sub>	Media	ANA	1.5
T <sub>19</sub>	Apical	2,4 D	0.5
T <sub>20</sub>	Basal	2,4 D	0.5
T <sub>21</sub>	Media	2,4 D	0.5
T <sub>22</sub>	Apical	2,4 D	1.0
T <sub>23</sub>	Basal	2,4 D	1.0
T <sub>24</sub>	Media	2,4 D	1.0
T <sub>25</sub>	Apical	2,4 D	1.5
T <sub>26</sub>	Basal	2,4 D	1.5
T <sub>27</sub>	Media	2,4 D	1.5
T <sub>28</sub>	Apical	-	0
T <sub>29</sub>	Basal	-	0
T <sub>30</sub>	Media	-	0

Las variables tomadas en este ensayo fueron: el número de brotes formados, la longitud del brote formado a la salida del medio de multiplicación, el porcentaje de formación de callos, el porcentaje del área del explante cubierta por callos, el número de hojas nuevas formadas, la fenolización, la contaminación bacteriana, el amarillamiento del explante y el porcentaje de mortalidad. Estos datos fueron colectados cada 5 días, hasta completar 4 evaluaciones.

El diseño experimental utilizado fue bloques incompletos al azar en arreglo factorial (3x3x3+3), en donde los tratamientos T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub>, T<sub>9</sub>, T<sub>11</sub>, T<sub>12</sub>, T<sub>20</sub> y T<sub>23</sub> contaron con dos repeticiones, los tratamientos T<sub>15</sub>, T<sub>18</sub>, T<sub>19</sub>, T<sub>21</sub>, T<sub>22</sub>, T<sub>24</sub>, T<sub>25</sub> y T<sub>28</sub> con tres repeticiones, mientras que los tratamientos T<sub>1</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>13</sub>, T<sub>16</sub>, T<sub>27</sub> y T<sub>30</sub> contaron con cuatro repeticiones. Los tratamientos T<sub>8</sub>, T<sub>14</sub>, T<sub>17</sub>, T<sub>26</sub> y T<sub>29</sub> tuvieron una repetición, debido a la falta de material vegetativo basal, que durante la fase de introducción y la inoculación en el medio de multiplicación se perdieron, por manipulación y contaminación.

La unidad experimental fue un frasco de vidrio (4 x 15cm), con un explante de babaco.

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ijk} = u + F_i + A_j + D_k + (FA)_{ij} + (FD)_{ik} + (AD)_{jk} + (FAD)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = variable aleatoria

$u$  = media general

$F_i$  = efecto del i-ésima fuente

$A_j$  = efecto del j-ésima de la auxina

$D_k$  = efecto del k-ésima de la dosis

$(FA)_{ij}$  = Interacción de fuente - auxina

$(FD)_{ik}$  = Interacción de fuente - dosis

$(AD)_{jk}$  = Interacción de auxina - dosis

$(FAD)_{ijk}$  = Interacción de fuente – auxina - dosis

$\varepsilon_{ijk}$  = error experimental

Durante la fase de multiplicación se colectaron datos de las siguientes variables: el número de brotes formados (se contabilizó la cantidad de nuevos brotes que aparecieron en el

explante durante su permanencia en el medio), la longitud del brote (se midió con papel milimetrado estéril la longitud de cada brote nuevo), el porcentaje de formación de callos (se evaluó el aparecimiento de callos en el explante, se midió utilizando una escala cualitativa de ausencia o presencia de callo, dándole valores de 0 a la primera y 1 a la segunda, multiplicado por cien), el porcentaje del área del explante cubierta por callos (se evaluó el área del explante cubierta por callos, mediante una escala de porcentaje (Anexo 3), que se expresó en porcentaje), la formación de hojas nuevas (se contó el número de hojas nuevas que aparecieron en el explante durante su permanencia en el medio), la fenolización (se determinó mediante observaciones de la oxidación y necrosamiento de tejido vegetal ó del medio), la contaminación bacteriana (es la formación y presencia de colonias bacterianas, exudados presentes en el explante y medio, fue evaluada el área del explante y del medio, que cubría la bacteria, mediante una escala porcentual) (Anexo 3), el amarillamiento del explante (se evaluó mediante observación de la despigmentación de hojas, tallos y brotes, comparando con la escala colorimétrica de Lindsey y Brown, (2006)) (Anexo 4) y el porcentaje de mortalidad (se contó la cantidad de explantes muertos en cada una de las observaciones y se relacionó entre el número de explantes muertos sobre el total de explantes, multiplicado por cien).

Se realizó un análisis paramétrico para las siguientes variables: el número de brotes formados, el porcentaje de formación de callos, el porcentaje del área cubierta por callos, la formación de hojas nuevas y contaminación bacteriana. También, se hizo un análisis no paramétrico de Kruskal y Wallis para las variables que no cumplieron los supuestos del ANDEVA, las mismas que fueron la: longitud del brote, fenolización y amarillamiento del explante. los factores en estudio y sus interacciones. Además, se realizaron pruebas de comparación de medias de Duncan al 5% para fuente, auxinas, dosis e interacciones.

### **4.3.3. Fase de enraizamiento**

#### **4.3.3.1. Establecimiento del explante en la fase de enraizamiento para la selección del medio adecuado y la dosis óptima de auxina**

En base a los resultados de pruebas anteriores no se pasaron los explantes al medio de elongación, ya que no respondieron adecuadamente en esta etapa<sup>1</sup>. Los explantes permanecieron en la fase de multiplicación por 21 días, luego se cambiaron al medio de enraizamiento

Los tratamientos consistieron de dos medios de enraizamiento (Cohen y Cooper, 1982 y Quoirin y Lepoivre, 1977), dos auxinas diferentes (ANA y AIB) cada una con tres dosis. Se incluyeron con dos testigos (sin auxinas), uno para cada medio de enraizamiento (Cuadro 4.3.3.1.1).

La recolección de datos se realizó cada siete días, hasta completar seis evaluaciones. Las variables evaluadas fueron: amarillamiento del explante, contaminación (hongos y bacterias), porcentaje de mortalidad y porcentaje de enraizamiento. Además, se contó el número total de raíces a la salida del explante del medio de enraizamiento.

El diseño experimental utilizado fue bloques completos al azar en arreglo factorial (2x2x3+2), con cuatro repeticiones.

La unidad experimental fue un frasco de vidrio (8 x 11cm) con un explante de babaco.

---

<sup>1</sup> Landázuri, P. 2006. Micropropagación de Babaco (entrevista). Sangolquí Ecuador. Carrera de Ciencias Agropecuarias, IASA - ESPE.

**Cuadro 4.3.3.1.1. Medio de cultivo, auxinas y dosis utilizadas en la fase de enraizamiento. IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Nº tratamiento</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Auxina</b>	<b>Dosis (ppm)</b>
T <sub>1</sub>	Cohen y Cooper (1982)	AIB	0.5
T <sub>2</sub>	Cohen y Cooper (1982)	AIB	1.0
T <sub>3</sub>	Cohen y Cooper (1982)	AIB	1.5
T <sub>4</sub>	Cohen y Cooper (1982)	ANA	0.5
T <sub>5</sub>	Cohen y Cooper (1982)	ANA	1.0
T <sub>6</sub>	Cohen y Cooper (1982)	ANA	1.5
T <sub>7</sub>	Quoirin y Lepoivre (1977)	AIB	0.5
T <sub>8</sub>	Quoirin y Lepoivre (1977)	AIB	1.0
T <sub>9</sub>	Quoirin y Lepoivre (1977)	AIB	1.5
T <sub>10</sub>	Quoirin y Lepoivre (1977)	ANA	0.5
T <sub>11</sub>	Quoirin y Lepoivre (1977)	ANA	1.0
T <sub>12</sub>	Quoirin y Lepoivre (1977)	ANA	1.5
T <sub>13</sub>	Cohen y Cooper (1982)	Testigo	-
T <sub>14</sub>	Quoirin y Lepoivre (1977)	Testigo	-

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ijkl} = u + B_i + M_j + A_k + D_l + (MA)_{jk} + (MD)_{jl} + (AD)_{kl} + (MAD)_{jkl} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = variable aleatoria

$u$  = media general

$B_i$  = efecto del i-ésimo bloque

$M_j$  = efecto del j-ésima del medio de enraizamiento

$A_k$  = efecto del k-ésima de la auxina

$D_l$  = efecto del k-ésima de la dosis

$(MA)_{jk}$  = Interacción Medio - Auxina

$(MD)_{jl}$  = Interacción Medio - Dosis

$(AD)_{kl}$  = Interacción Auxina - Dosis

$(MAD)_{jkl}$  = Interacción Medio - Auxina - Dosis

$\varepsilon_{ijk}$  = error experimental

Las variables recolectadas durante la fase de enraizamiento fueron: el número de raíces (se contabilizó la cantidad de raíces formadas por explante, al final de la fase de enraizamiento), la contaminación fúngica y bacteriana (es la formación y presencia de colonias bacterianas, exudados presentes en el explante y medio, o fúngicas que es la presencia de micelio; en la superficie del medio o sobre el explante. Se evaluó el área del explante y del medio, que cubría la bacteria u hongo, mediante una escala de porcentaje) (Anexo 3), el amarillamiento del explante (se evaluó mediante observación de la despigmentación de hojas, tallos y brotes, comparando con la escala colorimétrica de Lindsey y Brown, (2006)) (Anexo 4), el porcentaje de enraizamiento (%E) (se determinó el número de individuos que enraizaron, en relación a la población total por tratamiento, expresado en porcentaje) y el porcentaje de mortalidad (se contó la cantidad de explantes muertos en cada una de las observaciones y se estableció la relación entre el número de explantes muertos sobre el total de explantes, multiplicado por cien).

Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal y Wallis para las variables: amarillamiento del explante, contaminación (hongos y bacterias), porcentaje de mortalidad y porcentaje de enraizamiento. Además, se realizaron pruebas de comparación de medias de Duncan al 5% para fuente, auxinas, dosis e interacciones.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. Determinación del protocolo de desinfección más adecuado para la introducción de explantes de babaco *in vitro*

#### 5.1.1. Fase introducción

##### 5.1.1.1. Protocolo de desinfección

Al analizar el porcentaje de contaminación bacteriana, fúngica y mortalidad durante la fase de introducción, se observó que el tratamiento T<sub>16</sub> (jabón líquido + yodo + Benlate 1g L<sup>-1</sup> + hipoclorito de sodio 20% + Bioper 1h + ácido acético 3mL L<sup>-1</sup> por 1h) presentó la menor contaminación bacteriana, no presentó contaminación fúngica, ni mortalidad (Cuadro 5.1.1.1.1).

**Cuadro 5.1.1.1.1. Porcentaje de contaminación bacteriana, contaminación fúngica y mortalidad de los explantes de babaco en el medio de introducción, IASA 1, Ecuador, 2007**

Tratamiento	Contaminación bacteriana (%)	Contaminación fúngica (%)	Mortalidad (%)
T <sub>1</sub>	82,14	7,65	2,04
T <sub>2</sub>	89,36	6,38	23,40
T <sub>3</sub>	90,91	3,64	29,09
T <sub>4</sub>	100,00	0,00	86,57
T <sub>5</sub>	83,93	0,00	25,00
T <sub>6</sub>	100,00	0,00	0,00
T <sub>7</sub>	100,00	0,00	0,00
T <sub>8</sub>	100,00	0,00	0,00
T <sub>9</sub>	100,00	0,00	25,00
T <sub>10</sub>	100,00	0,00	100,00
T <sub>11</sub>	100,00	0,00	100,00
T <sub>12</sub>	71,05	3,95	5,26
T <sub>13</sub>	92,00	0,00	94,67
T <sub>14</sub>	6,60	0,00	0,00
T <sub>15</sub>	3,20	0,00	0,00
T <sub>16</sub>	3,03	0,00	0,00
T <sub>17</sub>	25,00	0,00	25,00
T <sub>18</sub>	0,00	0,00	60,00

Los altos porcentajes de contaminación bacteriana en la mayoría de tratamientos, se debió a la presencia de una bacteria endófito. Los organismos endófitos son de difícil eliminación mediante esterilización externa. Una opción para disminuir el porcentaje de contaminación fue añadiendo antibióticos al medio, pero quizá este tuvo efecto en la alta tasa de mortalidad de los explantes. Contrario a los resultados obtenidos, Cañizares (2003) con el protocolo de desinfección para caricaceas (tratamiento T<sub>1</sub>), el presente estudio reportó un 82% de contaminación. Kumar *et al.* (1998), reportan cerca del 95% de brotes asépticos y viables en el cultivo *in vitro* de higo, con el uso de alcohol al 70% por 30s e hipoclorito de mercurio al 0,1% por 7min. De igual manera Fernando *et al.* (2001) y Hepaksoy y Aksoy (2006) reportan la eficiencia del uso del hipoclorito de sodio al 2% (i.a) durante 20min, en la propagación de papaya e higo, respectivamente. Estos protocolos no fueron eficientes, en el presente estudio. Sin embargo el uso de peróxido de hidrógeno más ácido peracético (T<sub>14</sub>, T<sub>15</sub> y T<sub>16</sub>), resultó efectivo ya que presentó baja contaminación y no mortalidad, coincidiendo con Barrueto y Jordan (2006) quienes obtuvieron una disminución de contaminación entre el 50-90%, mediante el uso de peróxido de hidrógeno. Por su parte López *et al.* (2002) con el uso de ácido peracético en una concentración de 2000ppm por 1min alcanzaron los mayores resultados como germicida. Tanto el peróxido de hidrógeno como el ácido acético, favorecieron en la desinfección, ya que afectaron a la bacteria al influir directamente sobre su pH óptimo.

Los protocolos de desinfección demuestran un bajo porcentaje de contaminación causada por hongos. Según Rivero *et al.* (2001), valores de contaminación menores al 16,6% son considerados bajos cuando se trabaja con frutales leñosos provenientes del campo, por tanto los protocolos de desinfección fueron eficientes para el control de hongos. Estos resultados para babaco son de gran relevancia puesto que uno de sus principales problemas

en el campo es *Fusarium oxysporum*, hongo endófito que causa la MVB, lo que indica que el protocolo de desinfección es eficiente y permite obtener plantas *in vitro* libres de *Fusarium*. En el caso del T<sub>1</sub> se debe al tratamiento con jabón, ya que este rompe la tensión superficial y produce la ruptura de esporas de hongos, además de Benlate que es un fungicida sistémico.

Los mayores porcentajes de mortalidad se presentaron con los tratamientos T<sub>10</sub> y T<sub>11</sub>, la muerte de los explantes pudo deberse al excesivo tiempo de exposición al calor en baño maría. Ya que según Núñez (2003), a mayor temperatura y tiempo de exposición la respuesta del explante en el medio disminuye e incrementa la mortalidad. Otro factor de las altas mortalidades pudo ser la contaminación bacteriana. En los tratamientos T<sub>4</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>11</sub> y T<sub>13</sub> se encontró que a mayor contaminación presentó mayor mortalidad. La mortalidad puede estar influenciada por la excesiva manipulación y tiempo de exposición a sustancias desinfectantes, como es el caso del tratamiento T<sub>18</sub> que fue sometido a 30 horas de protocolo de desinfección previo la siembra en el medio de cultivo.

#### **5.1.1.2. Pruebas de caracterización de la bacteria**

Se aisló la bacteria encontrada en el cultivo de babaco *in vitro*. Al analizar los resultados de las pruebas de caracterización se determinó la formación del hilo viscoso en la prueba Gram KOH, lo que indica que la bacteria es Gram negativa. La prueba Gram convencional mostró coloración roja, que confirma a la bacteria como Gram negativa. La forma de las células fue bacilar. En la prueba de oxidasa se obtuvo una reacción positiva tardía. El test API 20E constituye un sistema estandarizado que permite la identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes (BioMérieux, 2002), al analizar los resultados de la bacteria evaluada con el Test API 20E (Cuadro 5.1.1.2.1), se

encontraron semejanzas en las características descritas por Holt (1977). Las características macroscópicas y microscópicas se confrontaron también, con las claves taxonómicas de Holt (1977), Oleas (1991) y Agrios (1995), para la determinación de género, por lo que se asume que la bacteria pertenece al género *Erwinia*.

**Cuadro 5.1.1.2.1. Tests API 20 E para identificación de bacilos Gram negativos, IASA 1, Ecuador, 2007**

Tests	Componentes activos	Resultados	
		Clave	Negativo / Positivo
ONPG	2-nitro-fenil- $\beta$ D-galactopiranosida	amarillo	Positivo (+)
ADH	L-arginina	rojo/anaranjado	Positivo (+)
LDC	L-lisina	rojo/anaranjado	Positivo (+)
ODC	L-ornitina	rojo/anaranjado	Positivo (+)
CIT	citrato trisódico	azul-verde/azul	Positivo (+)
H <sub>2</sub> S	tiosulfato sódico	incoloro/grisáceo	Negativo (-)
URE	urea	rojo/anaranjado	Positivo (+)
TDA	L-triptófano	Amarillo	Negativo (-)
IND	L-triptófano	incoloro, verde pálido/amarillo	Negativo (-)
VP	piruvato sódico	Incoloro	Negativo (-)
GEL	gelatina	no difusión	Negativo (-)
GLU	D-glucosa	amarillo	Positivo (+)
MAN	D-manitol	amarillo	Positivo (+)
INO	inositol	azul/azul verdoso	Negativo (-)
SOR	D-sorbitol	amarillo	Positivo (+)
RHA	L-ramnosa	amarillo	Positivo (+)
SAC	D-sacarosa	amarillo	Positivo (+)
MEL	D-melibiosa	amarillo	Positivo (+)
AMY	amigdalina	amarillo	Positivo (+)
ARA	L-arabinosa	amarillo	Positivo (+)

Al confrontar los resultados obtenidos en el Test API 20E sobre la bacteria, con las características fenotípicas de tres géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* reportadas por Gardan *et al.* (2004) (Anexo 5A) se encontró mayor similitud con los grupos fenotípicos 1 y 3, en los cuales se encuentran los géneros *Pectobacterium*, *Pantoea* y *Erwinia* respectivamente, lo que refuerza la relación de la bacteria con el género *Erwinia* (Anexo 5B).

### 5.1.1.3. Antibiogramas

Al analizar los resultados del porcentaje de formación de halo en los antibiogramas se encontró, que T<sub>10</sub> (Bioper, 2,0mL L<sup>-1</sup>) presentó el mayor porcentaje de formación de halo con un 75 %, seguido por T<sub>8</sub> y T<sub>9</sub> (Bioper, 1mL L<sup>-1</sup> y Bioper, 1,5mL L<sup>-1</sup>) con un 50% de formación de halo, mientras el resto de tratamientos no formó halo (Cuadro 5.1.1.3.1.), lo que indica que el producto Bioper (Peróxido de hidrógeno+ácido acético) resultó ser más eficiente en el control de la bacteria que el resto de productos.

**Cuadro 5.1.1.3.1. Porcentaje de formación de halo para los antibiogramas, IASA 1, Ecuador, 2007**

Antibiogramas		Dosis	Formación de halo (%)
Nº	Producto		
T <sub>0</sub>	Control	0	0
T <sub>1</sub>	Bacterol (Trimetoprim + Sulfametoxazol)	25 µL L <sup>-1</sup>	0
T <sub>2</sub>	Bacterol (Trimetoprim + Sulfametoxazol)	25 µL L <sup>-1</sup> (Dilución a la <sup>-1</sup> )	0
T <sub>3</sub>	Bacterol (Trimetoprim + Sulfametoxazol)	25 µL L <sup>-1</sup> (Dilución a la <sup>-2</sup> )	0
T <sub>4</sub>	Agry-gent (Sulfato de gentamicina + clorhidrato de oxitetraciclina)	1,25 g L <sup>-1</sup>	0
T <sub>5</sub>	Peroxido de hidrógeno	10 % (1mL L <sup>-1</sup> )	0
T <sub>6</sub>	Peroxido de hidrógeno	1% (0,1mL L <sup>-1</sup> )	0
T <sub>7</sub>	Peroxido de hidrógeno	0.1 % (10µL L <sup>-1</sup> )	0
T <sub>8</sub>	Bioper (peroxido de hidrogeno + ácido acético)	0,5mL L <sup>-1</sup>	50
T <sub>9</sub>	Bioper (peroxido de hidrogeno + ácido acético)	1,0mL L <sup>-1</sup>	50
T <sub>10</sub>	Bioper (peroxido de hidrogeno + ácido acético)	2,0mL L <sup>-1</sup>	75



**Figura 5.1.1.3.1. A) No formación de halo y B) Formación de halo, IASA 1, Ecuador, 2007**

#### 5.1.1.4. Baño maría

Al analizar los resultados se encontró que los diferentes tiempos de exposición de la bacteria a una temperatura de  $45^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  en baño maría, no tuvieron ningún efecto sobre la misma. Al evaluar los diferentes ensayos, se observó un crecimiento normal a las 24 horas. Los tiempos de exposición probados fueron muy cortos (10-40min), por lo que quizá se requiera una exposición de hasta 24h. Sin embargo, el porcentaje de mortalidad de los explantes se eleva conforme se incrementa el tiempo de permanencia en baño maría (Núñez, 2003).

## 5.2. Cuantificación de la dosis óptima de auxinas en la fase de multiplicación.

### 5.2.1. Fase de multiplicación

Se realizó un análisis de los valores obtenidos para el número de brotes formados y la longitud de brote en relación a las tres fuentes vegetativas, las tres auxinas, las tres dosis y tratamientos.

**Cuadro 5.2.1.1. Análisis de la varianza para el número de brotes formados y la longitud del brote en los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>F.V.</b>	<b>Número de brotes formados</b>	<b>Longitud del brote †</b>
<b>Modelo</b>	<0,0001**	0,0003 <sup>ns</sup>
<b>Fuente</b>	<1,0001**	<0,0001**
<b>Auxinas</b>	0,1102 <sup>ns</sup>	0,0004**
<b>Dosis</b>	0,3872**	0,6437 <sup>ns</sup>
<b>Repeticiones</b>	0,0399**	0,0314*
<b>Fuente* auxina</b>	0,1908 <sup>ns</sup>	0,0025**
<b>Fuente*dosis</b>	0,0626 <sup>ns</sup>	0,2234 <sup>ns</sup>
<b>Auxina*dosis</b>	0,6832 <sup>ns</sup>	0,8963 <sup>ns</sup>
<b>F * A * D</b>	0,2783 <sup>ns</sup>	0,9610 <sup>ns</sup>
<b>CV</b>	74,52	

CV Coeficiente de Variación

† Prueba no paramétrica

Se encontró alta significación en el número de brotes formados bajo el efecto de los tratamientos para el factor fuente ( $F_{2, 286} = 37,01$ ;  $p < 0,0001$ ; Cuadro 5.2.1.1).

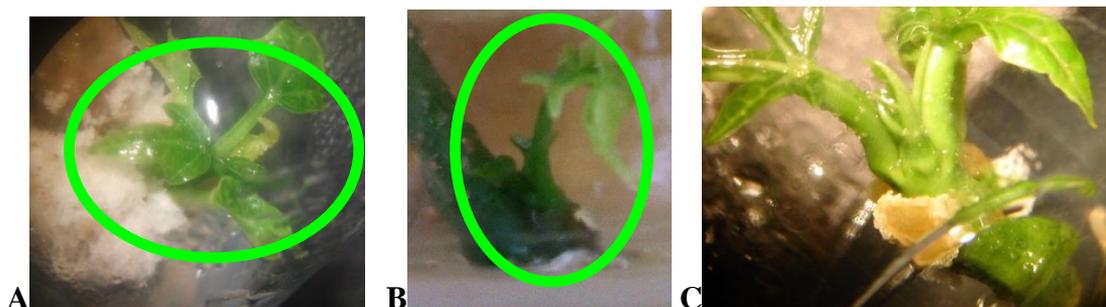
Al analizar la longitud del brote bajo el efecto de los tratamientos se observaron efectos significativos para la interacción Fuente\*Auxina ( $F_{6, 47} = 4,01$ ;  $p = 0,0025$ ; Cuadro 5.2.1.1) además para los factores fuente ( $F_{2, 47} = 13,20$ ;  $p < 0,0001$ ) y auxina ( $F_{3, 47} = 7,37$ ;  $p = 0,0004$ ).

**Cuadro 5.2.1.2. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de brotes formados y la longitud del brote, para la fuente vegetativa de los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

Fuente	Número de brotes formados	Longitud brote (cm)
Apical	0,1 $\pm$ 0,1 a	0,04 $\pm$ 0,2 a
Basal	1,2 $\pm$ 0,2 b	0,43 $\pm$ 0,1 b
Medio	0,9 $\pm$ 0,1 b	0,47 $\pm$ 0,2 b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0,05$

Al comparar los explantes bajo el efecto de las fuentes, se determinó que las fuentes basal y media, produjeron el mayor número de brotes en comparación con la fuente apical (Cuadro 5.2.1.2). Las fuentes apicales no presentaron alta formación de brotes, esto se debe a que en la mayoría de las especies la yema apical ejerce una acción inhibitoria sobre la formación de yemas laterales, evitando o retardando su desarrollo, esto parece ser causado por una auxina, diferente al AIA (Salisbury y Ross, 2002©). Rivero *et al.*(2001) obtuvieron resultados parecidos en guanábano. Ellos indican un mayor porcentaje de brotación para los explantes intermedios. Los explantes de fuentes basal y media, se ven favorecidos también, por poseer mayor cantidad de reservas (Figura 5.2.1.1).



**Figura 5.2.1.1. A) Fuente basal con brote, B) Fuente Media con brote y c) Fuente apical sin brote, en la fase de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

Al realizar la prueba de medias de Duncan al 5% para la longitud del brote, se encontraron diferencias significativas para los factores dosis y tratamientos. Al comparar el factor fuente, se determinó que los explantes que provienen de la fuente vegetativa basal y media, presentaron el mayor valor numérico para la longitud del brote (Cuadro 5.2.1.2). Las fuentes media y basal presentaron el mayor crecimiento del brote, esto se debe a que este tipo de explantes tienen mayor reserva de nutrientes y energía, lo que facilita el crecimiento del brote. Estos hechos concuerdan con Rivero *et al.* (2001), que obtuvieron mayor brotación para los explantes intermedios en guanábano.

**Cuadro 5.2.1.3. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar el número de brotes formados y la longitud del brote, para las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Auxina</b>	<b>Número de brotes formados</b>	<b>Longitud brote (cm)</b>
<b>2,4 D</b>	0,5 $\pm$ 0,1 ab	0,1 $\pm$ 0,0 a
<b>AIA</b>	0,7 $\pm$ 0,2 b	0,5 $\pm$ 0,2 b
<b>ANA</b>	0,6 $\pm$ 0,2 ab	0,1 $\pm$ 0,0 a
<b>TESTIGO</b>	0,3 $\pm$ 0,3 a	0,5 $\pm$ 0,2 b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

Al comparar las auxinas se encontró que los explantes bajo el efecto de la auxina AIA presentaron el mayor número de brotes. Y según la prueba de Duncan al 5%, los explantes bajo el efecto de la auxina AIA y los explantes sin auxinas presentaron el mayor valor numérico para la longitud del brote en esta fase (Cuadro 5.2.1.3). Esto se debe a que el

AIA no es un inhibidor que impida el desarrollo de las yemas laterales, al contrario el AIA fomenta su crecimiento (Salisbury y Ross, 2002©). La auxina AIA favorece la elongación celular (Marassi, 2004©), ésta presenta un movimiento preferencial en sentido basipétalo, lo que explica la mayor brotación y longitud de los brotes. Jordan y Velozo (1997) mencionan la formación de brotes a partir de hojas, en presencia de TDZ en combinación con bajos niveles de AIA y ANA, más no con la auxina 2,4-D; además reportan 100% de brotación a partir de yemas de chamburo (*V. pubescens*), en combinaciones de ANA, AIA y TDZ en el medio. Los resultados de este estudio sobre el uso de AIA concuerdan con los autores mencionados. Cabe resaltar que a pesar que la longitud del brote sea igual tanto para AIA como para el testigo, el número de brotes formados para AIA es más del doble que los producidos por el testigo, lo que coincide con Kumar *et al.* (1998) que indican que, para la regeneración *in vitro* de higo, en la ausencia de reguladores de crecimiento no se formaron brotes, ellos también sugieren la adición al medio de BA 2ppm y ANA 0,2ppm para obtener el mayor número de brotes.

**Cuadro 5.2.1.4. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de brotes formados y la longitud del brote, para las dosis de las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Dosis</b>	<b>Número de brotes formados</b>	<b>Longitud brote (cm)</b>
<b>0,00</b>	0,7 $\pm$ 0,3 ab	0,5 $\pm$ 0,2 b
<b>0,17</b>	0,9 $\pm$ 0,4 b	0,6 $\pm$ 0,2 b
<b>0,33</b>	0,5 $\pm$ 0,3 ab	0,4 $\pm$ 0,3 b
<b>0,50</b>	0,7 $\pm$ 0,1 ab	0,3 $\pm$ 0,1 ab
<b>1,00</b>	0,5 $\pm$ 0,1 a	0,1 $\pm$ 0,0 a
<b>1,50</b>	0,5 $\pm$ 0,2 ab	0,1 $\pm$ 0,0 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

Los explantes bajo el efecto de la dosis 0,167 (ppm) presentaron el mayor número de brotes por explante (Cuadro 5.2.1.4). La formación de brotes se vió favorecida por una relación alta de citocinina:auxina (Lizt, 1991; Ellena citado en Toro, 2004), por tanto a menor concentración de auxinas mayor relación citocinina:auxina. La dosis que produjo

mayor brotación fue de 0,167ppm. Este hecho coincide con los reportes de Jordan y Velozo (1997), quienes sugieren que para inducir la brotación en el cultivo de yemas axilares de babaco, es necesario una relación alta de citocinina:auxina (365:1). En este estudio la relación varió entre 485:1 y 54:1. Vega y Kitto (1990), reportan la formación de brotes axilares a partir de pedúnculos florales de babaco, con la adición de reguladores de crecimiento en las siguientes dosis BA 0,5ppm y AIA 2ppm; Evans *et al.* citados en Litz (1991) sugiere para la formación de vástagos, concentraciones de AIA y ANA entre 0,16 - 77ppm en el medio; mientras Jordan y Velozo (1997) obtuvieron brotación a partir de yemas axilares de babaco mediante la adición al medio de BA (4,9 ppm), AIB (0,123ppm) y ácido giberélico (AG3 0,42ppm). Ellos reportan un 100% de brotación a partir de yemas de chamburo (*V. pubescens*), en combinaciones de ANA (7,24ppm), AIA (1,63ppm) y TDZ (1ppm) en el medio. Kumar *et al.* (1998) indican para la regeneración *in vitro* de higo, que en la ausencia de reguladores de crecimiento no se formaron brotes, además sugiere la adición al medio de BA 2ppm y ANA 0,2ppm para obtener el mayor número de brotes.

Al comparar las dosis en base la prueba de Duncan al 5%, la que presentó el mayor valor numérico para la longitud del brote fue 0,167 (ppm), seguida por las dosis 0,33 (ppm) y el testigo (0ppm) (Cuadro 5.2.1.4). Galston citado en Salisbury y Ross (2002©) reporta que la tasa de crecimiento, disminuye conforme se supera la concentración óptima de auxina ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), es decir que la auxina podría actuar como un inhibidor del crecimiento en concentraciones superiores. En esta investigación dosis de 0,167 y 0,33 ppm de AIA presentaron la mayor longitud de brote, mientras la longitud del brote disminuye conforme aumenta la concentración de auxinas. El testigo presentó también, mayor longitud del

brote, esto puede deberse a que en el explante están presentes auxinas naturales que, favorecen el crecimiento del brote.

Al discriminar las medias de los tratamientos mediante la prueba de Duncan al 5%, se encontró que la dosis óptima de auxina para obtener el mayor número de brotes formados fue 0,167ppm de AIA (Cuadro 5.2.1.4).

**Cuadro 5.2.1.5. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de brotes formados y la longitud del brote, para los tratamientos en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

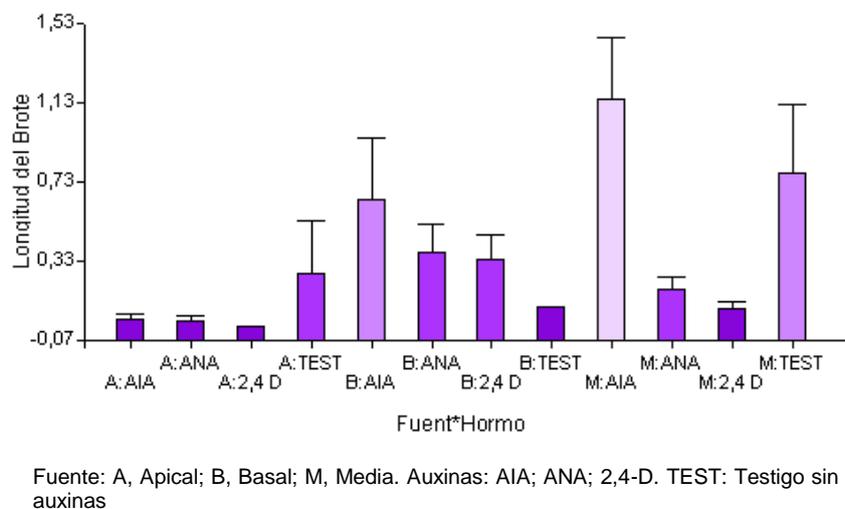
<b>Tratamientos</b>	<b>Número de brotes formados</b>	<b>Longitud brote (cm)</b>
T <sub>1</sub> : Apical, AIA, 0,167ppm	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>2</sub> : Basal, AIA, 0,167ppm	2,0 $\pm$ 0,0 c	1,2 $\pm$ 0,6 de
T <sub>3</sub> : Media, AIA, 0,167ppm	1,5 $\pm$ 0,5 bc	1,0 $\pm$ 0,3 bcde
T <sub>4</sub> : Apical, AIA, 0,33ppm	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>5</sub> : Basal, AIA, 0,33ppm	0,5 $\pm$ 0,5 ab	0,3 $\pm$ 0,3 ab
T <sub>6</sub> : Media, AIA, 0,33ppm	1,5 $\pm$ 0,5 bc	1,5 $\pm$ 1,1 e
T <sub>7</sub> : Apical, AIA, 0,5ppm	0,5 $\pm$ 0,5 ab	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>8</sub> : Basal, AIA, 0,5ppm	1,0 $\pm$ 0,0 abc	0,3 $\pm$ 0,0 abc
T <sub>9</sub> : Media, AIA, 0,5ppm	1,0 $\pm$ 0,0 abc	1,1 $\pm$ 0,5 cde
T <sub>10</sub> : Apical, ANA, 0,5ppm	0,3 $\pm$ 0,3 a	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>11</sub> : Basal, ANA, 0,5ppm	1,5 $\pm$ 0,5 bc	0,6 $\pm$ 0,1 abcd
T <sub>12</sub> : Media, ANA, 0,5ppm	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>13</sub> : Apical, ANA, 1ppm	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>14</sub> : Basal, ANA, 1ppm	1,0 $\pm$ 0,0 abc	0,1 $\pm$ 0,0 a
T <sub>15</sub> : Media, ANA, 1ppm	1,0 $\pm$ 0,0 abc	0,3 $\pm$ 0,1 abc
T <sub>16</sub> : Apical, ANA, 1,5ppm	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>17</sub> : Basal, ANA, 1,5ppm	2,0 $\pm$ 0,0 c	0,2 $\pm$ 0,0 ab
T <sub>18</sub> : Media, ANA, 1,5ppm	0,7 $\pm$ 0,3 ab	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>19</sub> : Apical, 2,4 D, 0,5ppm	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>20</sub> : Basal, 2,4 D, 0,5ppm	1,0 $\pm$ 0,0 abc	0,6 $\pm$ 0,1 abcd
T <sub>21</sub> : Media, 2,4 D, 0,5ppm	1,0 $\pm$ 0,0 abc	0,2 $\pm$ 0,1 ab
T <sub>22</sub> : Apical, 2,4 D, 1ppm	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>23</sub> : Basal, 2,4 D, 1ppm	0,5 $\pm$ 0,5 ab	0,2 $\pm$ 0,2 ab
T <sub>24</sub> : Media, 2,4 D, 1ppm	0,7 $\pm$ 0,3 ab	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>25</sub> : Apical, 2,4 D, 1,5ppm	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>26</sub> : Basal, 2,4 D, 1,5ppm	1,0 $\pm$ 0,0 abc	0,2 $\pm$ 0,0 ab
T <sub>27</sub> : Media, 2,4 D, 1,5ppm	0,8 $\pm$ 0,3 ab	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>28</sub> : Apical, Testigo	0,3 $\pm$ 0,3 a	0,3 $\pm$ 0,3 ab
T <sub>29</sub> : Basal, Testigo	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,1 $\pm$ 0,0 a
T <sub>30</sub> : Media, Testigo	1,0 $\pm$ 0,4 abc	0,8 $\pm$ 0,3 abcde

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

Los tratamientos T<sub>2</sub> (Fuente Basal, AIA, 0,167 ppm) y T<sub>17</sub> (Fuente Basal, ANA, 1,5 ppm) fueron los que presentaron el mayor valor numérico de brotes formados, en la fase de multiplicación (Cuadro 5.2.1.5).

El tratamiento T<sub>6</sub> (Fuente media, IAA, 0,33ppm) fue el que presentó el mayor valor numérico para la longitud del brote (Cuadro 5.2.1.5).

Al analizar la Figura 5.2.1.2 se encontró que la interacción Fuente\*Auxina de la fuente vegetativa media y la auxina AIA, muestra una tendencia estadísticamente significativa para obtener el mayor valor numérico para la longitud del brote.



**Figura 5.2.1.2. Promedio (±) del error estándar de la longitud del brote bajo el efecto de la interacción Fuente\*Auxina, IASA 1, Ecuador, 2007**

Se realizó un análisis de los valores obtenidos para el porcentaje de formación de callo, porcentaje del área del explante cubierta por callos y formación de hojas nuevas en relación a las tres fuentes vegetativas, las tres auxinas, las tres dosis y tratamientos.

Al analizar el porcentaje de formación de callo bajo el efecto de los tratamientos en estudio no se observó ningún efecto de la fuente, auxina, dosis, Fuente\*Auxina, Fuente\*Dosis, Auxina\*Dosis y Fuente\*Auxina\*Dosis ( $F_{4, 286} = 2,09$ ;  $p = 0,0822$ ; Cuadro 5.2.1.6).

Al analizar el porcentaje del área del explante cubierta por callos bajo el efecto de los tratamientos se determinó que existe una interacción significativa alta para la interacción Fuente\*Auxina ( $F_{6, 286} = 5,66$ ;  $p = <0,0001$ ; Cuadro 5.2.1.6), además se encontró alta significación para los factores fuente ( $F_{2, 286} = 32,07$ ;  $p = <0,0001$ ), auxina ( $F_{3, 286} = 7,79$ ;  $p = 0,0001$ ) y dosis ( $F_{4, 286} = 3,61$ ;  $p = 0,0068$ ).

**Cuadro 5.2.1.6. Análisis de la varianza para el porcentaje de formación de callo, porcentaje del área del explante cubierta por callos y formación de hojas nuevas en los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>F.V.</b>	<b>Porcentaje formación de callo</b>	<b>Porcentaje del área cubierta por callos</b>	<b>Formación Hojas nuevas</b>
<b>Modelo</b>	0,6702 <sup>ns</sup>	<0,0001**	<0,0001**
<b>Rep</b>	0,6779 <sup>ns</sup>	0,0023 **	0,5945 <sup>ns</sup>
<b>Fuente</b>	0,2930 <sup>ns</sup>	<0,0001**	0,3313 <sup>ns</sup>
<b>Auxina</b>	0,7632 <sup>ns</sup>	0,0001 **	0,0190 *
<b>Dosis</b>	0,0822 <sup>ns</sup>	0,0068 **	0,5371 <sup>ns</sup>
<b>Fuente* Auxina</b>	0,4050 <sup>ns</sup>	<0,0001**	0,0045 **
<b>Fuente*Dosis</b>	0,6004 <sup>ns</sup>	0,3075 <sup>ns</sup>	<0,0001**
<b>Auxina *Dosis</b>	0,9993 <sup>ns</sup>	0,2610 <sup>ns</sup>	0,0034 **
<b>F*A*D</b>	0,7445 <sup>ns</sup>	0,3674 <sup>ns</sup>	0,0121 *
<b>CV (%)</b>	12,7	68,77	77,93

CV Coeficiente de Variación

Al analizar la formación de hojas nuevas bajo el efecto de los factores en estudio se encontró que existen diferencias significativas para las interacciones Fuente\*Auxina \*Dosis ( $F_{5, 286} = 3,27$ ;  $p = 0,0121$ ; Cuadro 5.2.1.6), y diferencias altamente significativas para Auxina\*Dosis ( $F_{2, 286} = 5,81$ ;  $p = 0,0034$ ), Fuente\*Dosis ( $F_{8, 286} = 5,11$ ;  $p = <0,0001$ ) y Fuente\*Auxina ( $F_{6, 286} = 3,22$ ;  $p = 0,0045$ ), además se encontró diferencia significativa en el factor auxina ( $F_{3, 286} = 3,37$ ;  $p = <0,0190$ )

**Cuadro 5.2.1.7. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del área del explante cubierta por callos para la fuente vegetativa de los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Fuente</b>	<b>Porcentaje del área cubierta por callos (%)</b>
<b>Apical</b>	23,0 $\pm$ 2,2 a
<b>Basal</b>	43,4 $\pm$ 3,7 b
<b>Medio</b>	46,4 $\pm$ 2,6 b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

Al comparar las diferentes fuentes vegetativas se encontró que las fuentes basales y medias presentan el mayor porcentaje de callo que la fuente vegetativa apical (Cuadro 5.2.1.7). El mayor porcentaje de callos en las fuentes media y apical pudo deberse a que los explantes grandes poseen un potencial regenerador mayor, mientras la capacidad regenerativa de los explantes pequeños tiende a ser baja (Lizt, 1991). Además, el área cubierta por callos se pudo ver favorecida por la cantidad de callos formados en la fase de introducción.

**Cuadro 5.2.1.8. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del porcentaje del área del explante cubierta por callos, y formación de hojas nuevas para las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Auxina</b>	<b>Porcentaje del área cubierta por callos (%)</b>	<b>Formación Hojas nuevas</b>
<b>2,4 D</b>	34,7 $\pm$ 2,7 ab	0,7 $\pm$ 0,1 a
<b>AIA</b>	43,4 $\pm$ 3,2 c	0,9 $\pm$ 0,1 bc
<b>ANA</b>	27,4 $\pm$ 2,6 a	0,7 $\pm$ 0,1 ab
<b>TESTIGO</b>	36,7 $\pm$ 6,2 bc	1,0 $\pm$ 0,1 c

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

Los explantes bajo el efecto de la auxina AIA presentaron el mayor porcentaje de callo, en relación con las auxinas ANA y 2,4D (Cuadro 5.2.1.8). Las auxinas participan en la mitosis, sobretudo el AIA, promueve la división celular por tanto favorecen la formación de callos. La combinación de auxinas con citocininas estimula la división celular o citocinesis (formación de callos) (Salisbury y Ross, 2002©). Vega y Kitto (1990) reportan

el uso del ANA (0-2ppm) para la formación de callos en babaco, más la adición de AIA (2ppm) al medio, para inducir brotamiento.

Al discriminar las medias de las dosis mediante la prueba de Duncan al 5%, se mostró que los explantes que formaron mayor cantidad de hojas nuevas no tenían auxina (testigo), seguidos por la auxina AIA (Cuadro 5.2.1.8). La formación de hojas se refiere al crecimiento y diferenciación celular, lo que implica la acción de las hormonas, sobre todo del AIA que actúa sobre la división y elongación celular (Lizt, 1991; Marassi, 2004©). Los explantes sin auxinas (0ppm) presentaron el mayor número de hojas formadas, esto pudo ser debido a la auxina presente en los meristemas de los explantes que se han diferenciado en hojas, sin embargo el número de hojas con aplicación de AIA fue considerable, cuya labor principal es la división celular, lo que puede justificar su acción positiva en la formación de hojas.

**Cuadro 5.2.1.9. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del porcentaje de formación de callo, porcentaje del área del explante cubierta por callos y formación de hojas nuevas para las dosis de las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Dosis</b>	<b>Porcentaje formación de callo (%)</b>	<b>Porcentaje del área cubierta por callos (%)</b>	<b>Formación Hojas nuevas</b>
<b>0,00</b>	97 $\pm$ 0,0 ab	36,7 $\pm$ 6,2 ab	1,00 $\pm$ 0,1 b
<b>0,17</b>	94 $\pm$ 0,0 a	33,2 $\pm$ 5,5 ab	0,88 $\pm$ 0,1 ab
<b>0,33</b>	100 $\pm$ 0,0 b	51,0 $\pm$ 5,9 c	0,88 $\pm$ 0,1 ab
<b>0,50</b>	98 $\pm$ 0,0 ab	39,5 $\pm$ 3,4 b	0,88 $\pm$ 0,1 ab
<b>1,00</b>	100 $\pm$ 0,0 b	29,9 $\pm$ 2,4 ab	0,66 $\pm$ 0,1 a
<b>1,50</b>	100 $\pm$ 0,0 b	27,0 $\pm$ 2,4 a	0,68 $\pm$ 0,1 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

La prueba de Duncan al 5% muestra diferencias para el factor dosis. Al comparar los explantes bajo el efecto de las dosis, se encontró que las dosis 0,33, 1 y 1,50 (ppm) influyeron en el mayor valor numérico para la presencia de callo (Cuadro 5.2.1.9). La

presencia de auxinas en el medio para cultivo de tejidos *in vitro*, producen mayor división celular (Salisbury y Ross, 2002©), lo que pudo favorecer la mayor presencia de callos usando las dosis mencionadas. Vega y Kitto (1998) reportan que la adición de citocininas y auxinas (BA 0,5ppm y AIA 2ppm) al medio MS, favorece la formación de callos, ya que incrementan el potencial de diferenciación. Otra condición que pudo favorecer al crecimiento de callos fue la adición de Caseína hidrolizada ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) y adenina sulfato ( $80 \text{ mg L}^{-1}$ ) al medio de multiplicación (Jordan y Velozo, 1997), a las concentraciones recomendadas por Cohen y Cooper (1982). Litz (1991) indica que el nitrógeno orgánico en forma de Caseína hidrolizada es benéfico para la iniciación y crecimiento de callos.

Los explantes bajo la influencia de la dosis 0,33ppm presentaron el mayor porcentaje de área cubierta con callos en comparación con el resto de dosis, en la fase de multiplicación (Cuadro 5.2.1.9). Vega y Kitto (1998) reportan que la adición de citocininas y auxinas (BA 0,5ppm y AIA 2ppm) al medio MS, favorece la formación de callos, ya que incrementan el potencial de diferenciación. El crecimiento de callos pudo ser favorecido por la adición de Caseína hidrolizada ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) y adenina sulfato ( $80 \text{ mg L}^{-1}$ ) al medio de multiplicación (Jordan y Velozo, 1997), a las concentraciones recomendadas por Cohen y Cooper (1982). Litz (1991) indica que el nitrógeno orgánico en forma de Caseína hidrolizada es benéfico para la iniciación y crecimiento de callos.

Los explantes bajo el efecto de dosis 0,167ppm de AIA presentaron el mayor valor numérico para la formación de hojas nuevas (Cuadro 5.2.1.9). La formación de hojas pudo ser favorecida por el efecto del AIA que actúa sobre la división y elongación celular (Litz, 1991; Marassi, 2004©). Dosis bajas de auxinas son las que provocan elongación (Salisbury y Ross, 2002©). Las auxinas propias del explante y la adición de dosis bajas

como 0,167 ppm de AIA favorecen el crecimiento longitudinal del explante, más la adición de las mismas pudo haber resultado en un proceso inhibitorio, ya que a concentraciones altas disminuye el crecimiento. Esta es quizá la razón por la que la dosis de 0,167ppm presentó el mayor número de hojas formadas.

**Cuadro 5.2.1.10. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del porcentaje del área del explante cubierta por callos y formación de hojas nuevas para los tratamientos en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

Tratamiento	Porcentaje del área cubierta por callos (%)	Formación Hojas nuevas
T <sub>1</sub> : Apical, AIA, 0,167ppm	10,8 $\pm$ 2,2 ab	0,5 $\pm$ 0,1 abcd
T <sub>2</sub> : Basal, AIA, 0,167ppm	40,0 $\pm$ 11,5cdefghi	1,4 $\pm$ 0,3 f
T <sub>3</sub> : Media, AIA, 0,167ppm	71,3 $\pm$ 5,2 kl	1,1 $\pm$ 0,2 def
T <sub>4</sub> : Apical, AIA, 0,33ppm	35,8 $\pm$ 8,3 bcdefgh	0,9 $\pm$ 0,1 cdef
T <sub>5</sub> : Basal, AIA, 0,33ppm	63,8 $\pm$ 12,9 ijkl	0,5 $\pm$ 0,3 abcd
T <sub>6</sub> : Media, AIA, 0,33ppm	68,8 $\pm$ 4,8 jkl	1,3 $\pm$ 0,3 ef
T <sub>7</sub> : Apical, AIA, 0,5ppm	32,8 $\pm$ 7,9abcdefg	1,1 $\pm$ 0,3 def
T <sub>8</sub> : Basal, AIA, 0,5ppm	55,0 $\pm$ 2,9 fghijkl	1,0 $\pm$ 0,00 def
T <sub>9</sub> : Media, AIA, 0,5ppm	60,8 $\pm$ 5,6 hijkl	0,9 $\pm$ 0,2 cdef
T <sub>10</sub> : Apical, ANA, 0,5ppm	19,3 $\pm$ 6,4 abcd	0,8 $\pm$ 0,2 bcdef
T <sub>11</sub> : Basal, ANA, 0,5ppm	58,8 $\pm$ 11,6 ghijkl	0,9 $\pm$ 0,4 cdef
T <sub>12</sub> : Media, ANA, 0,5ppm	51,3 $\pm$ 14,9 fghijk	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>13</sub> : Apical, ANA, 1ppm	15,6 $\pm$ 2,7abc	0,6 $\pm$ 0,1 abcde
T <sub>14</sub> : Basal, ANA, 1ppm	8,8 $\pm$ 1,3 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>15</sub> : Media, ANA, 1ppm	30,0 $\pm$ 5,2 abcdef	1,1 $\pm$ 0,1 def
T <sub>16</sub> : Apical, ANA, 1,5ppm	16,0 $\pm$ 3,8 abc	1,1 $\pm$ 0,1 def
T <sub>17</sub> : Basal, ANA, 1,5ppm	32,5 $\pm$ 2,5 abcdefg	1,3 $\pm$ 0,3 ef
T <sub>18</sub> : Media, ANA, 1,5ppm	34,2 $\pm$ 3,8 abcdefg	0,5 $\pm$ 0,2 abcd
T <sub>19</sub> : Apical, 2,4 D, 0,5ppm	31,3 $\pm$ 10,9 abcdef	0,8 $\pm$ 0,2 cdef
T <sub>20</sub> : Basal, 2,4 D, 0,5ppm	22,5 $\pm$ 6,4 abcde	1,4 $\pm$ 0,3 f
T <sub>21</sub> : Media, 2,4 D, 0,5ppm	47,6 $\pm$ 11,4 efghijk	0,8 $\pm$ 0,1 cdef
T <sub>22</sub> : Apical, 2,4 D, 1ppm	39,2 $\pm$ 7,3 cdefghi	1,0 $\pm$ 0,1 def
T <sub>23</sub> : Basal, 2,4 D, 1ppm	35,0 $\pm$ 2,7 abcdefgh	0,3 $\pm$ 0,2 abc
T <sub>24</sub> : Media, 2,4 D, 1ppm	43,3 $\pm$ 4,0 defghij	0,5 $\pm$ 0,2 abcd
T <sub>25</sub> : Apical, 2,4 D, 1,5ppm	23,5 $\pm$ 8,7 abcde	0,8 $\pm$ 0,1 cdef
T <sub>26</sub> : Basal, 2,4 D, 1,5ppm	37,5 $\pm$ 6,3 bcdefghi	0,5 $\pm$ 0,5 abcd
T <sub>27</sub> : Media, 2,4 D, 1,5ppm	31,3 $\pm$ 4,0 abcdef	0,1 $\pm$ 0,1 ab
T <sub>28</sub> : Apical, Testigo	8,8 $\pm$ 2,9 a	1,1 $\pm$ 0,2 def
T <sub>29</sub> : Basal, Testigo	77,5 $\pm$ 2,5 l	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>30</sub> : Media, Testigo	47,3 $\pm$ 8,8 efghijk	1,1 $\pm$ 0,2 def

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

El tratamiento T<sub>29</sub> (Fuente basal, testigo) presentó el mayor porcentaje de formación de callo en la fase de multiplicación (Cuadro 5.2.1.10). Los tratamientos que presentaron el mayor valor numérico para el número de hojas nuevas formadas fueron T<sub>2</sub> (Fuente basal, AIA, 0,167 ppm) y T<sub>20</sub> (Fuente basal, 2,4D, 0,5 ppm) en comparación con los demás tratamientos.

**Cuadro 5.2.1.11. Análisis de la varianza para de fenolización, contaminación bacteriana y de amarillamiento en los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

F.V.	Fenolización†	Contaminación Bacteriana	Amarillamiento del explante†
<b>Modelo</b>	<0,0001**	<0,0001**	0,0335*
<b>Rep</b>	0,0130 *	<0,0001**	0,2397 <sup>ns</sup>
<b>Fuent</b>	<0,0001**	0,4646 <sup>ns</sup>	0,0069**
<b>Auxina</b>	0,0004 **	<0,0001**	0,2827 <sup>ns</sup>
<b>Dosis</b>	0,2061 <sup>ns</sup>	0,4194 <sup>ns</sup>	0,8049 <sup>ns</sup>
<b>Fuent*Auxina</b>	0,6945 <sup>ns</sup>	0,0417 *	0,0252*
<b>Fuent*Dosis</b>	0,0071 **	0,0039 **	0,3970 <sup>ns</sup>
<b>Auxina*Dosis</b>	0,0075 **	0,9308 <sup>ns</sup>	0,7259 <sup>ns</sup>
<b>Fuent*Auxina *Dosis</b>	0,0542 <sup>ns</sup>	0,8506 <sup>ns</sup>	0,1953 <sup>ns</sup>
<b>CV</b>		82,35	

CV Coeficiente de Variación

† Prueba no paramétrica

Se realizó un análisis paramétrico de los valores para contaminación bacteriana, y un análisis no paramétrico de los valores obtenidos para fenolización y amarillamiento en relación a las tres fuentes vegetativas, las tres auxinas, las tres dosis y tratamientos.

Al analizar la fenolización bajo el efecto de los tratamientos se determinó que existen efectos altamente significativos para las interacciones Auxina\*Dosis ( $F_{2, 286} = 4,98$ ;  $p=0,0075$ ; Cuadro 5.2.1.11) y Fuente\*Dosis ( $F_{8, 286} = 2,70$ ;  $p=0,0071$ ), además se encontró alta significación para los factores fuente ( $F_{2, 286} = 13,52$ ;  $p<0,0001$ ) y auxina ( $F_{3, 286} = 6,27$ ;  $p=0,0004$ ).

Al analizar la contaminación bacteriana bajo el efecto de los factores en estudio se encontró diferencia significativa alta para la interacción Fuente\*Dosis ( $F_{8, 286} = 2,91$ ;

$p=0,0039$ ; Cuadro 5.2.1.11) y diferencia significativa para Fuente\* Auxina ( $F_{6, 286} = 2,22$ ;  $p=0,0417$ ), además se encontró alta significación para el factor auxina ( $F_{3, 286} = 29,78$ ;  $p<0,0001$ ).

Se determinó diferencia significativa para el amarillamiento del explante bajo el efecto de los factores en estudio para la interacción Fuente\*Auxina ( $F_{6, 286} = 2,45$ ;  $p=0,0252$ ; Cuadro 5.2.1.11) y diferencia significativa alta para el factor fuente ( $F_{2, 286} = 5,06$ ;  $p=0,0069$ ).

**Cuadro 5.2.1.12. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar de fenolización, contaminación bacterianas y amarillamiento del explante para la fuente vegetativa de los explantes de babaco introducidos al medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Fuente</b>	<b>Fenolización</b>	<b>Contaminación Bacteriana</b>	<b>Amarillamiento del explante</b>
<b>Apical</b>	0,7 $\pm$ 0,1 a	3,6 $\pm$ 0,3 b	0,02 $\pm$ 0,0 a
<b>Basal</b>	0,8 $\pm$ 0,2 a	2,5 $\pm$ 0,4 a	0,12 $\pm$ 0,0 b
<b>Medio</b>	1,4 $\pm$ 0,2 b	3,9 $\pm$ 0,4 b	0,06 $\pm$ 0,0 ab

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

Al comparar las fuentes vegetativas se encontró que las fuentes apical y basal produjeron menor fenolización en el medio de cultivo (Cuadro 5.2.1.12). Se presume que la mayor distancia del ápice terminal disminuye la oxidación fenólica, lo que justifica que la fuente basal haya presentado menor fenolización con relación a los explantes de fuente vegetativa media. Rivero *et al.* (2001) en guanábano demostraron que los niveles de fenolización alta de la fuente media podrían deberse a que esta fuente recibe alta manipulación con relación a las demás, y posee dos cortes uno superior y otro inferior, por tanto presenta mayor tejido herido, siendo esta una de las causas de la liberación de fenoles y su oxidación (Pierik, 1990). Los brotes apicales laterales poseen menor contenido fenólico que los brotes apicales terminales, todos los brotes de babaco son laterales. Además la fuente apical recibió menor manipulación.

Al comparar las fuentes los explantes bajo el efecto de la fuente vegetativa basal presentaron menor contaminación bacteriana (Cuadro 5.2.1.12). La baja contaminación bacteriana de los explantes basales puede deberse a que éstos presentan mayor área para la absorción del desinfectante, en el cual permanecieron durante 1h. La bacteria es difícil eliminar mediante esterilización externa sencilla, puesto que es una bacteria endófito.

Los explantes bajo el efecto de la fuente apical presentaron menor amarillamiento, en comparación con las fuentes media y basal (Cuadro 5.2.1.12). El amarillamiento del explante generalmente se produce por una deficiencia nutricional, que puede deberse a la falta de los nutrientes necesarios en el medio a causa de la larga permanencia en el mismo medio, en este caso 21 días, siendo la recomendada 15 días hasta un máximo de 30 días (Roca y Mroginsky, 1991b). La fuente apical pudo ser favorecida porque ya tenía hojas formadas bajo invernadero, antes de la introducción, lo que le ayuda en la fotosíntesis (Salisbury y Ross, 2002©). A pesar que la tasa de actividad fotosintética *in vitro* es baja. Además, el amarillamiento pudo estar influenciado por la alta contaminación bacteriana, ya que los patógenos pudieron afectar en las funciones y desarrollo normal de las plantas (Agrios, 1995).

**Cuadro 5.2.1.13. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar de fenolización y contaminación bacteriana del explante para las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Auxinas</b>	<b>Fenolización</b>	<b>Contaminación Bacteriana</b>
<b>2,4 D</b>	0,8 $\pm$ 0,1 ab	5,2 $\pm$ 0,3 c
<b>AIA</b>	1,2 $\pm$ 0,2 b	1,2 $\pm$ 0,3 a
<b>ANA</b>	1,2 $\pm$ 0,1 b	3,4 $\pm$ 0,4 b
<b>TESTIGO</b>	0,4 $\pm$ 0,2 a	4,9 $\pm$ 0,6 c

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

El testigo (sin auxina) produjo menor cantidad de fenoles en el medio en relación a los tratamientos bajo el efecto de las auxinas (Cuadro 5.2.1.13). Los explantes bajo el efecto de

las auxinas AIA y ANA presentan el mayor nivel de fenolización, lo que concuerda con Krikorian (1991a), que indica que el AIA es sensible a la fotoxidación. Quintero *et al.* (2003), indican que a mayor concentración de auxinas, existe mayor fenolización.

La menor contaminación bacteriana se encontró bajo el efecto de la auxina AIA que con el resto de auxinas y el testigo (Cuadro 5.2.1.13). Ciertos reguladores de crecimiento tienen la capacidad de disminuir la contaminación que producen algunos patógenos sobre las plantas, este podría ser el papel del AIA en el presente ensayo, pero otros reguladores favorecen el estadio del patógeno en la planta, ya que los patógenos pueden producir reguladores de crecimiento e inhibidores similares a las plantas, ocasionando varias respuestas anormales en el desarrollo de la planta, hecho que facilitaría la infección (Agrios, 1995). Esto podría explicar también, los resultados en donde la auxina 2,4-D presenta mayor contaminación con respecto a las demás auxinas.

**Cuadro 5.2.1.14. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar de fenolización y contaminación bacteriana del explante para las dosis de las auxinas utilizadas en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

Dosis	Fenolización	Contaminación Bacteriana
<b>0,00</b>	0,4 $\pm$ 0,2 a	4,8 $\pm$ 0,6 c
<b>0,17</b>	1,2 $\pm$ 0,3 b	1,3 $\pm$ 0,5 a
<b>0,33</b>	0,8 $\pm$ 0,3 ab	1,2 $\pm$ 0,5 a
<b>0,50</b>	0,9 $\pm$ 0,2 ab	3,5 $\pm$ 0,4 b
<b>1,00</b>	1,2 $\pm$ 0,2 b	4,0 $\pm$ 0,5 bc
<b>1,50</b>	1,0 $\pm$ 0,2 b	4,6 $\pm$ 0,4 bc

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

La dosis del testigo (0,00 ppm) presentó menor fenolización en comparación a las demás dosis (Cuadro 5.2.1.14). Quintero *et al.* (2003), indican que a mayor concentración de auxinas, existe mayor fenolización en el medio.

Los explantes bajo el efecto de las dosis 0,17 y 0,33ppm presentaron el menor nivel de contaminación causada por bacterias que el resto de dosis aplicadas (Cuadro 5.2.1.14). Agrios (1995) indica que ciertos reguladores de crecimiento tienen la capacidad de disminuir la contaminación que producen algunos patógenos sobre las plantas, este podría ser el papel del AIA en el presente ensayo. Las dosis que presentaron el menor nivel de fueron 0,17 y 0,33ppm de AIA.

**Cuadro 5.2.1.15. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar de fenolización, contaminación bacteriana y amarillamiento del explante para los tratamientos en el medio de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

Tratamientos	Fenolización	Contaminación Bacteriana	Amarillamiento del explante
T <sub>1</sub> : Apical, AIA, 0,167ppm	0,6 $\pm$ 0,2 abcde	2,5 $\pm$ 0,8 abcd	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>2</sub> : Basal, AIA, 0,167ppm	1,8 $\pm$ 0,8 def	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>3</sub> : Media, AIA, 0,167ppm	2,0 $\pm$ 0,6 ef	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>4</sub> : Apical, AIA, 0,33ppm	0,6 $\pm$ 0,3 abcde	2,4 $\pm$ 0,8 abc	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>5</sub> : Basal, AIA, 0,33ppm	1,1 $\pm$ 1,0 abcdef	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>6</sub> : Media, AIA, 0,33ppm	1,0 $\pm$ 0,3 abcdef	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>7</sub> : Apical, AIA, 0,5ppm	1,4 $\pm$ 0,6 abcdef	2,3 $\pm$ 0,7 abc	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>8</sub> : Basal, AIA, 0,5ppm	0,8 $\pm$ 0,5 abcde	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,3 $\pm$ 0,3 ab
T <sub>9</sub> : Media, AIA, 0,5ppm	1,8 $\pm$ 0,4 def	2,4 $\pm$ 1,1 abc	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>10</sub> : Apical, ANA, 0,5ppm	0,6 $\pm$ 0,2 abcde	3,6 $\pm$ 1,1 bcd	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>11</sub> : Basal, ANA, 0,5ppm	1,3 $\pm$ 0,5 abcdef	3,9 $\pm$ 1,5 bcd	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>12</sub> : Media, ANA, 0,5ppm	2,3 $\pm$ 0,7 f	1,8 $\pm$ 1,0 ab	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>13</sub> : Apical, ANA, 1ppm	1,7 $\pm$ 0,3 cdef	2,5 $\pm$ 0,8 abcd	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>14</sub> : Basal, ANA, 1ppm	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>15</sub> : Media, ANA, 1ppm	1,8 $\pm$ 0,5 def	5,2 $\pm$ 1,2 bcd	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>16</sub> : Apical, ANA, 1,5ppm	0,4 $\pm$ 0,2 abcd	3,0 $\pm$ 0,7 abcd	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>17</sub> : Basal, ANA, 1,5ppm	0,0 $\pm$ 0,0 a	6,0 $\pm$ 0,9 d	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>18</sub> : Media, ANA, 1,5ppm	1,6 $\pm$ 0,4 bcdef	3,8 $\pm$ 1,1 bcd	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>19</sub> : Apical, 2,4 D, 0,5ppm	0,1 $\pm$ 0,1 a	5,7 $\pm$ 1,0 cd	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>20</sub> : Basal, 2,4 D, 0,5ppm	0,0 $\pm$ 0,0 a	5,0 $\pm$ 1,2 bcd	0,4 $\pm$ 0,2 b
T <sub>21</sub> : Media, 2,4 D, 0,5ppm	0,3 $\pm$ 0,1 abc	4,7 $\pm$ 1,1 bcd	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>22</sub> : Apical, 2,4 D, 1ppm	0,8 $\pm$ 0,3 abcde	5,6 $\pm$ 0,9 cd	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>23</sub> : Basal, 2,4 D, 1ppm	0,9 $\pm$ 0,4 abcdef	2,6 $\pm$ 1,3 abcd	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>24</sub> : Media, 2,4 D, 1ppm	0,9 $\pm$ 0,3 abcdef	5,7 $\pm$ 0,8 cd	0,2 $\pm$ 0,1 ab
T <sub>25</sub> : Apical, 2,4 D, 1,5ppm	0,2 $\pm$ 0,1 ab	5,6 $\pm$ 0,7 cd	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>26</sub> : Basal, 2,4 D, 1,5ppm	0,3 $\pm$ 0,3 abc	5,3 $\pm$ 1,8 cd	0,3 $\pm$ 0,3 ab
T <sub>27</sub> : Media, 2,4 D, 1,5ppm	2,3 $\pm$ 0,6 f	5,5 $\pm$ 0,7 cd	0,1 $\pm$ 0,1 a
T <sub>28</sub> : Apical, Testigo	0,0 $\pm$ 0,0 a	4,4 $\pm$ 0,9 bcd	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>29</sub> : Basal, Testigo	0,8 $\pm$ 0,8 abcde	2,8 $\pm$ 0,8 abcd	0,0 $\pm$ 0,0 a
T <sub>30</sub> : Media, Testigo	0,7 $\pm$ 0,3 abcde	5,7 $\pm$ 0,9 cd	0,1 $\pm$ 0,1 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

Los tratamientos que no produjeron fenoles durante la fase de multiplicación fueron T<sub>14</sub> (Fuente basal, ANA, 1,0 ppm), T<sub>17</sub> (Fuente basal, ANA, 1,5 ppm), T<sub>19</sub> (Fuente apical, 2,4D, 0,5 ppm), T<sub>20</sub> (Fuente basal, 2,4D, 0,5 ppm) y T<sub>28</sub> (Fuente apical, testigo) (Cuadro 5.2.1.15). Los tratamientos que no mostraron contaminación bacteriana fueron T<sub>2</sub> (Fuente basal, AIA, 0,167 ppm), T<sub>3</sub> (Fuente media, AIA, 0,167 ppm), T<sub>5</sub> (Fuente basal, AIA, 0,33 ppm), T<sub>6</sub> (Fuente media, AIA, 0,33 ppm), T<sub>8</sub> (Fuente basal, AIA, 0,5 ppm) y T<sub>14</sub> (Fuente basal, ANA, 1,0 ppm). El tratamiento que presentó el mayor valor numérico para el nivel de amarillamiento fue el T<sub>20</sub> (Fuente basal, 2,4D, 0,5 ppm).

Al analizar el porcentaje de mortalidad se encontró que los tratamientos T<sub>10</sub> (Fuente apical, ANA, 0,5ppm), T<sub>13</sub> (Fuente apical, ANA, 1ppm) y T<sub>27</sub> (Fuente media, 2,4D, 1,5ppm) presentaron un 25% de mortalidad, mientras los tratamientos T<sub>11</sub> (Fuente basal, ANA, 0,5ppm), T<sub>12</sub> (Fuente media, ANA, 0,5ppm) y T<sub>20</sub> (Fuente basal, 2,4D, 0,5ppm) presentaron 50% de mortalidad, sin embargo el tratamiento que presentó el mayor valor numérico para la mortalidad fue el T<sub>29</sub> (Fuente basal, testigo), mientras el resto de tratamientos no presentaron explantes muertos (Cuadro 5.2.1.16). Rivedo *et al.* (2001) reportan una alta mortalidad en los explantes más cercanos a la base, mientras los de mayor viabilidad fueron los intermedios, similares a los resultados obtenidos. Además la mortalidad pudo verse altamente influenciada por la contaminación bacteriana, lo que podría justificar la mortalidad en los diferentes tratamientos. Cabe resaltar que los explantes bajo el efecto de la auxina AIA no presentaron mortalidad, esto se debe a que en el presente estudio se utilizó dicha auxina en las dosis más bajas propuestas, que variaron de 0,167 a 0,5ppm.

**Cuadro 5.2.1.16. Porcentaje de mortalidad en la fase de multiplicación, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Tratamientos</b>	<b>Mortalidad %</b>
T <sub>1</sub> : Apical, AIA, 0,167ppm	0
T <sub>2</sub> : Basal, AIA, 0,167ppm	0
T <sub>3</sub> : Media, AIA, 0,167ppm	0
T <sub>4</sub> : Apical, AIA, 0,33ppm	0
T <sub>5</sub> : Basal, AIA, 0,33ppm	0
T <sub>6</sub> : Media, AIA, 0,33ppm	0
T <sub>7</sub> : Apical, AIA, 0,5ppm	0
T <sub>8</sub> : Basal, AIA, 0,5ppm	0
T <sub>9</sub> : Media, AIA, 0,5ppm	0
T <sub>10</sub> : Apical, ANA, 0,5ppm	25
T <sub>11</sub> : Basal, ANA, 0,5ppm	50
T <sub>12</sub> : Media, ANA, 0,5ppm	50
T <sub>13</sub> : Apical, ANA, 1ppm	25
T <sub>14</sub> : Basal, ANA, 1ppm	0
T <sub>15</sub> : Media, ANA, 1ppm	0
T <sub>16</sub> : Apical, ANA, 1,5ppm	0
T <sub>17</sub> : Basal, ANA, 1,5ppm	0
T <sub>18</sub> : Media, ANA, 1,5ppm	0
T <sub>19</sub> : Apical, 2,4 D, 0,5ppm	0
T <sub>20</sub> : Basal, 2,4 D, 0,5ppm	50
T <sub>21</sub> : Media, 2,4 D, 0,5ppm	0
T <sub>22</sub> : Apical, 2,4 D, 1ppm	0
T <sub>23</sub> : Basal, 2,4 D, 1ppm	0
T <sub>24</sub> : Media, 2,4 D, 1ppm	0
T <sub>25</sub> : Apical, 2,4 D, 1,5ppm	0
T <sub>26</sub> : Basal, 2,4 D, 1,5ppm	0
T <sub>27</sub> : Media, 2,4 D, 1,5ppm	25
T <sub>28</sub> : Apical, Testigo	0
T <sub>29</sub> : Basal, Testigo	100
T <sub>30</sub> : Media, Testigo	0

### **5.3. Establecimiento del explante en la fase de enraizamiento para la selección del medio adecuado y la dosis óptima de auxina**

Se realizó un análisis no paramétrico de los valores obtenidos para fenolización, contaminación fúngica, contaminación bacteriana, amarillamiento y número de raíces en relación a los dos medios, las dos auxinas, las tres dosis y tratamientos.

**Cuadro 5.3.1. Análisis de la varianza para el número de raíces, contaminación fúngica, contaminación bacteriana y amarillamiento del explante en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>F.V.</b>	<b>Número de raíces†</b>	<b>Contaminación fúngica†</b>	<b>Contaminación bacteriana†</b>	<b>Amarillamiento del explante†</b>
<b>Modelo</b>	<0,0001**	0,0002**	<0,0001**	<0,0001**
<b>Repeticiones</b>	0,0027 **	0,1320 <sup>ns</sup>	<0,0001**	<0,0001**
<b>Medio</b>	0,0093 **	0,0307*	<0,0001**	0,0111 *
<b>Auxinas</b>	0,0313 *	0,0206*	0,7829 <sup>ns</sup>	0,3578 <sup>ns</sup>
<b>Dosis</b>	0,2025 <sup>ns</sup>	0,1855 <sup>ns</sup>	0,0175 *	0,1019 <sup>ns</sup>
<b>Medio*Auxina</b>	0,1500 <sup>ns</sup>	0,0362*	0,3111 <sup>ns</sup>	0,0055 **
<b>Medio*Dosis</b>	0,0004 **	0,0490*	0,4260 <sup>ns</sup>	0,0280 *
<b>Auxina*Dosis</b>	0,0039 **	0,1104 <sup>ns</sup>	0,0427 *	0,1840 <sup>ns</sup>
<b>M * A * D</b>	0,0261 *	0,0270*	0,2761 <sup>ns</sup>	0,0995 <sup>ns</sup>

† Prueba no paramétrica

Al analizar el número de raíces bajo el efecto de los tratamientos en estudio se determinó efecto significativo para la interacción Medio\*Auxina\*Dosis ( $F_{2, 288} = 3,68$ ;  $p=0,0261$ ; Cuadro 5.3.1), efecto significativo alto para las interacciones Auxina\*Dosis ( $F_{2, 288} = 5,65$ ;  $p=0,0039$ ) y Medio\*Dosis ( $F_{2, 288} = 8,03$ ;  $p=0,0004$ ), además se encontró alta significación para los factores Medio ( $F_{1, 288} = 6,87$ ;  $p=0,0093$ ) y efecto significativo para el factor Auxina ( $F_{2, 288} = 3,51$ ;  $p=0,0313$ ).

Se encontró efecto significativo en la variable contaminación fúngica bajo el efecto de los tratamientos, para las interacciones Medio\*Auxina\*Dosis ( $F_{2, 288} = 3,66$ ;  $p=0,0270$ ; Cuadro 5.3.1), Medio\*Dosis ( $F_{2, 288} = 3,05$ ;  $p=0,0490$ ) y Medio\*Auxina ( $F_{2, 288} = 3,36$ ;  $p=0,0362$ ), además se encontró efecto significativo para los factores medio ( $F_{1, 288} = 4,71$ ;  $p=0,0307$ ) y auxina ( $F_{2, 288} = 3,91$ ;  $p=0,0206$ ).

Al analizar la contaminación bacteriana bajo el efecto de los factores en estudio se determinó que existe una interacción significativa para la interacción Auxina\*Dosis ( $F_{2, 288} = 3,19$ ;  $p=0,0427$ ; Cuadro 5.3.1), además se encontró alta significación para el factor

medio ( $F_{1,288} = 106,71$ ;  $p < 0,0001$ ) y efecto significativo para el factor dosis ( $F_{2,288} = 4,10$ ;  $p = 0,0175$ ).

Al analizar el nivel de amarillamiento bajo el efecto de los factores en estudio, se encontró diferencia significativa para la interacción Auxina\*Dosis ( $F_{2,288} = 3,62$ ;  $p = 0,0280$ ; Cuadro 5.3.1) y alta significación para la interacción Medio\*Auxinas ( $F_{2,288} = 5,30$ ;  $p = 0,0055$ ), además se encontró significación para el factor medio ( $F_{1,288} = 6,54$ ;  $p = 0,0111$ ).

**Cuadro 5.3.2. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de raíces, contaminación fúngica, contaminación bacteriana y amarillamiento del explante para el medio de cultivo en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007**

Medio	Número de raíces	Contaminación fúngica	Contaminación bacteriana	Amarillamiento del explante
CC	0,2 $\pm$ 0,1 b	0,2 $\pm$ 0,1 b	3,4 $\pm$ 0,3 b	0,3 $\pm$ 0,0 b
LQ	0,1 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,9 $\pm$ 0,2 a	0,2 $\pm$ 0,0 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0,05$

Al comparar los medios se encontró que el medio CC indujo el mayor número de raíces en la fase de enraizamiento (cuadro 5.3.2). El medio CC formulado por Cohen y Cooper (1982) formó mayor número de raíces, estos resultados pueden explicarse por la toxicidad, en condiciones *in vitro*, que provocan los iones amonio y la relación nitrato:amonio. El medio CC, tiene una única fuente baja de amonio, que es la caseína hidrolizada, por lo que presenta una relación 376:1, mientras el medio LQ (Quoirin y Lepoivre, 1977) tiene una relación de 17:1, lo que demuestra que el medio CC contiene menor cantidad de amonio, por tanto es menos probable que produzca toxicidad.

Al comparar los medios se encontró que los explantes bajo el efecto del medio LQ no presentaron contaminación fúngica (Cuadro 5.3.2). La contaminación fúngica presentada fue baja, según Rivero *et al.* (2001) que reporta que los valores de contaminación menores

al 16,6% son considerados bajos cuando se trabaja con frutales leñosos provenientes del campo. Las causas principales de contaminación fúngica pueden ser un deficiente protocolo de desinfección externo o mal uso de los instrumentos. La alta humedad y los medios líquidos facilitan la contaminación, una razón más que favorece la contaminación, ya que en la fase de enraizamiento, se utilizó un medio semi-sólido (agar  $4\text{g L}^{-1}$ ).

Los explantes bajo el efecto del medio LQ presentaron el menor nivel de contaminación bacteriana en comparación con los explantes del medio CC (Cuadro 5.3.2). La caseína hidrolizada favorece el establecimiento de patógenos (Roca y Mogrinsky, 1991b). La adición de caseína hidrolizada al medio CC, podría ser el factor que colabore en la contaminación del mismo; al medio LQ no se le adicionó caseína hidrolizada.

Al comparar los medios, los explantes que presentaron menor amarillamiento se encontraron bajo el efecto del medio LQ. El amarillamiento generalmente se produjo por una deficiencia nutricional, que puede deberse a la falta de nutrientes necesarios en el medio (Salisbury y Ross, 2002©). El amarillamiento pudo también haber sido provocado por la prolongada permanencia de los explantes en el medio de enraizamiento (42 días). Al comparar las fuentes de nitrógeno en los medios, el medio LQ tiene mayor cantidad en relación al medio CC, por esta razón es posible que los explantes se amarillen menos en el medio LQ. Los frascos en enraizamiento fueron cubiertos con papel aluminio estéril y plástico, el medio fue adicionado con carbón activado ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), lo que incrementó la oscuridad para los explantes en esta fase. La oscuridad pudo haber favorecido el amarillamiento de los explantes. Marulanda e Izasa (2004), observaron que explantes de heliconia en condiciones de oscuridad producen clorosis y disminuyen el crecimiento.

**Cuadro 5.3.3. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de raíces y contaminación fúngica para las auxinas utilizadas en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Auxinas</b>	<b>Número de raíces</b>	<b>Contaminación fúngica</b>
<b>ANA</b>	0,1 $\pm$ 0,0 ab	0,0 $\pm$ 0,0 a
<b>AIB</b>	0,2 $\pm$ 0,1 b	0,2 $\pm$ 0,1 b
<b>TESTIGO</b>	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

Los explantes bajo el efecto de la auxina AIB presentaron mayor número de raíces en comparación con la auxina ANA y el testigo (cuadro 5.3.3). Las auxinas ANA y AIB por su acción sobre la formación de raíces han sido utilizadas en el campo agrícola para el enraizamiento de estacas (Marassi, 2004©). Kumar *et al.* (1998), indican que en ausencia de reguladores de crecimiento los brotes no enraizan, y reporta que las auxinas ANA y AIA no son efectivas para enraizamiento, en cambio sugieren la adición al medio de AIB con una dosis de 2ppm, para obtener el mayor número de raíces en higo. Los resultados obtenidos en esta fase, indicaron que la auxina AIB presentó el mayor número de raíces.

Los explantes bajo el efecto de la auxina ANA y el testigo, no presentaron contaminación fúngica en comparación con la auxina AIB (Cuadro 5.3.3). La contaminación se pudo ver favorecida por algunas auxinas, y controlada por otras, ya que hongos, bacterias, virus, micoplasmas y nemátodos, son capaces de producir promotores e inhibidores de crecimiento, que alteren el desarrollo normal de la planta, de esta forma favorecen su permanencia en la planta (Agris, 1995). Este podría ser el caso de la auxina AIB, al favorecer el crecimiento del hongo.

**Cuadro 5.3.4. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de raíces, contaminación fúngica y contaminación bacteriana del explante para las dosis de las auxinas utilizadas en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007**

<b>Dosis</b>	<b>Número de raíces</b>	<b>Contaminación fúngica</b>	<b>Contaminación bacteriana</b>
<b>0</b>	0,0 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a	2,3 $\pm$ 0,6 ab
<b>0,5</b>	0,2 $\pm$ 0,0 b	0,1 $\pm$ 0,1 ab	2,4 $\pm$ 0,4 b
<b>1</b>	0,2 $\pm$ 0,1 b	0,2 $\pm$ 0,2 b	1,4 $\pm$ 0,3 a
<b>1,5</b>	0,1 $\pm$ 0,1 ab	0,0 $\pm$ 0,0 a	2,4 $\pm$ 0,4 ab

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

Las dosis 0,5 y 1ppm presentaron el mayor número de raíces para esta fase, en relación con la dosis 1,5 (ppm) y el testigo (0,0 ppm) (Cuadro 5.3.4). Quintero *et al.* (2003), reportan resultados satisfactorios para el número de raíces en *Dioscoreas* sp. producidas *in vitro*, con la adición al medio de ANA en una dosis de 0,9 ppm. Los mismos autores concluyen que a mayor cantidad de ANA en el medio mayor número de raíces, e incremento en la formación de callo y la oxidación. En los presentes resultados las dosis 0,5 y 1ppm formaron mayor número de raíces.

La dosis 1,5ppm y el testigo no presentaron contaminación a causa de hongos (Cuadro 5.3.4). La contaminación pudo ser favorecida por algunas auxinas, y controlada por otras. Ciertos hongos son capaces de producir promotores e inhibidores de crecimiento, que alteren el desarrollo normal de la planta, favoreciendo así su permanencia en la planta (Agrios, 1995). Este podría ser el caso de ciertas auxinas (AIB), que a mayor concentración favorecen el crecimiento del hongo, mientras otras lo controlan.

Al comparar las dosis se determinó que los explantes bajo el efecto de la dosis 1ppm presentó el menor nivel de contaminación bacteriana con respecto a las demás dosis y el testigo (0 ppm) (Cuadro 5.3.3). Ciertos reguladores de crecimiento favorecen el establecimiento de patógenos como hongos y bacterias, mientras otros controlan la

multiplicación de los mismos (Agrios, 2005). Este hecho podría explicar porque existe menor contaminación a mayor concentración de auxinas. Sin embargo, la bacteria se ve favorecida por la alta humedad existente en el medio para enraizamiento, ya que se utilizó un medio semi-sólido ( $4 \text{ g L}^{-1}$  de agar).

**Cuadro 5.3.5. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de raíces, contaminación fúngica, contaminación bacteriana y amarillamiento del explante para los tratamientos en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007**

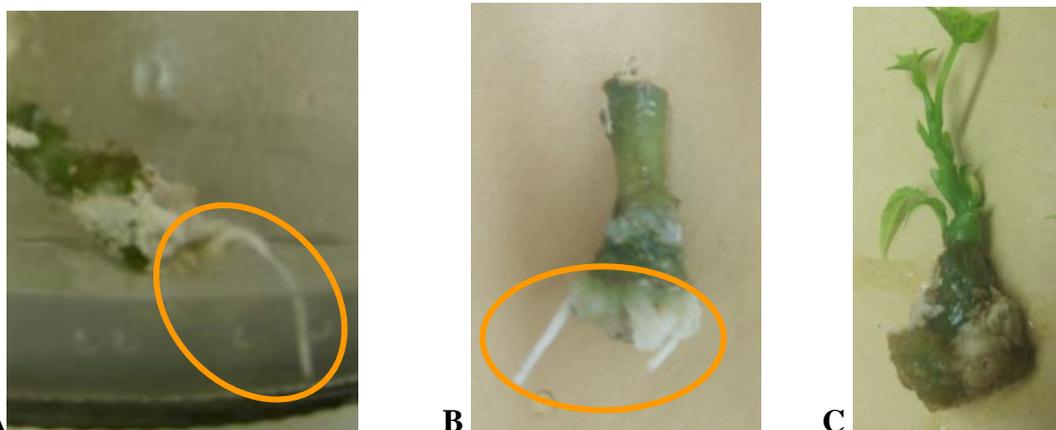
Tratamiento	Número de raíces	Contaminación fúngica	Contaminación bacteriana	Amarillamiento del explante
1: CC <sup>a</sup> , IBA, 0,5ppm	$0,3 \pm 0,1 \text{ ab}$	$0,5 \pm 0,3 \text{ a}$	$3,5 \pm 1,0 \text{ bc}$	$0,2 \pm 0,1 \text{ abc}$
2: CC <sup>a</sup> , IBA, 1ppm	$0,3 \pm 0,2 \text{ ab}$	$1,1 \pm 0,8 \text{ b}$	$3,6 \pm 1,0 \text{ bc}$	$0,5 \pm 0,1 \text{ cd}$
3: CC <sup>a</sup> , IBA, 1,5ppm	$0,4 \pm 0,2 \text{ bc}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$3,9 \pm 0,9 \text{ bc}$	$0,2 \pm 0,1 \text{ abc}$
4: CC <sup>a</sup> , ANA, 0,5ppm	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,6 \pm 1,0 \text{ bc}$	$0,4 \pm 0,1 \text{ bcd}$
5: CC <sup>a</sup> , ANA, 1ppm	$0,6 \pm 0,2 \text{ c}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$1,8 \pm 0,6 \text{ ab}$	$0,24 \pm 0,1 \text{ abc}$
6: CC <sup>a</sup> , ANA, 1,5ppm	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$4,0 \pm 0,9 \text{ c}$	$0,1 \pm 0,1 \text{ ab}$
7: LQ <sup>b</sup> , IBA, 0,5ppm	$0,3 \pm 0,1 \text{ ab}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,6 \pm 0,4 \text{ a}$	$0,3 \pm 0,1 \text{ abcd}$
8: LQ <sup>b</sup> , IBA, 1ppm	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,4 \pm 0,2 \text{ a}$	$0,05 \pm 0,5 \text{ a}$
9: LQ <sup>b</sup> , IBA, 1,5ppm	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,1 \pm 0,1 \text{ a}$	$0,8 \pm 0,4 \text{ a}$	$0,3 \pm 0,1 \text{ abcd}$
10: LQ <sup>b</sup> , ANA, 0,5ppm	$0,1 \pm 0,1 \text{ ab}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$2,1 \pm 0,4 \text{ abc}$	$0,3 \pm 0,1 \text{ abcd}$
11: LQ <sup>b</sup> , ANA, 1ppm	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,6 \pm 0,2 \text{ a}$	$0,2 \pm 0,1 \text{ abc}$
12: LQ <sup>b</sup> , ANA, 1,5ppm	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,8 \pm 0,5 \text{ a}$	$0,2 \pm 0,1 \text{ abc}$
13: CC <sup>a</sup> Testigo	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$3,4 \pm 0,9 \text{ bc}$	$0,6 \pm 0,1 \text{ d}$
14: LQ <sup>b</sup> Testigo	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$	$1,3 \pm 0,6 \text{ a}$	$0,1 \pm 0,1 \text{ ab}$

<sup>a</sup> Medio Cohen y Cooper (1982)

<sup>b</sup> Medio Quoirin y Lepoivre (1977)

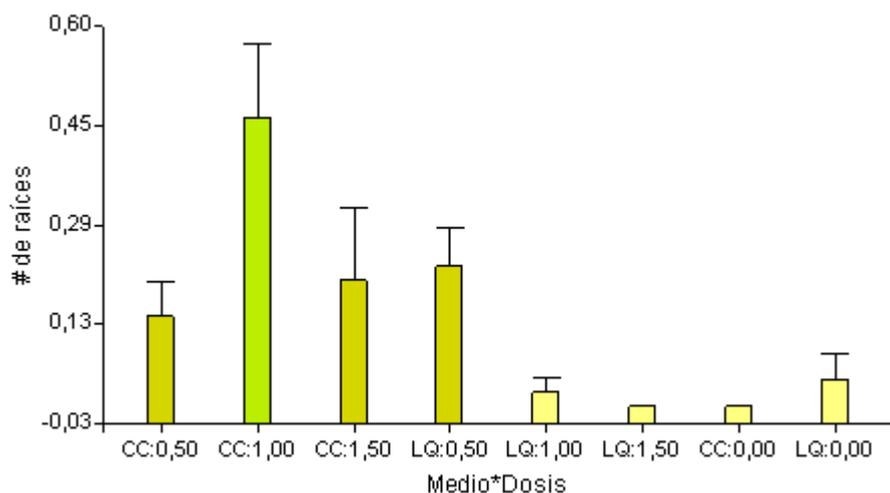
Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0,05$

El tratamiento que presentó el mayor número de raíces fue el T<sub>5</sub> (Medio CC, ANA, 1ppm).



**Figura 5.3.1. A) T2 con una raíz, B) T3 con dos raíces y C) T11 sin raíces, IASA 1, Ecuador, 2007**

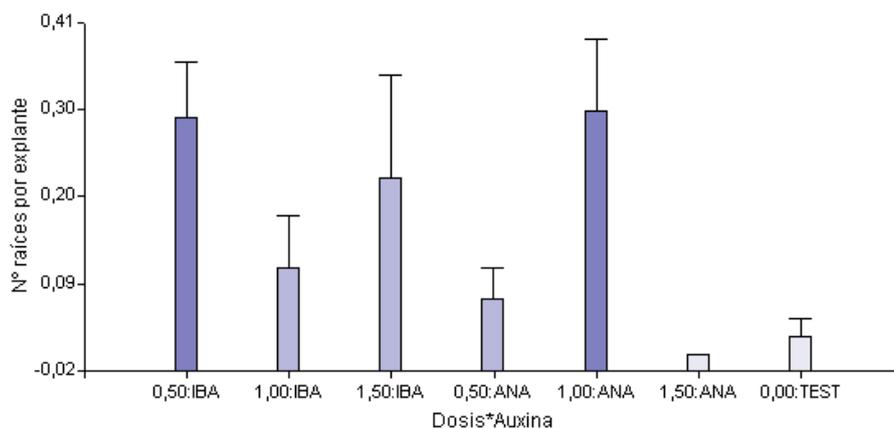
Al analizar la Figura 5.3.2 se puede establecer que la interacción Medio\*Dosis, que presenta una tendencia estadísticamente significativa, para el mayor valor numérico para la formación del número de raíces, fue la interacción el medio CC (Cohen y Cooper, 1982) con una dosis de 1ppm.



CC: Medio Cohen y Cooper (1982); LQ: Medio Quoirin y Lepoivre (1977). Dosis: 0,5ppm; 1ppm; 1,5ppm y 0ppm

**Figura 5.3.2. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de raíces formadas por efecto de la interacción Medio\*Dosis, IASA 1, Ecuador, 2007**

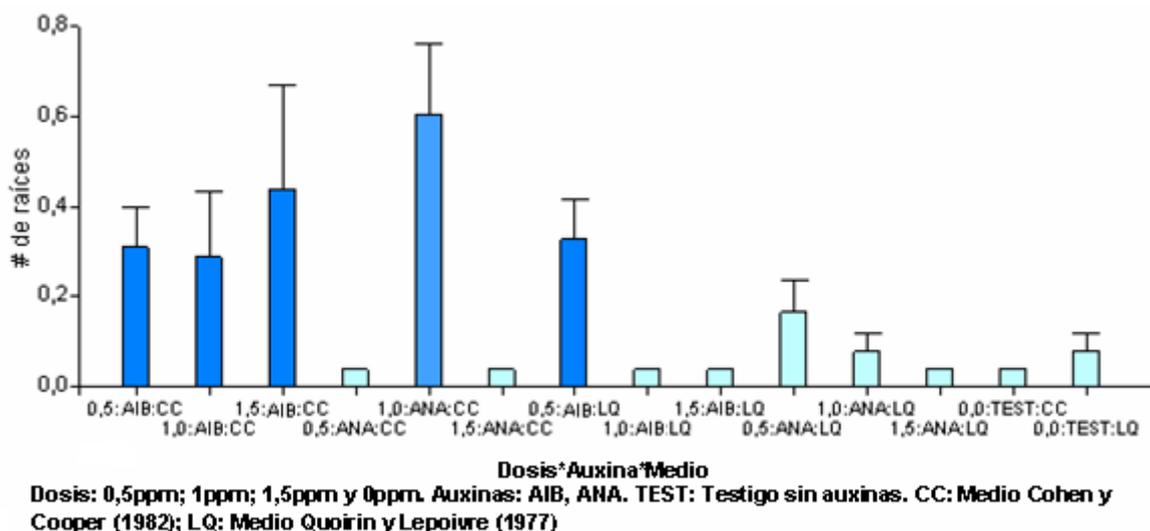
Al analizar la Figura 5.3.3 se puede encontrar una tendencia estadísticamente significativa para las interacciones: auxina AIB con una dosis de 0,5ppm y auxina ANA con una dosis de 1ppm, para el mayor valor numérico para la formación del número de raíces.



Dosis: 0,50ppm; 1,00ppm; 1,50ppm, 0,0ppm. Auxinas: IBA; ANA. TEST: Testigo sin auxinas

**Figura 5.3.3. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de raíces formadas por efecto de la interacción Dosis\*Auxina, IASA 1, Ecuador, 2007**

Al analizar la Figura 5.3.4 se puede que establecer la interacción Medio CC, auxina ANA y dosis 1,0ppm muestra una tendencia estadísticamente significativa, para el mayor valor numérico para la formación del número de raíces.



**Figura 5.3.4. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del número de raíces formadas por efecto de la interacción Dosis\*Auxina\*Medio, IASA 1, Ecuador, 2007**

El tratamiento que presentó contaminación causada por hongos fue el T<sub>2</sub> (Medio CC, AIB, 1ppm), en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 5.3.5).

Los tratamientos que presentaron el menor nivel de contaminación bacteriana con respecto a los demás tratamientos, fueron T<sub>7</sub> (Medio LQ, IBA, 0,5ppm), T<sub>8</sub> (Medio LQ, IBA, 1ppm), T<sub>9</sub> (Medio LQ, IBA, 1,5ppm), T<sub>11</sub> (Medio LQ, ANA, 1ppm), T<sub>12</sub> (Medio LQ, ANA, 1,5ppm) y T<sub>14</sub> (Medio LQ, testigo).

El tratamiento que presentó menor nivel de amarillamiento en la fase de enraizamiento fue T<sub>8</sub> (Medio LQ, AIB, 1ppm).

**Cuadro 5.3.6. Porcentaje de enraizamiento y mortalidad de los explantes de babaco, para los tratamientos en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007**

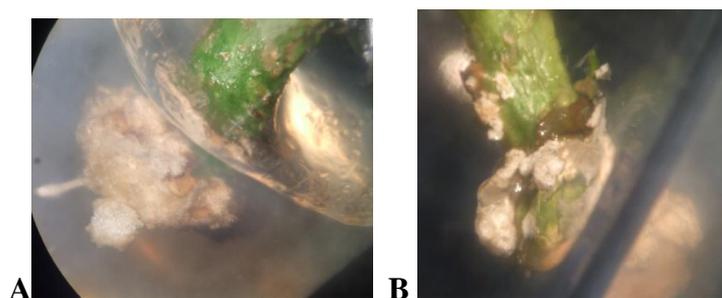
<b>Tratamiento</b>	<b>Enraizamiento %</b>	<b>Mortalidad %</b>
<b>1:</b> CC <sup>a</sup> , IBA, 0,5ppm	25	25
<b>2:</b> CC <sup>a</sup> , IBA, 1ppm	25	0
<b>3:</b> CC <sup>a</sup> , IBA, 1,5ppm	25	25
<b>4:</b> CC <sup>a</sup> , ANA, 0,5ppm	0	25
<b>5:</b> CC <sup>a</sup> , ANA, 1ppm	50	50
<b>6:</b> CC <sup>a</sup> , ANA, 1,5ppm	0	0
<b>7:</b> LQ <sup>b</sup> , IBA, 0,5ppm	25	50
<b>8:</b> LQ <sup>b</sup> , IBA, 1ppm	0	25
<b>9:</b> LQ <sup>b</sup> , IBA, 1,5ppm	0	0
<b>10:</b> LQ <sup>b</sup> , ANA, 0,5ppm	25	25
<b>11:</b> LQ <sup>b</sup> , ANA, 1ppm	0	50
<b>12:</b> LQ <sup>b</sup> , ANA, 1,5ppm	0	50
<b>13:</b> CC <sup>a</sup> Testigo	0	25
<b>14:</b> LQ <sup>b</sup> Testigo	0	25

<sup>a</sup> Medio Cohen y Cooper (1982)

<sup>b</sup> Medio Quoirin y Lepoivre (1977)

El tratamiento que presentó mayor porcentaje de enraizamiento, fue el T<sub>5</sub> (Medio CC, ANA, 1ppm) con un 50% de enraizamiento, seguido por un enraizamiento del 25% en los tratamientos T<sub>1</sub> (Medio CC, AIB, 0,5ppm), T<sub>2</sub> (Medio CC, AIB, 1ppm), T<sub>3</sub> (Medio CC, AIB, 1,5ppm), T<sub>7</sub> (Medio LQ, AIB, 0,5ppm) y T<sub>10</sub> (Medio LQ, ANA, 0,5ppm); mientras los demás tratamientos no presentan enraizamiento (Cuadro 5.3.6). Los resultados indican que el mayor porcentaje de enraizamiento se obtiene con el medio CC (Cohen y Cooper, 1982), siendo ANA la auxina con mayor porcentaje de enraizamiento y AIB la auxina con mayor frecuencia de enraizamiento. Esto se debe a que la auxina AIA favorece la formación de raíces, Jordan y Velozo (1997), reportan que las yemas axilares de babaco solo inician el enraizamiento en presencia de la auxina AIB en una concentración de 6,15ppm. Hepaskoy y Aksoy (2006) coinciden al reportar el mayor porcentaje de enraizamiento en higo, en el medio MS adicionado con 6,15 ppm de AIB, más no se encontraron diferencias significativas con la adición de AIB o ANA, además obtuvieron menor porcentaje de enraizamiento para los medios adicionados con AIB o ANA en dosis

menores a 0,123ppm o superiores a 12,3ppm. Ellos también señalan que el efecto del tipo de auxina sobre el enraizamiento no tubo significancia. Es importante recalcar que una relación baja de citocinina:auxina favorece la formación de raíces (Lizt, 1991), la dosis recomendada por Martínez y Tafur (2002) para la obtención de plantas completas de babaco *in vitro*, es 1,125:1., mientras Jordan y Velozo (1997) recomiendan para enraizamiento una relación 6,5:1. En el presente estudio no se utilizaron citocininas para enraizamiento.



**Figura 5.3.5. A) Explante enraizado por efecto del T7 y B) No enraizado por el efecto del T4, observados bajo el microscopio estereoscópico (10x), IASA 1, Ecuador, 2007**

Al analizar el porcentaje de mortalidad bajo el efecto de los factores en estudio se encontró que los tratamientos T<sub>2</sub> (Medio CC, AIB, 1ppm), T<sub>6</sub> (Medio CC, ANA, 1,5ppm) y T<sub>9</sub> (Medio LQ, AIB, 1,5ppm) no presentaron mortalidad, seguidos por los tratamientos T<sub>1</sub> (Medio CC, AIB, 0,5ppm), T<sub>3</sub> (Medio CC, AIB, 1,5ppm), T<sub>4</sub> (Medio CC, ANA, 0,5ppm), T<sub>8</sub> (Medio LQ, AIB, 1ppm), T<sub>10</sub> (Medio CC, ANA, 0,5ppm), T<sub>13</sub> (Medio CC, testigo) y T<sub>14</sub> (Medio LQ, testigo) con un 25% de mortalidad; mientras que el resto de tratamientos presentó un 50% de mortalidad (Cuadro 5.3.6). El porcentaje de mortalidad pudo estar influenciado por el tipo de explante, amarillamiento del explante y la contaminación, factores que pudieron haber afectado en la supervivencia de los explantes en esta fase. Rivero *et al.* (2001) encontraron alta mortalidad cuando hay alta contaminación. Hepaksoy y Aksoy (2006), reportan para el cultivo *in vitro* de higo, un porcentaje de mortalidad promedio del 24%, en el medio adicionado con AIB (0,01 ppm), GA<sub>3</sub> (0,01 ppm) y BA

(0,05 ppm), porcentaje similar a los resultados encontrados con la adición de esta auxina en el presente estudio.

**Cuadro 5.3.7. Promedio ( $\pm$ ) del error estándar del porcentaje de enraizamiento y número de raíces para las dosis de las auxinas utilizadas en la fase de enraizamiento, IASA 1, Ecuador, 2007**

Dosis	Porcentaje Enraizamiento	Número raíces
<b>0</b>	00 $\pm$ 0,0 a	0,0 $\pm$ 0,0 a
<b>0,5</b>	20 $\pm$ 0,0 b	0,2 $\pm$ 0,0 b
<b>1</b>	20 $\pm$ 0,0 b	0,2 $\pm$ 0,1 b
<b>1,5</b>	00 $\pm$ 0,0 a	0,1 $\pm$ 0,1 ab

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

La dosis óptima de auxina para el porcentaje de enraizamiento y número de raíces se determinó mediante la discriminación de medias de la prueba de Duncan al 5%. Las dosis 0,5 y 1ppm formaron el mayor número de raíces (Cuadro 5.3.7).

Al analizar la Figura 5.3.3 se observó que las interacciones Dosis\*Auxina que muestra un tendencia estadísticamente significativa para la obtención del mayor número de raíces por explante fueron ANA 1ppm y AIB 0,5ppm.

## VI. CONCLUSIONES

El protocolo de desinfección con el que se obtuvieron los menores porcentajes de contaminación, tanto fúngica como bacteriana, y el menor porcentaje de mortalidad, fue el T<sub>16</sub> (jabón líquido + yodo + Benlate 1g L<sup>-1</sup> + hipoclorito de sodio 20% + Bioper 1h + ácido acético 3ml L<sup>-1</sup> por 1h), obteniéndose apenas 3,03% de contaminación bacteriana, sin contaminación fúngica, ni mortalidad. Debido a los problemas de contaminación durante la fase de introducción, se caracterizó la bacteria por lo que se determinó que pertenece al género *Erwinia*.

De las tres fuentes vegetales de babaco, las fuentes vegetativas basal y media permitieron obtener el mayor número de brotes durante la fase de multiplicación. De las tres auxinas evaluadas, en la fase de multiplicación, el AIA favoreció la mayor formación de brotes por explante. Los tratamientos que presentaron el mayor número de brotes por explante fueron el T<sub>2</sub> (Fuente basal, AIA, 0,167ppm) y el T<sub>17</sub> (Fuente basal, ANA, 1,5ppm), con promedios de 2 brotes por explante de babaco, para los dos tratamientos. La dosis óptima de auxinas que permitió obtener el mayor número de brotes por explante fue 0,167ppm de AIA.

El medio CC (Cohen y Cooper, 1982) fue el más adecuado para la formación de raíces en la fase de enraizamiento. Tanto el AIB como ANA favorecieron en la formación de raíces y porcentaje de enraizamiento de los explantes. Los tratamientos con auxinas siempre fueron superiores al testigo, por lo que la adición de auxinas como AIB o ANA al medio de enraizamiento favorece a la formación de raíces en babaco. Con el tratamiento T<sub>5</sub> (Medio CC, ANA, 1ppm) se obtuvo el mayor porcentaje de enraizamiento en esta fase, con 50% de explantes con raíces. Las dosis que presentaron el mayor enraizamiento fueron 0,5 y 1ppm de AIB y ANA.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Se recomienda el uso de peróxido de hidrógeno + ácido acético para protocolos de desinfección en babaco, por contaminación endógena.

Para obtener el mayor número de brotes en la fase de multiplicación se recomienda el uso de: fuentes vegetativas media y basal, auxina AIA con dosis de 0.167ppm.

En la fase de enraizamiento de babaco se recomienda el uso del medio Cohen y Cooper, la adición de auxinas tanto AIB como ANA, con dosis de 0,5 a 1,0ppm.

### VIII. RESUMEN.

El babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv *BABACO*) es una planta originaria del Ecuador, que presenta altas expectativas para el productor nacional, sobretodo para la exportación a países europeos. Sin embargo, por ser un fruto partenocárpico, su único sistema de propagación es asexual lo que facilita la diseminación de enfermedades internas y la pérdida de variabilidad del cultivo, grave problema para la producción nacional. El presente estudio tuvo como finalidad incrementar el número de brotes de babaco *in vitro* mediante la interacción de reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas completas.

El ensayo se enfocó en obtener un protocolo de desinfección eficiente para el control de bacterias principalmente endófitas, en el cual se probaron diferentes productos para la desinfección, siendo el peróxido de hidrógeno y ácido acético en conjunto, los que presentaron los resultados más satisfactorios, con una contaminación bacteriana del 3% y no presencia de contaminación fúngica, ni mortalidad. Además se determinó la auxina y su dosis para obtener el mayor número de brotes, para lo que se introdujeron explantes de babaco en el medio Cohen y Cooper (1982) adicionado con BA 1ppm durante 21 días, obteniéndose los mayores resultados con los tratamientos T<sub>2</sub> (Fuente basal, AIA, 0,167ppm) y T<sub>17</sub> (Fuente basal, ANA, 1,5ppm), con promedios de 2 brotes por explante de babaco. Finalmente se estableció el medio, auxina y dosis para la fase de enraizamiento, para esto los explantes de la fase de multiplicación pasaron a los medios de enraizamiento de forma aleatoria, donde permanecieron 42 días. El tratamiento T<sub>5</sub> (Medio CC, ANA, 1ppm) presentó el mayor porcentaje de enraizamiento, con un 50% de explantes con raíces.

## IX. SUMMARY

Babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv *BABACO*) is a native Ecuadorian plant, it presents good expectations for the national producer, overalls for exporting to European countries. Besides is seedless fruit, only can be propagate by asexual system, this system helps to disseminate internal illnesses and lost the genetic variability of the crop, it results a big problem for the national production. The objectives of the present investigation were to increase the number of buds of babaco *in vitro* using the interaction of growth regulators for the regeneration of complete plants.

The first part of the researching was to obtain a efficient protocol of disinfection, mainly to control of internal bacterium, in this phase different products were proven for the disinfection, the action of the hydrogen peroxide plus acetic acid, showed the best results, with a bacterial contamination of 3% and didn't present fungus contamination, neither mortality. Also, it was determined the best auxin and their concentrations to obtain the major number of buds, for it babaco shoots were introduced in Cohen and Cooper (1982) medium added with BA 1ppm during 21 days, the treatments showed the best results were T2 (basal source, AIA, 0,167ppm) and T17 (basal source, ELL, 1,5ppm) with averages of 2 buds for babaco shoot. Finally it was established the best medium, auxin and concentrations for the rooting phase, for this the shoots of multiplication phase passed to rooting medium in an aleatory way, where they stayed 42 days, the treatment T5 (CC medium, ANA, 1ppm) presented the best rooting percentage in this phase, with 50 % of rooting shoots.

## X. BIBLIOGRAFÍA.

**Agrios, G. 1995.** Plant pathology. third ed. Department of Plant Pathology. University of Florida. United States of America. 532p.

**Angarita, A. y Perea, M. 1991.** Micropropagación de plátanos y papayas, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 495-512 p.

**Auge, R. Beauchesne, G. Bocón-Gibod, J. Decourtye, L. Digat, B. Galandrin, C. Minier, R. Morand, C. Vidalie, H. 1984.** La culture in vitro. Technique et Documentation (Lavoisier), Paris. 151 p.

**Badillo, VM. 2000.** *Carica* L. vs. *Vasconcellea* St.-Hil. (Caricaceae) con la Rehabilitación de este último. *Ernstia* 10(2): 74-79.

**Barrueto, L. y Jordan, M. 2006.** A Contaminação In Vitro de Plantas (en línea). Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF. Consultado 5 feb. 2007. Disponible en: [http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/B\\_P\\_122.pdf](http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/B_P_122.pdf).

**BioMérieux, 2002.** Sistema de Identificación de *Enterobacteriaceae* y otros Gram negativos no exigentes. Ref 20 100/ 20 160.

**Cacioppo, O. 1987.** Il babaco manuale pratico. Ed. Reda. Italia. 12-23p.

**Camacho, B. y Rodríguez, V. 1982.** El cultivo Comercial del Babaco (*Carica pentagona* Heilb) en Ecuador. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP. Quito – Ecuador. 1-4, 7p.

**Cañizares, D. 1998.** Regeneración de Caricaceas (*Carica pentagona*) por métodos de micropropagación. *Tesis*. Ingeniero Agropecuario. Sangolquí - Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias -IASA de la Escuela Politécnica del Ejército.

**Chávez, A. 2006.** Injertación de babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv. *babaco*) en papaya (*Vasconcellea papaya*) para la producción de plantas con tolerancia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae*. *Tesis*. Ingeniero Agropecuario. Sangolquí - Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias -IASA de la Escuela Politécnica del Ejército.

**Cohen, D. y Cooper, P. 1982.** Micropropagation of Babaco, a *Carica* hybrid from Ecuador. Proc. 5<sup>th</sup> Intl. Cong. Plant Tissue Cell Culture. Tokio.

**Cossio, F. 1987.** Atti del 1° convegno nozionale sul babaco. Instituto Sperimentale di Frutticoltura Amministrazione Provinciale di Verona. 24, 26-28p

**Ellena, M. 1998.** Aspetti fisiological e biochimici associati al processo rizogenético del Castagno da frutto e Nocciolo. Universidad de Bologna. Departamento de Cultivos Arbóreos. Italia. 157 p.

**Enriquez, G. Fuentes, A. Selman-Housein, G. Tellez, P. Soto, N. Perez, M. y Oramas, P. 1997.** Efecto de diferentes métodos de cultivo sobre la regeneración *in vitro* de papa

(*Solanum tuberosum* L.) de la variedad comercial Chieftain. *Biotecnología Aplicada* 1997  
Volume 14 No. 3, pp. 181-184

**Evans, D. Sharp, W. y Flick, C. 1981.** Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T. (ed.). *Planta tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, Nueva York. P. 45-114.

**Fabara, J. Bermeo, N. y Barberán, C. 1985.** Manual del cultivo del babaco. Universidad técnica de Ambato, Consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT). Quito – Ecuador. 104 p.

**Falconí, C. Landázuri, P. Yáñez, V. Giacometti, J. Oleas, A. Soria, N. Taco, M. Cueva, D. y Chávez, A. 2006.** Alternativas biotecnológicas para la producción de plantas libres de la marchitez vascular del babaco *Vasconcellea heilborni*. Producción Científica ESPE – 2005. Quito, Ecuador. 20-21p

**Fernando, J. Melo, M. Soares, K. y Appezzato-da-Glória, B. 2001.** Anatomy of Somatic Embryogenesis in *Carica papaya* L. Departamento de Ciências Biológicas/ESALQ/USP. Piracicaba-SP, Brazil. *Brazilian archives of biology and technology*. Vol. 44, pp 247-255

**Fontúrbel, F. 2002.** Micropropagación de un cultivo perenne (en línea). El portal de Biología y Ciencias de la Salud. Consultado el 24 ago. 2006. Disponible en: [www.biologia.org/?pid=5000&page=0&id=47.pdf](http://www.biologia.org/?pid=5000&page=0&id=47.pdf)

**Galarza, V. 2002.** Reacción de diferentes especies de Caricáceas a *Fusarium oxysporum* y su Afinidad como Patrón de Babaco, Tesis para la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central .

**Galston, A. 1964.** The life of the green plant. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. N.J.

**García, F. 2004.** Fitorreguladores (en línea). Universidad Politécnica de Valencia. Consultado el 9 oct. 2007. Disponible en: [http://academicos.cualtos.udg.mx/Agroindustrias/Pagina\\_Fv/Lecturas/UPV\\_Fitoreguladores.htm](http://academicos.cualtos.udg.mx/Agroindustrias/Pagina_Fv/Lecturas/UPV_Fitoreguladores.htm)

**Gardan, L. Christen, R. Achouak, W y Prio P. 2004.** *Erwinia papayae* sp. nov., a pathogen of papaya (*Carica papaya*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2004), 54, 107–113

**Gargia, J. 1991.** Fitohormonas: Tratamientos hormonales en frutales. Fruticultura profesional, N° 37. España. 18-29 p.

**George, E y Sherrington, P.1984.** Plant Propagation by Tissue Culture. 1ª ED. London, Hand book and directory of comercial Laboratories. 309 p.

**George, E. 1986.** Plant propagation by Tissue Culture. Part 2. Exegetics Ltd. England. 1050p.

**Gispert, E. Cantillo, E. Rivero, A. y Oramas, B. 1998.** Crema dental con manzanilla, efecto estomatológico (en línea). Centro Provincial de Investigaciones Estomatológicas.

Ciudad de La Habana-Cuba. Consultado 9 nov. 2007. Disponible en: [scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75071998000300007&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75071998000300007&script=sci_arttext&tlng=es)

**González, S. 2003.** Tema 5: Medios de cultivo (en línea). Departamento de Biología vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Consultado el 10 oct. 2006. Disponible en: <http://fbio.uh.cu/webfv/docencia/tema5.doc>

**Gutiérrez, A. Santacruz, F. Cabrera, J. y Rodríguez, G. 2003.** Mejoramiento genético vegetal in vitro. Universidad de Guadalajara. Guadalajara – México. e-Gnosis [online]. Vol.1 Art.4. Consultado el 21 sep. 2007. Disponible en: [www.e-gnosis.edg.mx/vol1/art4](http://www.e-gnosis.edg.mx/vol1/art4)

**Guzman, G. 1998.** *Carica papaya* Caricaceae (en línea). San José, Costa Rica. Dirección General de Mercadeo Agropecuario, MAG. Consultado el 06 jul 2006. Disponible en: [http://www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/tec\\_papaya.pdf](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_papaya.pdf)

**Hartmann, T. and Kester, D. 1997.** Plant Propagation: Principles and practices. Prentice Hall, New Jersey. 820 p.

**Henríquez, E. 2004.** Evaluación de tres factores de enraizamiento en estacas de morera (*Morus alba*). Tesis. Ingeniero Agrónomo. Santiago - Chile. Facultad de Ciencias Agrónomas. Escuela de Agronomía. Universidad de Chile.

**Hepaksoy, S y Aksoy, U. 2006.** Propagation of *Picus carica* l: clones by *in vitro* culture. Departamente of horticulture, Faculty of Agriculture, EgeUniversity, Izmir-Turkey. *Biologia plantarum* 50(3): 433-436

**Holt, J. 1977.** The Shorter Bergey's Manual of Determinate Bacteriology. Fight edition. Edición Williams & Wilkins Company. United States of America. 123-126p

**Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2003©.** Banco de germoplasma (en línea). Estación Experimental Agropecuaria Pergamino, Buenos Aires – Argentina. Consultado el 21 sep 2007. Disponible en: [www.inta.gov.ar](http://www.inta.gov.ar)

**Jordan, N. y Goreaux, A. 1990.** Perspectivas de cultivo *in vitro* en células y tejido vegetal. 133 p.

**Jordan, M. y Velozo, J. 1997.** *In vitro* propagation of highlands papayas (*Carica pubescens* and *C. pentagona*). Pontificia Universidad Católica de Chile, Hort.Biotech. In Vitro Cult. And Breeding. Acta Hort. 447, ISHS. 103 – 106p.

**Kenneth, G. y Torres, C. 1989.** Tissue culture techniques for horticultural crops. Published by Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 285 p.

**Krikorian, A. 1991a.** Medios de cultivo. Generalidades, composición y preparación, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 41-78 p.

**Krikorian, A. 1991b.** Propagación clonal *in vitro*, in Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 95-126 p.

**Kumar, V. Radha, A. y Kumar S. 1998.** In vitro plant regeneration of fig (*Ficus caracal.* cv. gular) using apical buds from mature trees. Department of Biochemistry, Sri Krishnadevaraya University, Anantapur-India. Plant Cell Reports (1998) 17:717-720

**Lindsey, D. y Brown, A. 2006,** Universality of color names (en línea). Department of Psychology, Ohio State University and College of optometry and Graduate Program in Vision Science, Ohio State University. Consultado el 5 de Junio del 2007. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/content-nw/full/103/44/16608/F1>.

**Litz, R. 1991.** Cultivo de embriones y óvulos, in Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 295-312p.

**López, C. 1996.** Vitrificación de plantas cultivadas *in vitro* (en línea). Encuentros en la Biología, ISSN 1134-8496, N°.28. Malaga-España. Consultado 25 sep. 2007. Disponible en: [www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS28/28vitrificacion.html](http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS28/28vitrificacion.html)

**López, L. Romero, J. y Ureta, F. 2002.** Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos (en línea). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago de Chile. Consultado el 9 nov.

2007. Disponible en: [http://www.alanrevista.org/ediciones/2002-1/accion\\_germicida\\_in\\_vitro\\_productos\\_desinfectantes\\_industria\\_alimentos.asp](http://www.alanrevista.org/ediciones/2002-1/accion_germicida_in_vitro_productos_desinfectantes_industria_alimentos.asp)

**Macdonald, B. 1990.** Practical woody plant propagation for nursery growers. London – Great Britain. Vol.1 669 p.

**Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). 2001.** Babaco Mountain Papaya (en línea). Quito, Ecuador. Consultado el 15 may. 2006. Disponible en: [www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/babaco\\_mag.pdf](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/babaco_mag.pdf)

**Margara, J. 1986.** Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundiprensa. Madrid, España. 230 p.

**Marassi, M. 2004©.** Hormonas vegetales (en línea). Universidad Nacional del Noroeste. Facultad de Agroindustrias y Facultad de Ciencias Agrarias. República Argentina. Consultado el 04 feb. 2007. Disponible en: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/hormona.htm>

**Martínez, W. y Tafur, V. 2002.** Comportamiento de explantes de babaco (*Carica pentagona Heilborn*) *in vitro* frente a tres concentraciones de auxinas, citocininas y dos niveles de azúcar. Universidad Central del Ecuador. Revista Rumipamba. Vol. XVI – N° 1/2002. Quito – Ecuador. 104, 105 p.

**Marulanda, M. e Izasa, L. 2004.** Establecimiento in vitro de Heliconias con fines de producción masiva. *Scientia et Technica* Año X, No 26, Diciembre 2004. UTP. ISSN 0122-1701. p. 193-197.

**Merino, D. 1989.** El cultivo de babaco. Ed. Mundi-Prensa. Madrid – España. 59p

**Ministerio de Agricultura y Ganaderia (MAG). 2001.** Babaco Mountain Papaya (en línea). Quito, Ecuador. Consultado el 15 may. 2006. Disponible en: [www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/babaco\\_mag.pdf](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/babaco_mag.pdf)

**Morales, A. Medina, D. y Yaguachi, B. 2004.** Diversidad genética filogenética y distribución geográfica del genero *Vasconcellea* en el Sur de Ecuador (en línea). *Lyonia*, Volumen 7(2), Pages [15-27], December 2004. Consultado el 20 nov. 2007. Disponible en: <http://www.lyonia.org/downloadPDF.php?pdfID=2.241.1>

**Muñoz, S. 2003.** Embriogénesis somática en Cedro (*Cederla odorata* Linnaeus) a partir de cotiledones. *Tesis*. Bióloga. Lima – Perú. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina.

**Murashige, T. 1974.** Plant Propagation Throught tissue culture. *Ann. Rev. Plant. Physiology*. 25: 136-137.

**Murashige, T. y Skoog, F. 1962.** Arevised médium for rapad groeth and bioassays with tocacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:473-497.

**Núñez, L. 2003.** Uso de termoterapia y control biológico para el control de *Fusarium oxysporum* en babaco. *Tesis*. Master en Ciencias de fitoprotección. Sangolquí - Ecuador. Dirección de Postgrado de la Escuela Politécnica del Ejército.

**Oleas, A. 1991.** Enfermedades de plantas causadas por bacterias: su diagnóstico. Universidad central del Ecuador. Quito – Ecuador. 5,6 p.

**Parraguez, L. 1991.** Micropropagación e inducción de variación somaclonal en mora cultivada. Universidad Católica de Chile. Stgo. 83 p.

**Pierik, R. 1990.** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi – Prensa. Madrid – España. 319 p.

**Promoción de exportaciones agrícolas no tradicionales (PROEXANT). s.f.** Babaco (en línea). Quito – Ecuador. Consultado el 20 jun. 2006. Disponible en: [http://www.proexant.org.ec/HT\\_Babaco.html](http://www.proexant.org.ec/HT_Babaco.html)

**Quintero, I. Polo, J. Jarma, A. y Espitia, A. 2003.** Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas* sp. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. V. N° 2. Diciembre 2003. p.51-56.

**Quoirin M., Lepoivre P. & Boxus Ph. 1977.** Un premier bilan de 10 anne de recherches sur les cultures de meristemes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux., 9993-117 in C.R. Rech. 1976-1977 & Rapports de Synthese, Stat. Cult. Fruit. Et Maraich., Gembloux.

**Ramírez, M y Salazar, E. 1997.** Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guayaba* L.). Rev. Fac, Agrom. (LUZ). 1997, 14: 497-506

**Rebolledo, M. 1987.** Factores que afectan la micropropagación in vitro del cerezo. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillan.

**Requena, P. 1972.** Resumen de tesis: Análisis pomológico del babaco (*Carica pentágona* H). Ciencia y naturaleza. Revista del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Central. Vol XIII, Nº 1 y 2. Quito – Ecuador. 36-40p

**Reyes, H. y Hewstone, N. 1994.** Cultura de tejidos en la agricultura. Tierra Adentro Nº24 Pp 30-33.

**Rivero, G. Ramírez, M. y León S. 2001.** Tipo de explante en el establecimiento *in vitro* del guanábano (*Annona muricata* L.) (en línea). Rev. fac. Agron. (LUZ). 2001, 18: 258-265. Consultado el 5 feb. 2007. Disponible en: <http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/octubre-diciembre2001/ra4011.pdf>.

**Roca, W. y Mroginski, L.1991a.** Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura. Cali, Colombia. 1-18 p.

**Roca, W. y Mroginski, L.1991b.** Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura. Cali, Colombia. 19-40 p.

**Roca, W. Núñez, V. y Mornan, K. 1991.** Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. 271-294 p.

**Roque, A. s.f.** Protocolos REDBIO/FAO: Micropropagación de plantas (en línea). Centro universitario de Las Tunas – Universidad Agraria de La Habana –Cuba. Consultado el 0.2 abr. 2007. Disponible en: [http://www.redbio.org/protocolos/pro\\_papaya.htm](http://www.redbio.org/protocolos/pro_papaya.htm)

**Ruales, P. 2006.** Necesidades nutricionales de la alcachofa (*Cynara scolymus* L.) en dos tipos de suelo en dos localidades. *Tesis*. Ingeniero Agropecuario. Sangolquí - Ecuador. Facultad de Ciencias Agropecuarias -IASA de la Escuela Politécnica del Ejercito.

**Salager, J. y Fernández, A. 2004.** Surfantantes (en línea). Universidad de Los Andes, Ministerior de Ciencia y Tecnología. Mérida-Venezuela. Consultado el 22 nov. 2007. Disponible en: <http://www.firp.ula.ve/cuadernos/S304.pdf>

**Salisbury, F. y Ross, C. 2002©.** Fisiología de las plantas. Ed. Paraninfo S.A. Madrid – España. 529-532, 569-636, 649p

**Scheldeman, X. y Van Damme, P. 2003.** *Vasconcellea* spp. (en línea). Cairns – Australia. Consultado el 18 oct. 2006. Disponible en: <http://users.ugent.be/~tdirckx/vasconcella1.htm>

**Scheldeman, X. Romero, J. Van Damme, V. Heyen, V. y Van Damme, P. 2003.** Potential of highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in southern Ecuador (en línea). Centro Andino de Tecnología Rural, Universidad Nacional de Loja – ECUADOR; Ghent

University, Ghent – BELGIUM, Consultado el 02 abr. 2007. Disponible en: [http://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%205\(1\)%202003\(1-100\)/Scheldeman,%20X.,%20%20J.P.%20Romero%20Motoche,%20V.%20Van%20Damme,%20V.%20Heyens%3B%20Lyonia%205\(1\)%202003\(73-80\).pdf](http://www.lyonia.org/Archives/Lyonia%205(1)%202003(1-100)/Scheldeman,%20X.,%20%20J.P.%20Romero%20Motoche,%20V.%20Van%20Damme,%20V.%20Heyens%3B%20Lyonia%205(1)%202003(73-80).pdf)

**Seemann y Barriga. 1993.** Utilización de técnicas de micropropagación. Avances en producción y sanidad vegetal. Cultivos no tradicionales. Ed Universitaria. 230 p.

**Soria, N. y Viteri, P. 1999.** Guía para el cultivo de babaco en el Ecuador. INIAP – COSUDE. Quito – Ecuador. 48 p.

**Stolz, 1967.** Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 64, 13-14

**Szabados, L. 1991.** Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 239-270 p.

**Szabados, L. Mroginski, A. y Roca, W. 1991.** Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones, *in* Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 173-210 p.

**Toro, M. 2004.** Establecimiento de protocolos para regeneración *in vitro* de cerezo dulce (*prunus avium* l.) Var. Lambert. Tesis. Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad Católica de Temuco. Temuco – Chile.

**Van Droogenbroeck, B; G Gheysen & P Breyne. 2000.** Analysis of the Genetic Diversity within the *Carica* Genus. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent **65(3B)**, 417-423.

**Vega, R y Kitoo, S., 1990.** Regeneration of Babaco (*Carica pentagona*) from ovular callus (En inglés) (en línea). Journal of the American Society for Horticultural Science. Consultado el 29 ago. 2006. Disponible en: [www.newcrop/proceedings1990/V1-376.html](http://www.newcrop/proceedings1990/V1-376.html)

**Villareal, L. Dhuique, C. Dornier, M. Ruales, J. y Reynes, M. 2003©.** Évaluation de l'intérêt du babaco (*Carica pentagona* Heilb.) (En francés) (en línea). Cirad/EDP Sciences. Consultado el 30 ago. 2006. Disponible en: [www.edpsciences.org/articles/fruits/pdf/2003/01/05.pdf](http://www.edpsciences.org/articles/fruits/pdf/2003/01/05.pdf)

**Viteri, P. 1988.** Enraizamiento de brotes tiernos de babaco utilizando Acido Indol Butírico en cuatro sustratos. *Tesis*. Ingeniero Agrónomo. Quito – Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central.

## XI. ANEXOS.

### Anexo 1. Medios de cultivo

- Medio Cohen y Cooper (1982)

		Introducción	Multiplicación	Elongación	Enraizamiento
Macroelementos <sup>1</sup>		KNOP	KNOP	KNOP	KNOP
Microelementos y vitaminas <sup>2</sup>		MS	MS	MS	MS
Caseína hidrolizada	(mg L <sup>-1</sup> )	500	500	500	500
Adenina sulfato	(mg L <sup>-1</sup> )	40	80	80	0
BA	(mg L <sup>-1</sup> )	0.1	1.0	0.1	0
IBA	(mg L <sup>-1</sup> )	0	0	0	1.0
Sacarosa	(g L <sup>-1</sup> )	30	30	30	30
pH	(5.3 - 6)	5.6	5.6	5.6	5.6
Agar	(g L <sup>-1</sup> )	6 - 7	6 - 7	6 - 7	6 - 7

<sup>1</sup> Medio Knop 1865

<sup>2</sup> Medio Murashige-Skoog (1962)

- Macroelementos del medio Knop (1965)

MACROELEMENTOS	mg L <sup>-1</sup>
(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	1000
NO <sub>3</sub> K	250
SO <sub>4</sub> Mg. 7H <sub>2</sub> O	250
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	250

- Microelementos y vitaminas del medio MS (1962)

MICROELEMENTOS	mg L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	37.3
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27.8
VITAMINAS	mg L <sup>-1</sup>
Glicina	2.0
Ac. nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina - ClH	0.1
Mioinositol	100.0

- Medio Quoirin y Lepoivre (1977)

<b>MACRONUTRIENTES</b>	<b>meq L<sup>-1</sup></b>
NO <sub>3</sub> -	24,49
PO <sub>4</sub> -3	59,51
SO <sub>4</sub> -2	29,2
K +	37,64
Ca +2	1,69
Mg +2	29,2
NH <sub>4</sub> +	4,99
<b>MICROELEMENTOS</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	10
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1
KI	0,01
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	3
NaFe EDTA	0,1 mM
<b>VITAMINAS</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>
myo- Inositol	50
Thiamine HCl	1
Nicotinic acid	1
Ca pantothenate	500
Biotin	0,1
Folic Acid	0,01
p-aminobenzoic acid	1
Riboflavin	0,1
<b>AZUCAR</b>	<b>g/L</b>
Sucrose	30

- Agar nutritivo (1 L).

Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	2 g
Peptona	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

- PCA (1 L)

Peptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa	1 g
Agar	14-15 g

## Anexo 2. Pruebas para caracterización de la bacteria

- Tinción Gram convencional.

Cristal violeta al 0.5%  
Solución de yodo al 1%  
Alcohol cetona  
Safranina al 0.5%

- Gram KOH

KOH al 3%

- Prueba de Oxidasa

Hydrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%

### Anexo 2.1. Tabla de lectura Test API 20 E

Tests	Componentes activos	Reacciones/ enzimas	Resultados	
			Negativo	Positivo
<b>ONPG</b>	2-nitro-fenil-βD-galactopiranosida	β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD galactopiranosidasa)	incoloro	amarillo
<b>ADH</b>	L-arginina	Arginina-dihidrolasa	amarillo	rojo/anaranjado
<b>LDC</b>	L-lisina	Lisina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado
<b>ODC</b>	L-ornitina	Ornitina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado
<b>CIT</b>	citrato trisódico	utilización del citrato	verde pálido/amarillo	azul-verde/azul
<b>H2S</b>	tiosulfato sódico	producción de H2S	incoloro/grisáceo	depósito negro/fin liserado
<b>URE</b>	urea	Ureasa	amarillo	rojo/anaranjado
<b>TDA</b>	L-triptófano	Triptófano Desaminasa	amarillo	marrón-rojizo
<b>IND</b>	L-triptófano	producción de indole	incoloro, verde pálido/amarillo	Rosa
<b>VP</b>	piruvato sódico	producción de acetoina	incoloro	rosa/rojo
<b>GEL</b>	gelatina	Gelatinasa	no difusión	difusión pigmento negro
<b>GLU</b>	D-glucosa	Fermentación/oxidación de glucosa	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo grisáceo
<b>MAN</b>	D-manitol	Fermentación/oxidación de manitol	azul/azul verdoso	amarillo
<b>INO</b>	inositol	Fermentación/oxidación de inositol	azul/azul verdoso	amarillo
<b>SOR</b>	D-sorbitol	Fermentación/oxidación de sorbitol	azul/azul verdoso	amarillo
<b>RHA</b>	L-ramnosa	Fermentación/oxidación de ramnosa	azul/azul verdoso	amarillo
<b>SAC</b>	D-sacarosa	Fermentación/oxidación de sacarosa	azul/azul verdoso	amarillo
<b>MEL</b>	D-melibiosa	Fermentación/oxidación de melibiosa	azul/azul verdoso	amarillo
<b>AMY</b>	amigdalina	Fermentación/oxidación de amigdalina	azul/azul verdoso	amarillo
<b>ARA</b>	L-arabinosa	Fermentación/oxidación de arabinosa	azul/azul verdoso	amarillo

## Anexo 2.2. Tablas de la familia *Enterobacteriaceae*

- Producción ácida a partir de componentes orgánicos por especies de *Erwinia* y sus variedades

	Amylovora group						Herbicola group				Carotovora group				
	1. <i>E. amylovora</i>	2. <i>E. salicis</i>	3. <i>E. Tracheiphila</i>	4. <i>E. nigrifluens</i>	5. <i>E. quercina</i>	6. <i>E. rubrifasciens</i>	7a. <i>E. herbicola</i> var. <i>herbicola</i>	7b. <i>E. herbicola</i> var. <i>anonas</i>	8. <i>E. stewartii</i>	9. <i>E. uredovora</i>	10a. <i>E. carotovora</i> var. <i>carotovora</i>	10b. <i>E. carotovora</i> var. <i>atroseptica</i>	11. <i>E. chrysanthemi</i>	12. <i>E. cypripedii</i>	13. <i>E. rhapontici</i>
Arabinose	d	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	-	+	-	+	+	-	d	+	-	d	+	+	+	+	+
$\alpha$ -methyl glucoside	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	d
Xylose	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Raffinose	-	+	-	+	-	-	d	+	+	+	+	d	-	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Inositol	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	d	-	-	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	-	-	+	+
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Melibiose	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	d	D	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	d	+	-	D	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Cellbiose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Dextrin	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Esculin	-	+	-	+	+	-	d	d	-	d	+	+	+	+	+
Glycerol	-	d	-	+	+	d	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Mannose	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	+	-	-	+	d	-	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

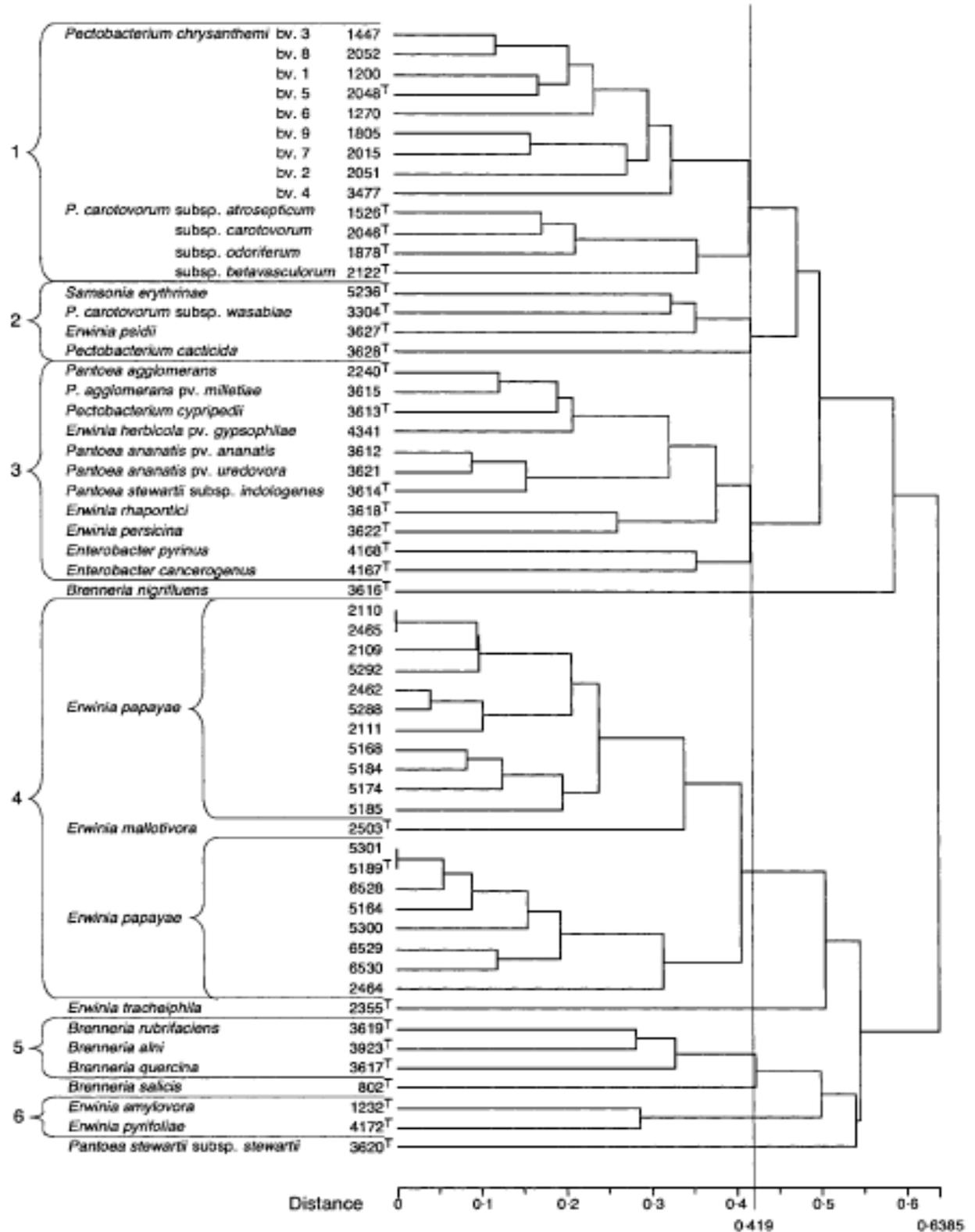
## Anexo 3. Escala arbitraria para evaluar el porcentaje del área cubierta por callo y del área contaminada (bacteria y/u hongo)

Porcentaje del área total	Nivel
0 %	0
10 %	1
20 %	2
30 %	3
40 %	4
50 %	5
60 %	6
70 %	7
80 %	8
90 %	9
100 %	10



## Anexo 5.2. Dendrograma de fenotipos y razas de bacterias, Gardan *et al.*, 2004

Phenons



UPGMA-based dendrogram of phenotypic characteristics of the 57 strains (numbers indicate CFBP accession)

numbers). Distance, 1" Jaccard coefficient.