UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO* DE *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, A PARTIR DE YEMAS Y SEMILLAS, RECOLECTADAS EN EL CANTÓN MEJÍA

AUTORES:

JUAN DIEGO JÁCOME GÓMEZ

DANNY ARIEL ROJAS AIMACAÑA

TUTORA:

IVONNE DE LOS ANGELES VACA SUQUILLO

Quito, marzo del 2017

Dedicatoria

A Dios por brindarme su bendición en todos los aspectos de mi vida y permitirme concluir con esta etapa.

A mis padres, Pedro y Nelly por ser el motor de mi vida, con su apoyo y amor incondicional, por su esfuerzo realizado para que pueda cumplir mis sueños, brindándome cada día una inmensa felicidad.

A mi hermano, Vinicio por enseñarme los aspectos importantes de la vida y ser un ejemplo a seguir.

A mis abuelitos, Manuel, Carmen, Esther y Plutarco por ser la base familiar, y ser una fuente de inspiración por toda la fortaleza que les caracteriza como Familia.

A mis tíos, Nelson, Soraida y Juan Carlos, por ser mis segundos padres, que siempre han creído en mí, brindándome todo su apoyo y cariño.

A Ariana, por alegrarme la vida, siempre sacarme una sonrisa y ser la fuente de mi inspiración.

A mi amigo, Fogh por ser el compañero fiel en interminables noches de estudio.

Juan Diego Jácome Gómez

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme brindado fortaleza para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre, Martha por haberme apoyado en cada decisión de mi vida, por sus consejos, que me han permitido ser una persona de bien, gracias por el infinito amor que me brindas.

A mi padre, Geovanny por ser el amigo, que siempre me brinda su apoyo y me motiva alcanzar sueños y cumplir metas.

A mi hermana, Diana por ser un ejemplo de vida y mi modelo a seguir.

A mis tíos, primos, abuelitos por siempre haber confiado en mí y por ser la fortaleza para seguir adelante.

A Liz, por sus consejos y su motivación para cada día ser mejor.

Danny Ariel Rojas

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana por permitirnos culminar el presente trabajo de investigación.

A nuestra tutora, Msc. Ivonne de los Ángeles Vaca, por darnos la oportunidad de poder realizar la presente investigación siendo el pilar fundamental, por su apoyo incondicional, amistad, por brindarnos consejos, tiempo y todos sus conocimientos.

A los docentes, Dr. Marco Cerna, Ing. Daniel Acurio e Ing. Viviana Chiluisa, por su disposición, paciencia y amistad para instruirnos en esta investigación

A la Ing. Sandy Gavilanes, por su amistad incondicional y su ayuda brindada para la conclusión de la presente investigación.

Al Dr. José Viracucha, dueño de la hacienda Buenos Aires, que nos permitió la recolección del material vegetal, por su interés y comprensión en la realización de la presente investigación.

A todos, Gracias.

Cesión de derechos de autor

Nosotros Juan Diego Jácome Gómez, con documento de identificación N° 1714948278 y Danny Ariel Rojas Aimacaña, con documento de identificación N° 1721535373, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: "ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO* DE *Gaiadendron punctatum* (Ruiz & Pav.) G. Don A PARTIR DE YEMAS Y SEMILLAS, RECOLECTADAS EN EL CANTÓN MEJÍA", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales,en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

.....	.....
Juan Diego Jácome Gómez	**Danny Ariel Rojas Aimacaña**
C.I.: 1714948278	**C.I.: 1721535373**

Quito, marzo del 2017

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación "ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO* DE *Gaiadendron punctatum* (Ruiz & Pav.) G. Don A PARTIR DE YEMAS Y SEMILLAS, RECOLECTADAS EN EL CANTÓN MEJÍA", realizado por Juan Diego Jácome Gómez y Danny Ariel Rojas Aimacaña, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, marzo del 2017

Ivonne Vaca Q

Ing. Ivonne de los Angeles Vaca Suquillo Msc.
C.I.: 17147269016

Autorización de Investigación Científica

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE
PICHINCHA

AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Ministerio del Ambiente

Nº 002 – 2017 – IC – FLO - DPAP - MA
Quito, 04 de enero de 2017

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a: Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo, investigadora y docente de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales de la Universidad Politécnica Salesiana, con C.C.: 1714726906, para que lleve a cabo la investigación titulada **"Establecimiento del cultivo *in vitro,* de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz & Pav.) G. Don, a partir de yemas y semillas recolectadas en el cantón Mejía"**. De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de autorización de extracción e investigación de: Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo, mediante oficio s/n, recibido el 27 de diciembre 2016.
2. Valoración técnica del proyecto: Ing. Diego Morillo G.
3. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Dirección Provincial del Ambiente Pichincha, Unidad de Patrimonio Natural.
4. Complementos autorizados de la Investigación: Colección de muestras botánicas de flora silvestre de *Gaiadendron punctatum* (max. tres duplicados, para identificación) Colección de material vegetativo de flora silvestre de *Gaiadendron punctatum* (max. 200 explantes de semillas - frutos y max. 50 explantes de ramas – yemas).
5. Duración: Desde 04 de enero 2017, hasta 03 de enero de 2018, de acuerdo al cronograma de trabajo establecido.

6. Obligaciones de los investigadores:

   a. ENTREGAR TODAS LAS COLECCIONES PRODUCTO DE LA INVESTIGACIÓN AL HERBARIO QCA DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR Y AL JARBIN BOTÁNICO DE QUITO.
   b. ENTREGAR UNA COPIA IMPRESA (EN AMBAS CARAS), Y EN FORMATO DIGITAL, A ESTA DIRECCIÓN PROVINCIAL DE LOS RESULTADOS FINALES DE LA INVESTIGACION, EN CASTELLANO, INCLUYENDO LA LOCALIZACION EXACTA (COORDENADAS UTM) DE LOS ESPECIMENES COLECTADOS Y OBSERVADOS, COPIA DE LAS FOTOGRAFIAS, GRABACIONES Y OTROS DOCUMENTOS PRODUCTO DE LA MISMA.
   c. EL PLAZO DE ENTREGA DEL INFORME FINAL, VENCE EL 03 DE ENERO DE 2018.

7. Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el párrafo anterior se responsabiliza a Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo, y a los estudiantes de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales de la Universidad Politécnica Salesiana: Juan Diego Jácome Gómez, con C.C. Nro: 1714948278, Danny Ariel Rojas Aimacaña, con C.C. Nro: 1721535373.

Atentamente,

Lcdo. Rafael Mera Cuvi
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE PICHINCHA – Encargado.

OBSERVACIONES SOBRE AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Nº 002 – 2017 –IC – FLO – DPAP - MA

FLORA (X) FAUNA ( )

- Se autoriza la investigación en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Aloag.
- El equipo de investigadores está conformado por: Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo y por los estudiantes de la Carrera de Ingeniería en Biotecnologia de los Recursos Naturales de la Universidad Politécnica Salesiana: Juan Diego Jácome Gómez y Danny Ariel Rojas Aimacaña.
- En caso de involucrarse propiedades particulares, el investigador deberá obtener el permiso correspondiente de los propietarios.
- La autoridad ambiental verificará el total de muestras colectadas y entregadas al Herbario QCA – UCE y al Jardín Botánico de Quito.
- Los resultados de la investigación deberán ser entregados al Ministerio del Ambiente, conforme al Art. Del 5 al 19 del Título II del TULSMA (Texto Unificado de Legislación Secundaria del Medio Ambiente), así como también el registro de la localización exacta de las muestras colectadas, fotografías, informe parcial y/o final y todos los productos resultado de la investigación, tanto en formato físico como digital.
- Se autoriza la toma de muestras botánicas y colección de material vegetativo de flora silvestre de *Gaiadendron punctatum*, con el objetivo de generar conocimiento y establecer una evidencia científica relacionada con la capacidad de adaptación de la "violeta de campo".
- Para la movilización de todos los ejemplares colectados, mediante esta autorización, los investigadores deberán contar con las respectivas órdenes de movilización, emitidas por la Dirección Provincial del Ambiente de Pichincha.
- Se autoriza el uso de los equipos y materiales siguientes: tijeras de podar, tijeras aéreas, material de laboratorio.
- Ningún espécimen producto de esta investigación podrá ser utilizado para uso comercial o como material para manejo insitu / exsitu.
- Los especímenes colectados no podrán ser utilizados para cualquier actividad de bioprospección y biopiratería.
- Los especímenes colectados no podrán ser utilizados para el acceso a recursos genéticos.
- En caso de prorroga, se solicitará quince días antes de la fecha de vencimiento que indica este documento.
- En caso de que la investigación produzca informes parciales, estos deberán estar contemplados en el informe final tanto en formato impreso como digital.
- TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE LOS ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE CODIFICADA; Y, AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN SECUNDARIA DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
- La tasa por concepto de emisión de autorización es de: USD$ 20 (veinte dólares), depositada en la cuenta 0010000785 del Banecuador, papeleta No. 820091153 de fecha 27/12/2016.

RM/SCH/DM
04/01/2017.

Índice

Introducción 1
Capítulo 1 4
Marco Conceptual 4
1.1. *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 4
1.2. Cultivo *in vitro* 7
1.3. Medio de cultivo 9
1.4. Medio Murashige y Skoog 16
1.5. Fases de cultivo *in vitro* 16
Capítulo 2 24
Materiales y Métodos 24
2.1. Localización del ensayo 24
2.2. Selección, colecta y transporte del material vegetal 24
2.3. Fase 1: evaluación de reactivos 25
2.4. Fase 2: estandarización de un protocolo de desinfección 29
2.5. Fase 3: Introducción y adaptación al medio de cultivo 32
Capítulo 3 36
Resultados y Discusión 36
3.1. Fase 1: análisis de reactivos 36
3.2. Fase 2: estandarización de un protocolo de desinfección 53
3.3. Fase 3: introducción y adaptación al medio de cultivo 59
Conclusiones 64
Recomendaciones 65
Referencias Bibliográficas 66
Anexos 73

Índice de Tablas

Tabla 1. Jerarquía Taxonómica de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don.. 5
Tabla 2. Análisis de varianza (ADEVA) para el color en tallos y yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, respecto a la exposición al fungicida. 36
Tabla 3. Evaluación de color respecto a las concentraciones de fungicida Score 250 EC en tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 37
Tabla 4. Promedios y prueba de significación para la variable color de las yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, para la evaluación de daño del tejido vegetal, con respecto a la acción del fúngicida. 38
Tabla 5. Evaluación de color respecto a las concentraciones de fungicida Score 250 EC en yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 38
Tabla 6. Análisis de varianza (ADEVA) para el color en tallos y yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, respecto a la exposición a ácido acético. 41
Tabla 7. Promedios y prueba de significación para la variable color de los tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, para la evaluación de daño del tejido vegetal, con respecto a la acción de ácido acético. 41
Tabla 8. Evaluación de color respecto a las concentraciones de ácido acético en tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 42
Tabla 9. Evaluación de color respecto a las concentraciones de ácido acético en yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 43
Tabla 10. Análisis de varianza (ADEVA) para el color en tallos y yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, respecto a la exposición a ácido cítrico. 44
Tabla 11. Evaluación de color respecto a las concentraciones de ácido cítrico en tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 44
Tabla 12. Evaluación de color respecto a las concentraciones de ácido cítrico en yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 45
Tabla 13. Análisis de varianza (ADEVA) para el color en tallos y yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, respecto a la exposición a alcohol etílico. 47
Tabla 14. Evaluación de color respecto a las concentraciones de alcohol etílico en tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 48
Tabla 15. Promedios y prueba de significación para la variable color de las yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, para la evaluación de daño del tejido vegetal, con respecto a la acción del alcohol etílico. 48
Tabla 16. Evaluación de color respecto a las concentraciones de alcohol etílico en yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 49
Tabla 17. Evaluación de color respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio en tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 51
Tabla 18. Análisis de varianza (ADEVA) para el color en yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, respecto a la exposición a hipoclorito de sodio. 51

Tabla 19. Promedios y prueba de significación para la variable color de las yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, para la evaluación de daño del tejido vegetal, con respecto a la acción del hipoclorito de sodio. 52
Tabla 20. Evaluación de color respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio en yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 52
Tabla 21. Análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de contaminación fúngica en semillas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. . 54
Tabla 22. Promedio de contaminación fúngica, contaminación bacteriana y la fenolización de semillas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, con respecto a las concentraciones de Hipoclorito de sodio y Alcohol etílico. 55
Tabla 23. Análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de fenolización de yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 57
Tabla 24. Análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de mortalidad de yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 57
Tabla 25. Porcentajes de contaminación fúngica, contaminación bacteriana, fenolización y mortalidad de yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, con respecto a las concentraciones de Hipoclorito de sodio y Alcohol etílico. 58
Tabla 26. Análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de germinación de semillas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 60
Tabla 27. Análisis de varianza (ADEVA) para el promedio de longitud de las plántulas provenientes de semillas de yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 60
Tabla 28. Promedio del el porcentaje de germinación y la longitud de plántulas generadas a partir de semillas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, con respecto a las concentraciones de sales minerales en medio MS y temperaturas de incubación. 62

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa de la parroquia de Alóag y fotografía de la Hacienda Buenos Aires 24
Figura 2. Cálculo del área bajo la curva 28
Figura 3. Escala colorimétrica para tallos y yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 28
Figura 4. Variación de color de tallo y yema de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, con respecto al tiempo de inmersión y concentraciones de fungicida Score 250 EC. 40
Figura 5. A) Semillas contaminadas de tratamientos previos, B) semillas sin contaminación del tratamiento TPS2. 56
Figura 6. A) Fenolizacion del explante, B) Explante sano 59
Figura 7. A) Germinación, B) Plántula proveniente de germinación 61

Índice de Anexos

Anexo 1: Tabla de composición del medio de cultivo Murashige y Skoog..... 73
Anexo 2: Tratamientos de fungicida para tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 74
Anexo 3: Tratamientos de fungicida para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 74
Anexo 4: Tratamientos de Ácido acético para tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 74
Anexo 5: Tratamientos de Ácido acético para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 75
Anexo 6: Tratamientos de Ácido cítrico para tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 75
Anexo 7: Tratamientos de Ácido cítrico para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 75
Anexo 8: Tratamientos de Alcohol etílico para tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 76
Anexo 9: Tratamientos de Alcohol etílico para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 76
Anexo 10: Tratamientos de Hipoclorito de sodio para tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 76
Anexo 11: Tratamientos de Hipoclorito de sodio para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don 77
Anexo 12: Protocolos de desinfección para semillas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 77
Anexo 13: Protocolos de desinfección para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 77
Anexo 14: Tratamiento para la introducción *in vitro* de semillas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, a concentraciones al 100%, 50% y 25% de sales de medio MS a temperaturas de 8°C y 20°C. 78
Anexo 15: Tratamiento para la introducción *in vitro* de yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, a concentraciones al 100%, 50% y 25% de sales de medio MS a temperaturas de 8°C y 20°C. 78
Anexo 16: Área bajo la curva respecto a las concentraciones de fungicida Score 250 EC en órganos vegetales de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 78
Anexo 17: Área bajo la curva respecto a las concentraciones de ácido acético en órganos vegetales de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don..... 78
Anexo 18: Variación de color de tallo y yema de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, con respecto al tiempo de inmersión en concentraciones de ácido acético. 79
Anexo 19: Área bajo la curva respecto a las concentraciones de ácido cítrico en órganos vegetales de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don..... 79
Anexo 20: Área bajo la curva respecto a las concentraciones de alcohol etílico en órganos vegetales de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don..... 79

Anexo 21: Certificado de identificación de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don. 80

Resumen

El género *Gaiadendron* pertenece a la familia Lorantaceae, y en Ecuador se considera la especie *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, como una planta nativa, utilizada ancestralmente remedio para la tos. El objetivo de esta investigación fue establecer a *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, en cultivo *in vitro* a partir de yemas o semillas, con la ejecución de tres fases: análisis de concentraciones y tiempos de inmersión de reactivos de desinfección para prevenir la fenolización en explantes de yemas, estandarización de un protocolo de desinfección y la adaptación a medio de cultivo evaluando concentraciones de sales minerales de medio de cultivo MS y temperaturas. En la primera fase se determinaron las concentraciones adecuadas de fungicida, ácido acético, ácido cítrico, alcohol etílico e hipoclorito de sodio para la prevención de la fenolización de yemas. Para la estandarización de un protocolo de desinfección para yemas los tratamientos aplicados resultaron 100% eficaces ante la contaminación fúngica y bacteriana, mientras que para semillas el tratamiento TPS2 resultó ser el tratamiento óptimo respecto a la contaminación fúngica. En la fase de introducción y adaptación al medio de cultivo se determinó que a una concentración del 50% de sales minerales de medio de cultivo MS y a una temperatura de 20°C de incubación, se obtiene 100% de germinación de semillas y favorece a la obtención de plántulas de mayor longitud, por ende se recomienda la utilización de semillas para la propagación *in vitro* de esta especie.

Palabras Clave: *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, cultivo *in vitro*, fenolización, contaminación, germinación.

Abstract

The genus *Gaiadendron* belonging to the Lorantaceae family, in Ecuador the *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, is considered a native plant. This species was ancestrally used as a remedy for cough. The object to present this research was to establish an *in vitro* cultivation using seeds and sprouts of *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, by the development of three phases. Analyze the concentration and immersion time of reagents for disinfection to prevent phenolization, were examined, after disinfection protocols were probed, and finally the MS salts concentration and temperature were valued. In the first phase, adequate concentrations of fungicide, acetic acid, citric acid, ethyl alcohol and sodium hypochlorite were determined for the prevention of bud phenolization. For the standardization of a disinfection protocol for buds, the applied treatments were 100% effective against fungal and bacterial contamination, whereas for seeds the TPS2 treatment proved to be the optimal treatment for fungal contamination. In the stage of introduction and adaptation to the cultivation medium it was determined that at a concentration of 50% of mineral salts of MS cultivation medium and at a temperature of 20 ° C of incubation, 100% germination of seeds is obtained and favors the Obtaining of seedlings of greater length, therefore the use of seeds for the *in vitro* propagation of this species is recommended.

Key Words: *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, tissue culture, phenolization, contamination, germination.

Introducción

El Ecuador es reconocido a escala mundial por ser un país mega diverso, en Latinoamérica se lo considera como el país con mayor diversidad biológica por unidad de área, pues concentra cerca del 10% de la diversidad vegetal del planeta (Mena, 2005, pág. 25). En el país existen 20000 especies de plantas vasculares, de éstas el 20% corresponden a especies endémicas, en la actualidad se conoce que aproximadamente 15306 especies vegetales se encuentran catalogadas (Aguirre, 2011).

La pérdida de diversidad biológica en el mundo ha sido causada especialmente por las actividades extractivas del hombre, lo que ha provocado la degradación de hábitats naturales, desencadenando la extinción o disminución de la diversidad de especies; la pérdida de especies va más allá de la ausencia de una de ellas, también implica un desequilibro entre las demás especies que interactúan en los ecosistemas (Aguirre, 2011).

La constante desaparición de especies vegetales impone la exigencia de proteger las plantas nativas y endémicas del país, se estima que existen especies en peligro o vulnerables las cuales no han sido descritas o estudiadas, varias de éstas podrían presentar propiedades farmacológicas útiles para la humanidad, por ello surgen programas de conservación (Mora, 2008, pág. 22). En Colombia, una de las tantas especies que se encuentran en lista roja es el “Ichul” (*Gaiadendron punctatum)*, esta especie se encuentra en peligro crítico, lo cual ha provocado la migración de aves frugívoras que se alimentan del fruto de esta planta (Parada, 2012). Por ésta razón, en Colombia se implementó un acuerdo en el cual se prohíbe el uso y aprovechamiento de ciertas especies, incluido el Ichul (Cornare, 2011, pág. 3).

Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, conocida comúnmente como “Ichul o violeta de campo”, se encuentra distribuida en la zona Andina del Ecuador, entre 1500 y 4000msnm, concretamente en los subpáramos (Tropicos, 2009). La falta de conocimientos sobre la especie ha dado lugar a la desvalorización de sus propiedades medicinales, ambientales y comerciales, de las cuales se puede destacar su actividad antiinflamatoria y antipirética, se la utiliza como combustible, además de ayudar a la protección de cuencas hidrográficas (Guaman, 2014, pág. 68), (Cedeño & Espinoza, 2015, pág. 11), (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009). Además, ha sido utilizada ancestralmente en infusión para el tratamiento de la tos, por los Hampi Yachakkuna, una comunidad del cantón Saraguro en la provincia de Loja (Guerrero, 2008, pág. 8), también Ichul es una candidata apta para contrarrestar o prevenir fenómenos de contaminación y alteraciones en distintos ecosistemas, por ejemplo inundaciones, deslaves, cambios indeseables en la composición físico-química de suelos de interés agrícola o ganadero (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009). Presenta la cualidad de no ser una especie invasora, resultando ser un carácter muy provechoso para poder controlar su propagación (OPEPA, 2015).

El Ichul a pesar de ser una planta con cualidades beneficiosas, carece de un registro de conservación según un sondeo del Ministerio del Ambiente en el 2015, por lo tanto se desconoce la población promedio de la especie en el Ecuador (Alzate, Gómez, & Rodríguez, 2008, pág. 112). Solo está determinado que la planta es frecuente en la ceja andina y en los subpáramos del país (Ulloa & Moller, 2004).

Actualmente, no se ha reportado un protocolo de propagación tradicional de *Gaiadendron punctatum*, ni se han empleado metodologías modernas como el cultivo *in vitro* para idear su micropropagación (Alzate, Gómez, & Rodríguez, 2008, pág. 112). El cultivo *in vitro* de especies vegetales nativas se ha convertido en uno de los

objetivos principales de la biotecnología vegetal, el mismo que busca la obtención, regeneración y la estandarización de un protocolo de propagación *in vitro* con el fin de preservación y subsistencia de plantas endémicas de la región del Ecuador, las técnicas de la micropropagación resultan convenientes para mejorar la capacidad germinativa, el crecimiento y multiplicación de especies en peligro crítico (Orqueda, 2013, pág. 1)**.** Es así, que el presente trabajo busca establecer a *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, en cultivo *in vitro* a partir de yemas y semillas, recolectadas en el cantón Mejía, mediante la evaluación de concentraciones y tiempo de exposición a productos de desinfección para determinar un protocolo óptimo para el cultivo de tejidos, estandarización de un protocolo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, a partir de yemas y semillas; y además la determinación de la concentración óptima de sales MS y temperatura, con el fin obtener el mayor número de explantes adaptados al medio.

Este trabajo plantea como hipótesis alternativa que al menos uno de los explantes de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, yemas o semillas, se establece en cultivo *in vitro*.

Capítulo 1

Marco Conceptual

1.1. *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

1.1.1. Localización mundial y nacional

El género *Gaiadendron* es originario de América, propio de los Andes tropicales, distribuido en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia; en Centroamérica se lo encuentra desde Nicaragua a Panamá (Ulloa & Moller, 2004), (Tropicos, 2016). En el Ecuador, la especie *Gaiadendron punctatum* se localiza en las provincias de Azuay, Cañar, Carchi, Cotopaxi, El Oro, Imbabura, Loja, Morona Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua y Zamora Chinchipe (Tropicos, 2009).

1.1.2. Hábitat

Gaiadendron punctatum se desarrolla entre los 1500 hasta los 4000msnm, dentro del bosque siempreverde montano alto (MAE, 2012, pág. 46), (Rivas & Martínez, 2008).

Por la alta humedad de los troncos de estas especies están habitualmente cubiertos por especies de briofitas, líquenes, otras epífitas y hemiepífitas (MAE, 2012, pág. 46). Característica que lo hace parecido a los Bosques nublados; la temperatura varía de 6ºC a 17ºC, con una precipitación anual de 922 mm (MECN, 2009, pág. 10).

1.1.3. Taxonomía

En el Ecuador, a la especie se la conoce con diferentes nombres, en los páramos de Pichincha se la identifica por “manguitos”, mientras que en el cantón de Saraguro se le denomina “Puchik” y en los páramos de Zuleta se la conoce como “Ichul” (Alzate, Gómez, & Rodríguez, 2008, pág. 111), (Guaman, 2014, pág. 68). En Colombia se la conoce como “Violeta de Campo”, “Tagua” o “Platero” y en Costa Rica se la denomina

“mata palo o manguitos” (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009), (González, 2011). Su Clasificación Taxonómica se menciona en la Tabla 1.

Tabla 1.

Jerarquía Taxonómica de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

Reino:	**Plantae**
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Santalale
Familia:	Loranthaceae
Género:	*Gaiadendron* G. Don
Especie:	*Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

Nota: Freire (2004).

1.1.4. Descripción

Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, es una especie hemiparásita, habita en espacios abiertos, presenta raíces terrestres con propagación homocaulia (Barrera & Acosta, 1995, pág. 127).

Los árboles alcanzan una altura máxima de 20m, presentan hojas simples, dispuestas de manera opuesta, de forma elíptica y obovada, de 3 a 5 cm de longitud, punteadas por el envés, mientras que su base es aguda, los márgenes son enteros, el ápice obtuso, su nervadura es pinnada y con nervios inconspicuos (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009). La inflorescencia alcanza una altura aproximada de 15 cm de longitud y se dispone en racimos axilares o en una panícula terminal, presenta una flor central sésil y las laterales son cortamente pecioladas, formada de varias cimas (Alzate, Gómez, & Rodríguez, 2008, pág. 111). Las flores son vistosas de color amarillo o anaranjado brillante (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009), de hasta 2,5 cm de longitud, su cáliz es tubular con una longitud de 3 a 5 mm de color verde o amarillo, presenta de 5 a 7

pétalos lineares, también se encuentran 5 o 6 estambres parcialmente libres (Alzate, Gómez, & Rodríguez, 2008, pág. 111), (MECN - INB, 2015, pág. 85).

Su fruto es una baya, carnosa, redondeada o globular, con un diámetro aproximado de 1 cm y sus colores característicos son el amarillo y rojo anaranjado que depende directamente de la madurez de la baya (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009), (Alzate, Gómez, & Rodríguez, 2008, pág. 111). Los frutos son consumidos y dispersos por aves frugívoras, los cuales presentan una sola semilla café rugosa, la época de fructificación va de marzo a julio y de octubre a diciembre (Parada, 2012).

1.1.5. Propiedades y beneficios

En el Ecuador se utiliza el "Ichul" tradicionalmente con fines medicinales, las flores presentan metabolitos secundarios, entre los principales se encuentra el glupeol, un triterpeno pentacíclico, que posee una actividad antiinflamatoria y antipirética (Cedeño & Espinoza, 2015, pág. 11), utilizadas para tratar la tos, resfríos y afecciones posparto, mediante la infusión o cocción de las flores (Cedeño & Espinoza, 2015, pág. 11), (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009). Para las afecciones nerviosas e insomnio se ingiere la savia de la flor (Cedeño & Espinoza, 2015, pág. 11). Además, la decocción de las flores se emplea para teñir la ropa de color azul y su tallo es utilizado como combustible (Guaman, 2014, pág. 68).

Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, presenta características ambientalmente amigables al proteger cuencas hidrográficas, controlar la erosión del suelo y de la misma forma restaurarlo (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009).

La especie en cuestión es una fuente de alimento para alrededor de 257 especies de aves silvestres (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009); además, sirve de refugio para especies endémicas, amenazadas de extinción a nivel mundial, como *Grallaria*

gigantea, *Grallaria alleni*, *Haplophaedia lugens* y *Odontophorus melanonotus* (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2009).

Estudios recientes indican que el Ichul presenta glicosilado artubotryside A, un flavonoide que induce la muerte celular del glioma U87, el cual conforma el tejido de glioblastoma multiforme (GBM), un tumor cerebral maligno en los seres humanos; y además, contiene el lupenone, un triterpeno pentacíclico, que presenta actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecium, Lactobacillus plantarum, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Klebsiella pneumoniae* (Cedeño & Espinoza, 2015, pág. 31).

1.2. Cultivo *in vitro*

1.2.1. Generalidades

El cultivo *in vitro* se define como el conjunto de técnicas diseñadas y viables para el desarrollo, crecimiento y multiplicación de células, tejidos u órganos vegetales que puedan ser considerados como propágulo o explante capaz de regenerar un individuo completo, utilizando un medio de cultivo el cual es una formulación de sustancias nutritivas, puede ser líquido o sólido (dependerá del material biológico seleccionado o de las necesidades del tejido y del objetivo final), en un entorno estéril y en condiciones controladas; el cultivo *in vitro* es parte esencial e integral de la Biotecnología Vegetal (Segui, 2010, pág. 289), (Cubero, 2002, pág. 353)**.**

Esta herramienta permite propagar a gran escala especies vegetales, obtener plantas de calidad, libres de patógenos y genéticamente estables, restauración de plantas en peligro de extinción, pudiendo utilizar las plantas propagadas posteriormente en ingeniería genética y fitorremediación, entre otros; minimizando el espacio y tiempo necesario de cultivo al compararla con otras técnicas tradicionales de cultivo (Segui, 2010, pág. 291).

La metodología de la micropropagación se fundamenta en la totipotencia celular, misma que especifica que una célula, más o menos diferenciada es capaz de regresar a su estado primigenio o meristemático (células no diferenciadas), sin una especialización completa, pero que aún posee la capacidad de especializarse en cualquier otro tipo de célula vegetal; si se conoce como revertir el proceso natural y después inducir a la diferenciación de cualquier tipo celular que se desee, se conseguirá la regeneración de plantas completas sin la necesidad de la intervención de ningún tipo de células sexuales (Segui, 2010, pág. 295), (Segretín, 2007, págs. 1-2).

1.2.2. Tipos de cultivo *in vitro*

Los tejidos vegetales cultivados *in vitro* presentan dos tipos de respuesta, morfogénesis directa y morfogénesis indirecta; que dependerán en gran medida de la interacción de los reguladores de crecimientos y los explantes utilizados (Segretín, 2007, pág. 4). La morfogénesis es el proceso biológico que se encarga que un organismo desarrolle su forma (Cardona, 2013).

La morfogénesis directa es la respuesta morfogenética de los tejidos cultivados, que forman directamente embriones somáticos u órganos (Segretín, 2007, pág. 2). La morfogénesis indirecta o callogénesis, es la respuesta morfogenética en donde se genera una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que genera un conjunto de células indiferenciadas, denominado callo, del cual se pueden generar órganos o embriones somáticos (Sales, 2012).

Los embriones somáticos son estructuras que siguen consecuentemente las etapas de desarrollo de los embriones cigóticos, pero estos no se originan por la unión de células sexuales o gametos (Gisbert, 2011, pág. 5). Se denomina organogénesis al proceso de generar un órgano directamente del tejido cultivado (Sales, 2012).

1.2.3. Aplicaciones del cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es un abanico de posibilidades para la biología celular y molecular, ingeniería genética, fisiología vegetal, química, entre otras disciplinas; dado que en el laboratorio el cultivo de tejidos sobresale por su fácil desarrollo, interpretación del comportamiento de una célula vegetal al cultivarla *in vitro* en tiempo y espacio reducido, en comparación con otras técnicas tradicionales de propagación (Segui, 2010, pág. 291).

Según Segui (2010), el cultivo *in vitro* se aplica actualmente en la propagación a gran escala de materiales elite, producción de individuos fértiles modificados genéticamente, sistema modelo para estudios básicos en la biología y la fisiología vegetal, preservación de especies en peligro de extinción y recurso fitogenéticos, y en la ingeniería metabólica para obtención de productos naturales y metabolitos.

1.3. Medio de cultivo

Un medio de cultivo se define como la formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos que son requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010, pág. 21), en el cultivo *in vitro*, el material vegetal se lo puede introducir en medios tanto líquidos como sólidos, todo dependerá básicamente del material biológico seleccionado o de las necesidades del tejido y del objetivo final (Cubero, 2002, pág. 355).

Al igual que las plantas intactas, los tejidos vegetales *in vitro* presentan requerimientos similares, destacando que las células, tejidos y órganos aislados, carecen del metabolismo para sintetizar carbohidratos, así como la mayoría de vitaminas y reguladores de crecimiento (Pérez, 2006, pág. 69).

Para poder obtener una planta completa *in vitro* con éxito, depende básicamente de la naturaleza del explante, la composición y tipo del medio nutritivo, y las condiciones del cultivo (Pérez, 2006, pág. 69).

Los componentes de un medio de cultivo son el agua, sales minerales, fuente de carbono, reguladores de crecimiento, algunas vitaminas y aminoácidos, también pueden presentar agentes solidificantes, extractos complejos y compuestos diversos para fines específicos (Pérez, 2006, pág. 70)**,** (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010, pág. 21)**,** (Roca & Mroginski, 1991, pág. 46)**.**

1.3.1. El Agua

Se conoce muy bien la importancia del agua para el desarrollo de los seres vivos y representa el 95% del medio nutritivo, no obstante, para la preparación de medios de cultivo se debe evitar la utilización de agua corriente; dentro de un laboratorio de cultivo de tejidos, deben existir destiladores para obtener agua destilada de buena calidad, dicha agua va destinada no solo para la elaboración de los medios nutritivos, sino también para el lavado de todo el material a utilizar y además para enjuagar las partes vegetales que se requiere previamente en la siembra (Pérez, 2006, pág. 70), (Segretín, 2007, pág. 4).

1.3.2. Sales Minerales

Todos los minerales que son necesarios para el crecimiento de las plantas, también son esenciales para el crecimiento de tejidos y órganos cultivados *in vitro*, por ello las sales minerales presentes en el medio de cultivo pueden dividirse en macro y micro elementos (Pérez, 2006, pág. 70).

1.3.2.1. Macronutrientes

Son los elementos que los organismos vegetales requieren en cantidades grandes, dentro de este grupo se puede mencionar al Nitrógeno (N), Potasio (K), Fósforo (P), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S), su concentración dependerá del medio de cultivo a utilizar, y los requerimientos de la especie vegetal (Pérez, 2006, pág. 71).

Se ha determinado que los efectos más visorios en el crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales, los genera el nitrógeno, que se pueda suministrar en forma orgánica, inorgánica, reducida y oxidada; la selección del tipo de nitrógeno que se escoja tendrá objetivos específicos (Pérez, 2006, pág. 71).

1.3.2.2. Micronutrientes

El Manganeso (Mn), Hierro (Fe), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Boro (B), Níquel (Ni) y el Cloro (Cl) son los nutrientes minerales que las plantas requieren en cantidades muy pequeñas, habitualmente en trazas ya que una cantidad mayor a la requerida puede presentar toxicidad o causar daños en el cultivo (Kyrkby & Römheld, 2007, pág. 1), (Pérez, 2006, pág. 72).

1.3.3. Fuente de carbono

Dado que los cultivos *in vitro* son heterótrofos ya que la fotosíntesis no se realiza en las condiciones necesarias para garantizar un suministro adecuado de energía, necesitan un aporte exógeno de carbohidratos (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010, pág. 21), (Pérez, 2006, pág. 72).

La sacarosa es el azúcar más utilizado en los medios nutritivos, se utiliza en concentraciones del 2 al 3%; al autoclavarla, algunas porciones se pueden transformar en glucosa y en fructosa, los medios de cultivo con sacarosa presentan tres carbohidratos al salir de su esterilización (Hurtado & Merino, 2001, pág. 70).

1.3.4. Reguladores de Crecimiento

Las hormonas vegetales funcionan como mensajeros químicos que controlan el metabolismo durante el crecimiento y desarrollo de la planta, para obtener mejores resultados en el cultivo *in vitro* es importante usar diferentes tipos de hormonas vegetales y no limitarse a usar una en concreto, la interacción entre éstas se verá reflejada en el desarrollo del cultivo (Hurtado & Merino, 2001, pág. 48).

Hay muchas sustancias con una actividad biológica similar a las fitohormonas naturales que son fundamentales en el cultivo *in vitro*, ya que controlan el crecimiento y el desarrollo de las *vitro* plantas, para poder diferenciarlos, ha estos se los denomina reguladores de crecimiento (Hurtado & Merino, 2001, pág. 48), (Jordán & Casaretto, 2006, pág. 22).

Los principales tipos de reguladores de crecimiento utilizados habitualmente son las auxinas, citoquinas y giberelinas, éstas presentan los efectos más visibles; existen otros reguladores con menor aplicación como el etileno y ácido abcísico (Hurtado & Merino, 2001, pág. 48).

1.3.4.1. Auxinas

Se derivan del triptófano o de la biosíntesis del triptófano y su síntesis se produce en los ápices, raíces y tienen la capacidad de ser trasportadas de célula a célula o por el floema (Jordán & Casaretto, 2006, pág. 2).

La auxina que se encuentra distribuida en el reino vegetal en mayor proporción es la AIA (Ácido indolacético), seguida de la AIB (Ácido indolbutírico), del Ácido fenil acético y del Ácido 4 cloro indolacético (Roca & Mroginski, 1991, pág. 64), existen auxinas sintéticas con actividades similares a las auxinas naturales, entre estas se

encuentra el ANA (ácido naftalenacético), y el 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Jordán & Casaretto, 2006, pág. 3).

Ya es conocido que la presencia e interacción de auxinas y citoquininas puede controlar la organogénesis en algunas especies vegetales, ya que a altas concentraciones de citoquininas y bajas concentraciones de auxinas, se genera la formación de tallos, mientras que a la inversa se produce la formación de raíces, y la similitud entre las concentraciones generaría la formación de callos (Pérez, 2006, pág. 75).

1.3.4.2. Citoquininas

Las citoquininas estimulan la división celular cuando interactúan con las auxinas, son las responsables de los diferentes efectos en el desarrollo vegetal (Hurtado & Merino, 2001, págs. 57-60). Las citoquininas naturales se obtienen de los derivados de la base púrica adenina, se presentan en forma libre en los tejidos vegetales o aglomerada en compuestos nucleosidos, nucleótidos, entre otros; entre los compuestos con actividad citoquinina encontramos a benciladenina (BAP), quinetina (KIN), diazuron (TDZ), isopenteniladenina, ceratina (Jordán & Casaretto, 2006, pág. 19).

Los compuestos con actividad citoquinina favorecen a la generación y crecimiento de callos, la maduración de embriones somáticos en muchas especies, la iniciación de yemas axilares aunque se encuentren solas en el medio nutritivo e inhiben la formación de raíces (Hurtado & Merino, 2001, pág. 60).

1.3.4.3. Giberelinas

Su presencia en el medio de cultivo no es esencial, pero la aplicación exógena estimula el crecimiento de tallos y meristemos en yemas, elongación de entrenudos, la germinación de semillas, controlan la inducción floral, el crecimiento y desarrollo del

fruto e inhiben el reposo de yemas y embriones aislados (Jordán & Casaretto, 2006, pág. 12).

Es preciso recalcar que la presencia de las giberelinas puede tener un efecto inhibitorio en la formación de raíces y yemas adventicias (Pérez, 2006, pág. 77).

1.3.5. Vitaminas y Aminoácidos

La mayoría de las vitaminas son requeridas en cantidades mínimas por una gran cantidad de plantas cuando se encuentran en condiciones de cultivo *in vitro* (Pérez, 2006, pág. 83). El Ácido nicotínico, piridoxina y Tiamina son las vitaminas más utilizadas, siendo la Tiamina determinante para el crecimiento de los tejidos (Puche, 2012).

El Ácido nicotínico es una vitamina foto y termoestable, actúa como coenzima de las enzimas deshidrogenasas que catalizan las reacciones de óxido-reducción (Puche, 2012).

La piridoxina es igual una vitamina foto y termoestable, su actividad más importante es la síntesis de purinas y piramiditas, por ende participa en el metabolismo de los ácidos nucleicos (Puche, 2012).

La tiamina es una vitamina fotoestable, esencial para el crecimiento, pero en la esterilización en autoclave se descompone en pirimidina y tiazol, donde la mayoría de los tejidos sintetizan la tiamina mediante los productos de su descomposición (Puche, 2012).

En cuanto a los aminoácidos más utilizados se encuentra la glicina y la glutamina, indispensables para embriones inmaduros (Pérez, 2006, pág. 83), (Puche, 2012).

1.3.6. Agentes Solidificantes

Los medios nutritivos pueden se líquidos o sólidos, en donde los sólidos son medios nutritivos gelificados, que presentan una consistencia semisólida que ayuda a mantener el explante en una posición fija (Pérez, 2006, pág. 84).

El agar, un polisacárido de elevado peso molecular que se procesa de ciertas algas marinas, es el gelificante más utilizado, se lo aplica a una concentración del 0,6 al 0,8 %, para que el medio nutritivo se pueda gelificar en un pH bajo, ya que a una concentración del 1% presentaría una solidificación excesiva que tendría problemas de absorción de agua y nutrientes para el explante (Pérez, 2006, pág. 84).

1.3.7. Otros compuestos con fines específicos

Un problema muy frecuente es la segregación de compuestos fenólicos, que son sustancias tóxicas expulsadas por los explantes, que disminuyen el crecimiento y pueden llegar a generar necrosis del tejido u oscurecimiento del medio de cultivo, para combatir la fenolización del explante o del medio nutritivo se utilizan compuestos que atrapan los fenoles o previenen este fenómeno como el Ácido cítrico, Ácido ascórbico y carbón activado (Hurtado & Merino, 2001, pág. 71).

1.3.8. pH del medio nutritivo

La regulación del pH dentro del medio nutritivo, es un paso fundamental, ya que si éste es muy bajo o muy alto, el agar y otros compuestos se hidrolizan, lo que generaría un incremento de carbohidratos que impiden el crecimiento del tejido, cuando el medio tiene un pH superior a 8 e inferior a 4 este no solidifica, mientras que a un pH demasiado bajo las auxinas, giberelinas y ciertas vitaminas, son inestables y además se pueden precipitar algunas sales minerales (Pérez, 2006, pág. 87).

El rango adecuado del pH va de entre 5,6 a 6 antes de su esterilización en autoclave, para poder realizar el ajuste del pH se utilizan soluciones básicas como hidróxido de sodio e hidróxido de potasio y soluciones ácidas como el ácido clorhídrico (Pérez, 2006, pág. 87).

1.4. Medio Murashige y Skoog

Conocido como medio MS, fue reportado en 1962 por Toshio Murashige y Folke Skoog (Roca & Mroginski, 1991, pág. 41). En el Anexo 1 se puede observar la composición del medio MS, separado por Macronutrientes, Micronutrientes, Vitaminas y otros compuestos empleados.

El medio de cultivo Murashige y skoog (MS), fue desarrollado específicamente para la formación de tallos de tabaco, pero su composición resulto ser útil para muchas otras especies hasta terminar siendo el medio de cultivo más utilizado y a partir de este se han desarrollado diferentes variaciones (Pérez, 2006, pág. 92).

El medio MS presenta como características principales, el alto contenido de potasio y nitrógeno, del cual un tercio del total es aportado en forma de ion amonio reducido (Hurtado & Merino, 2001, pág. 77). Ocasionalmente el contenido de iones del medio MS supera el óptimo para el desarrollo de la especie cultivada y en estos casos se puede emplear un medio con sales a concentraciones inferiores a las normales; estas modificaciones en los macro y micronutrientes pueden llegar a la mitad o hasta incluso una menor concentración (Hurtado & Merino, 2001, pág. 77).

1.5. Fases de cultivo *in vitro*

El objetivo final del cultivo *in vitro* es la obtención de plantas completas provenientes de una planta madre, con un periodo más corto de crecimiento, sin variabilidad genética, libres de patógenos y enfermedades, y principalmente que sean beneficiosas

para la humanidad; los protocolos del cultivo *in vitro* se dividen en fases o etapas que conducirán a la obtención de microplantas (Pérez, 2006, pág. 127).

1.5.1. Fase 0: Fase preparativa

Es la fase inicial del cultivo *in vitro*, el objetivo es facilitar la realización del cultivo y es muy recomendables para la eficacia del proceso (Orqueda, 2013, pág. 13). El primer paso es la selección de la planta madre la cual debe ser una planta certificada o que demuestre estar libre de patógenos que puedan ocasionar algún tipo de contaminación en el medio (Roca & Mroginski, 1991, pág. 22).

La selección del explante depende de la especie a cultivar, de la edad y desarrollo de la planta donadora, los cuales son factores estratégicos para un efectivo cultivo *in vitro*; en general los tejidos jóvenes y segmentos nodales en crecimiento activo, son la mejor opción para la fase de establecimiento, además de que su cantidad es más accesible en las ramas de las plantas donadoras (Pérez, 2006, pág. 130). Una vez seleccionado el explante se continúa con el proceso de desinfección.

1.5.1.1. Protocolo de desinfección

El protocolo de desinfección busca garantizar el crecimiento óptimo del material vegetal, prevenir enfermedades y reducir en lo posible la cantidad superficial de patógenos; ya que el material vegetal proviene de diferentes hábitats, silvestres o controlados, se debe seleccionar los tipos de tratamientos más adecuados a utilizar (Orqueda, 2013, pág. 14).

Para plantas, especialmente de origen silvestre, es indispensable diseñar un programa de tratamientos con insecticidas, fungicidas y bactericidas con el objetivo de prevenir y combatir enfermedades y parásitos (Pérez, 2006, pág. 128).

La utilización de fungicidas se aplica principalmente a plantas silvestres, de las cuales se necesita la eliminación de hongos patógenos que se encuentran en las partes superficiales de los explantes, los fungicidas recomendados son los sistémicos de amplio espectro (Alfonso & Sandoval, 2008, pág. 51).

Como productos con actividad bactericida intensa y de amplio espectro se puede aplicar el Ácido Acético y Tetraciclina respectivamente, que ayudan a eliminar bacterias presentes en las áreas superficiales (Cordiés, Machado, & Hamilton, 1998, p. 76), (Martínez, 2013).

Uno de los agentes de esterilización más utilizado es el hipoclorito sódico que tiene una concentración del 10% de componente activo; se usa diluido a una concentración final de 1 o 2%, siendo estas concentraciones bastante eficaces; existen especies muy sensibles a este agente por lo cual se recomienda la utilización de otro agente esterilizador químico, los cuales pueden ser hipoclorito cálcico, cloruro de mercurio, agua oxigenada, nitrato de plata, entre otros (Pérez, 2006, pág. 131).

En varios protocolos se incluye una pre-esterilización con etanol al 70% y al 96% durante 5 a 10 segundos; cabe mencionar que el alcohol al 96 % es muy fuerte produciendo una excesiva deshidratación del material vegetal (Pérez, 2006, pág. 131).

Por la acción de los agentes de esterilización se pueden generar reacciones de hipersensibilidad de los explantes, al momento en que los tejidos vegetales se encuentran ante situaciones de estrés se estimula el metabolismo de los compuestos fenólicos, que son muy fácilmente oxidados y los productos provenientes de la oxidación resultan tóxicos para las células e incluso mejoran el proceso de oxidación, pudiendo convertirse en fuertes oxidantes por sí mismos (Pérez, 2006, pág. 147). Este es un problema para el establecimiento *in vitro*, muchas especies presentan una gran

cantidad de polifenoles que después del aislamiento del explante son oxidados por polifenoloxidasas, produciendo una alteración en el color, marrón o negro en los tejidos, lo que podría desembocar en necrosis celular (Pérez, 2006, pág. 147).

El lavado de los explantes con agua esterilizada es un tratamiento previo antes de la siembra, que elimina la mayor cantidad de compuestos fenólicos, pero para un mejor control de estos compuestos, se puede acudir a su adsorción mediante carbón activado o polivinil pirolidona; esta técnica es un tratamiento previo a la siembra o más comúnmente usado, incorporándolo al medio de cultivo (Pérez, 2006, pág. 147).

Otra técnica muy utilizada es la modificación del potencial redox que se puede lograr mediante el enjuague de los explantes en antioxidantes, como un tratamiento previo a la siembra, para prevenir el proceso de oxidación; entre los compuestos más utilizados encontramos al ácido ascórbico, ácido cítrico, Tiourea, L- Cistina (Pérez, 2006, pág. 147).

1.5.2. Fase 1: Fase de establecimiento *in vitro*

Esta fase consiste en que el tejido vegetal se estabilice después del estrés causado por la incisión y la desinfección, y comience su desarrollo y adaptación al medio de cultivo, donde el tejido irá absorbiendo los reguladores de crecimiento y los nutrientes presentes en el medio de cultivo (Orqueda, 2013, págs. 13-14). Existen diferentes técnicas para iniciar esta fase, a continuación se describen dos: cultivos de yemas y semillas.

1.5.2.1. Cultivo de yemas

Las yemas axilares y apicales están conformadas por células meristemáticas que son las responsables del crecimiento de la planta con capacidad de formar todos los tejidos y así generar plantas completas (Segretín, 2007, pág. 5). En la metodología se puede

especificar el cultivo de meristemos, segmentos nodales y ápices. (Hurtado & Merino, 2001, pág. 136).

Al cultivar meristemos en un medio adecuado se pueden obtener plantas completas de manera más rápida, en comparación con otras técnicas; además de ser un tejido que se perpetúa así mismo, lo que significa que se producen células con actividad meristemática (Hurtado & Merino, 2001, pág. 136).

Al aislar el meristemo apical se debe tener cuidado de no dañar la región subdistal, ya que la formación de yemas comienza cuando la incisión es profunda y afecta el tejido provascular; si este tejido permanece intacto se inicia la formación de hojas, lo que indica que los metabolitos necesarios para este desarrollo son transportados a través del parénquima de la médula y a través del tejido provascular (Hurtado & Merino, 2001, págs. 133-148).

Las yemas apicales y axilares generalmente producen plántulas en menor cantidad con respecto a otros explantes, pero con el beneficio de que son plántulas genéticamente fieles a la planta madre, es decir que no existe una variación somaclonal y se podría denominar como un proceso de clonación (Segui, 2010, pág. 295). La multiplicación de estos explantes no genera cambios trágicos en la estructura del tejido, debido a que no se desarrollan nuevos meristemos y las concentraciones de los reguladores de crecimiento son bajas, garantizando así la estabilidad genética del sistema (Pérez, 2006, pág. 150).

1.5.2.2. Cultivo de semillas

El método más común de propagación *in vitro*, es a partir de semillas en angiospermas y gimnospermas, desde la germinación hasta el establecimiento de las plántulas es el periodo más vulnerable ya que la semilla en germinación está expuesta a variaciones

de humedad y temperatura, en este periodo las plántulas se vuelven más susceptibles a daños causados por patógenos y enfermedades (Alegría, 2001, pág. 19).

En el cultivo celular se utiliza principalmente las semillas, ya que contiene el cigoto, el cual posee siempre una actividad meristemática; al contrario de los métodos tradicionales en la agricultura, esta metodología proporciona el crecimiento natural de las plántulas en un ambiente controlado y aséptico, liberando a la planta de enfermedades y patógenos (Roca & Mroginski, 1991, pág. 297).

Uno de los problemas del cultivo de semillas es la dormición de la semilla, lo que se define como la incapacidad de las semillas viables para germinar, este aspecto se debe a que los tejidos que envuelven al embrión impiden la germinación, pero para incrementar el porcentaje de germinación *in vitro*, se opta por realizar un proceso de escarificación, hidratación y exponer a horas frio para romper la latencia; la escarificación consiste en eliminar la cubierta del embrión, este proceso puede ser mecánico, químico con la aplicación de Ácido sulfúrico o físico sometiendo a la semilla a elevadas temperaturas (Alegría, 2001, pág. 19).

Dentro del cultivo *in vitro* de semillas, existe un gran interés mundial en obtener plantas transformadas genéticamente, con el propósito de generar nueva variedades que presenten resistencia a enfermedades, plagas y a condiciones ambientales extremas y de esta manera beneficiar el interés de los agricultores, distribuidores y consumidores (Segui, 2010, pág. 423).

1.5.3. Fase 2: Fase de multiplicación

El propósito de esta fase es mantener e incrementar el número de brotes o clusters para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y lograr consignar parte de ellos a las siguientes fases (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010, pág. 21).

Esta fase se lleva a cabo cuando la plántula alcanza una longitud idónea y con suficiente material vegetal, para que los nuevos brotes o tejidos obtenidos vuelvan a ser adaptados y comiencen su desarrollo nuevamente, utilizando reguladores de crecimiento para obtener un mayor número de individuos (Pérez, 2006, pág. 153).

1.5.4. Fase 3: Fase de elongación

Esta fase puede variar dependiendo de los objetivos buscados, pero esta fase por separado tiene como propósito que el tejido cultivado alcance una longitud adecuada; en algunos protocolos la fase de elongación se la puede generar simultáneamente con la fase de multiplicación o *ex vitro* (Hurtado & Merino, 2001, pág. 142).

1.5.5. Fase 4: Fase de enraizamiento

En esta fase se induce a la formación de raíces adventicias, la fase de enraizamiento puede realizarse *in vitro* o *ex vitro*; el primer caso depende directamente de la interacción de los factores de crecimiento, principalmente auxinas, para promover la rizogénesis, es importante obtener un sistema radicular funcional con el objetivo de reducir considerablemente la muerte de las plántulas al momento de trasplantar (Hurtado & Merino, 2001, pág. 143), (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010, pág. 23).

Es posible que el enraizamiento y aclimatización se logren simultáneamente cuando se produce el enraizamiento *ex vitro*, en donde raramente existe la formación de callo en la base de las estacas, otorgando así un enlace vascular continuo entre el vástago y la raíz (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010, pág. 23).

1.5.6. Fase 5: Fase de aclimatización

Es la última fase del cultivo *in vitro* y consiste en transferir una planta completa obtenida a partir de cualquier procedimiento *in vitro*, a un ambiente de alta humedad con sustrato, la cual se la conoce como cámara climática o invernadero; es una fase crítica por la alta mortalidad que se puede presentar, el éxito del cultivo *in vitro* depende de esta fase (Cubero, 2002, pág. 356), se requiere una adaptación progresiva o denominada también climatización y por último el paso a tierra, para posteriormente ser sembradas en campo (Pérez, 2006, pág. 262).

Capítulo 2

Materiales y Métodos

La presente investigación se realizó bajo la Autorización de Investigación Científica otorgada por la Dirección Provincial del Ambiente de Pichincha con N° 002 – 2017 – IC – FLO – DPAP – MA.

2.1. Localización del ensayo

La investigación se desarrolló en las instalaciones de los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, ubicado en el Campus Politécnico del Girón, en la provincia de Pichincha, Cantón Quito, Parroquia El Girón, con dirección: Av. 12 de Octubre 2422 y Wilson.

2.2. Selección, colecta y transporte del material vegetal

Las muestras de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, se colectaron en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Alóag, en la hacienda Buenos Aires (Figura 1), cuyas coordenadas son: Latitud 00°28’24” (Sur), Longitud 078°40’10” (Oeste), a una altura de 3400msnm.

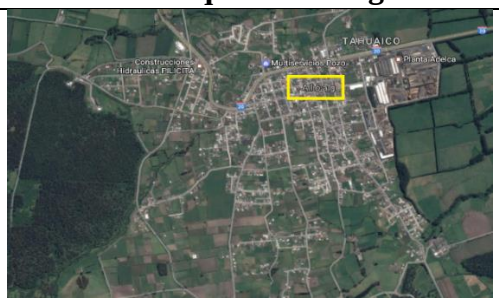
Parroquia de Alóag	Hacienda Buenos Aires
	

Figura 1. Mapa de la parroquia de Alóag y fotografía de la Hacienda Buenos Aires
Nota: Google map (2017); Realizado por los autores (2017).

Las plantas donadoras seleccionadas, presentaban un rango del 1,5m hasta los 3,0m de altura y se encontraban en estado de fructificación. De estas se recolectaron baretas de

10cm de largo aproximadamente, que presentaron entre 5 a 10 yemas axilares y apicales. Las baretas fueron cortadas mediante una podadora manual, envueltas en papel periódico húmedo, dentro de fundas plásticas negras de cocina y empaquetadas en un Culer (30cm x 50cm x 20cm), para evitar el maltrato mecánico.

También se seleccionaron frutos en estado maduro característicos por el color amarillo y de poca rigidez. Los frutos fueron recolectados con ayuda de una podadora manual y colocados en un frasco de vidrio.

Las baretas y frutos seleccionados fueron transportados por vía terrestre hasta las instalaciones de los Laboratorios de Ciencias de la Vida, en donde se los almacenó en un refrigerador a 5°C, durante 48 horas.

2.3. Fase 1: evaluación de reactivos

En esta fase se analizaron concentraciones y tiempos de exposición de los reactivos, previa la evaluación de protocolos de desinfección. Los reactivos fueron analizados para garantizar la inocuidad del tejido vegetal y para prevenir la fenolización de los mismos, con el fin de obtener tejidos viables para su establecimiento *in vitro*. Los órganos vegetales evaluados en esta fase fueron tallos y yemas de Ichul.

Los reactivos analizados fueron: fungicida, ácido acético, ácido cítrico, alcohol etílico e hipoclorito de sodio. El fungicida utilizado fue Score 250 EC, un fungicida sistémico de amplio espectro que presenta Difenoconazole como ingrediente activo, a una concentración de 250g/L (Syngenta, 2015).

2.3.1. Factores de estudio

a) Concentraciones de cada reactivo: evaluación de tres niveles para cada reactivo (C1, C2, C3).

b) Tiempos de exposición: evaluación de tres tiempos para cada reactivo (Ti1, Ti2, Ti3).

2.3.2. Tratamientos

Para identificar la concentración óptima de fungicida se sumergieron tallos (Ta) y yemas (Ye) de Ichul, en soluciones de agua destilada estéril con fungicida a tres concentraciones V/V de 0,05% (C1), 0,1% (C2) y 0,2% (C3), durante 10 (Ti1); 20 (Ti2) y 30 (Ti3) minutos, a temperatura ambiente. Los tratamientos de fungicida (TF) se codificaron desde TaF1 (TaC1Ti1) a TaF9 (TaC3Ti3) para tallos (Anexo 2), y YF1 (YeC1Ti1) a YF9 (YeC3Ti3) para yemas (Anexo 3).

Para la evaluación del ácido acético, se experimentaron tres soluciones al 0,5% (C1), 1% (C2) y 2% (C3) V/V y tres tiempos de inmersión 10 (Ti1), 20 (Ti2) y 30 (Ti3) minutos, a temperatura ambiente. Los tratamientos de ácido acético (TAA) se codificaron desde TaAA1 (TaC1Ti1) a TaAA9 (TaC3Ti3) para tallos (Anexo 4), YAA1 (YeC1Ti1) a YAA9 (YeC3Ti3) para yemas (Anexo 5).

Para la evaluación del ácido cítrico, se experimentaron tres soluciones al 50ppm (C1), 100ppm (C2) y 200ppm (C3) y tres tiempos de inmersión 10 (Ti1), 20 (Ti2) y 30 (Ti3) minutos, a temperatura ambiente. Los tratamientos de ácido cítrico (TAC) se codificaron desde TaAC1 (TaC1Ti1) a TaAC9 (TaC3Ti3) para tallos (Anexo 6) y YAC1 (YeC1Ti1) a YAC9 (YeC3Ti3) para yemas (Anexo 7).

Para la evaluación de alcohol etílico, los explantes fueron sumergidos en dos concentraciones 70% (C1) y 96% (C2), durante 30 segundos (Ti1); 1 (Ti2) y 2 (Ti3) minutos, a temperatura ambiente. Los tratamientos de Alcohol etílico (TAE) se codificaron desde TaAE1 (TaC1Ti1) a TaAE6 (TaC2Ti3) para tallos (Anexo 8) y YAE1 (YeC1Ti1) a YAE6 (YeC2Ti3) para yemas (Anexo 9).

Para la evaluación del hipoclorito de sodio, se experimentaron tres soluciones al 0,5% (C1), 1% (C2) y 1,5% (C3) V/V y tres tiempos de inmersión 5 (Ti1), 10 (Ti2) y 15 (Ti3) minutos, a temperatura ambiente. Los tratamientos de hipoclorito de sodio (TH) se codificaron desde TaAH1 (TaC1Ti1) a TaAH9 (TaC3Ti3) para tallos (Anexo 10) y YAH1 (YeC1Ti1) a YAH9 (YeC3Ti3) para yemas (Anexo 11).

2.3.3. Unidad experimental

La unidad experimental estuvo conformada por un tallo de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, de 5cm de longitud y 5mm de diámetro, con un promedio de 5 yemas.

2.3.4. Análisis estadísticos

2.3.4.1. Diseño Experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) que se dispuso en un arreglo factorial 3X3 (3 concentraciones por 3 tiempos de exposición). Con 9 tratamientos para tallos y 9 tratamientos para yemas, se realizaron por triplicado.

2.3.4.2. Análisis de varianza y análisis funcional

Se realizó el análisis de varianza (ADEVA) para identificar diferencias significativas, y el análisis funcional se efectuó mediante la prueba significativa de Duncan al 5%, para los factores en estudio y sus interacciones empleando el programa de software INFOSTAT.

Para la variación de color de tallos en hipoclorito de sodio, se realizó un análisis de varianza Kruskal Wallis al 5% por presentar datos no paramétricos, para detectar varianzas significativas empleando el programa de software INFOSTAT.

El modelo matemático utilizado fue del área bajo la curva (Figura 2).

Área bajo la curva

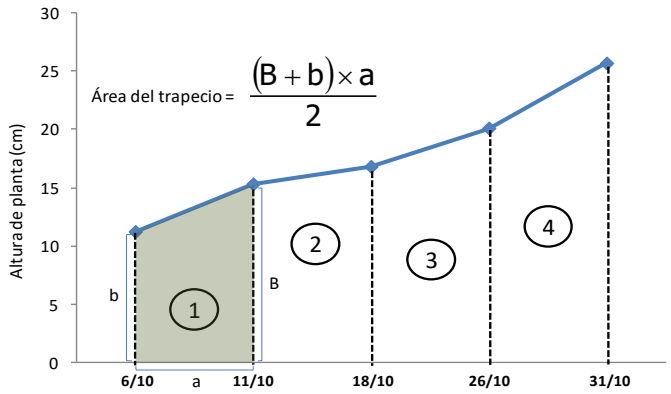


Figura 2. Cálculo del área bajo la curva
Nota: Navarro (2012).

2.3.5. Variables y métodos de evaluación

La evaluación se basó en la variación del color de cada uno de los explantes (tallos y yemas), para esto se realizó una escala colorimétrica para cada órgano vegetal (Figura 3), en donde se determinó la variación de tonalidades en relación a la concentración y el tiempo de exposición. Para el análisis estadístico, a la escala colorimétrica de cada órgano vegetal se le otorgó una escala numérica representativa, que permitió la transformación a datos numéricos.

Escala Colorimétrica

Figura 3. Escala colorimétrica para tallos y yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don
Nota: Colores (2017), Realizado por los autores (2017).

El color idóneo de cada órgano vegetal para el establecimiento *in vitro*, se representó con el mayor valor numérico, mientras más bajo era el valor numérico representativo, se advertía de daño en el tejido.

2.4. Fase 2: estandarización de un protocolo de desinfección

En esta fase se identificó la concentración de hipoclorito de sodio y alcohol etílico para establecer el protocolo de desinfección para semillas y yemas de Ichul. Los reactivos fueron analizados con el fin de garantizar la asepsia de los explantes, y para prevenir la fenolización de los mismos, con el fin de obtener tejidos viables para su establecimiento *in vitro*.

2.4.1. Factores de estudio

a) Hipoclorito de sodio: evaluación de dos concentraciones (Ch1, Ch2)
b) Alcohol etílico: evaluación de dos concentraciones (Ca1, Ca2)

2.4.2. Tratamientos

Para iniciar el protocolo de desinfección se procedió a seccionar las muestras de yemas en un tamaño promedio de 5cm y los frutos para obtener las semillas. El protocolo de desinfección común tanto para semillas como para yemas, empezó con un lavado con agua corriente durante 30 segundos, en seguida se las sumergió en una solución al 1% P/V de detergente comercial por 15 minutos. Seguidamente se procedió a realizar el tratamiento fitosanitario, sumergiendo yemas y semillas por separado en una solución de fungicida Score 250 EC al 0,2% V/V, durante una hora para semillas y 30 minutos para yemas. A continuación se realizaron 3 enjuagues consecutivos con agua destilada estéril durante 1 minuto cada uno.

Inmediatamente se sumergieron los explantes enjuagados en una solución de 200ppm de ácido cítrico más ácido acético al 2%, durante 30 minutos. A continuación se realizaron 3 enjuagues consecutivos con agua destilada estéril por 1 minuto cada uno.

La cámara de flujo laminar fue desinfectada, previo al trasladó del material vegetal; con alcohol 70% v/v, hipoclorito de sodio al 10% y exposición a luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos, junto con los materiales y reactivos a utilizarse. Dentro de la cámara de flujo laminar se realizaron los 4 tratamientos de desinfección independientemente en semillas y yemas.

Para el protocolo de desinfección se sumergieron semillas (Se) y yemas (Ye), en soluciones de agua destilada estéril con hipoclorito de sodio a dos concentraciones 1% (Ch1) y 1,5% (Ch2) durante 10 minutos y alcohol etílico a dos concentraciones, 70% (Ca1) y 96% (Ca2) durante 1 minuto. Finalmente, los explantes fueron enjuagados 3 veces con agua destilada estéril durante aproximadamente 3 minutos. Concluido el proceso de desinfección se realizó la siembra de las yemas y semillas en medio de cultivo.

Los tratamientos del protocolo de desinfección para semillas (TPS) se codificaron desde TPS1 (SeCh1Ca1) a TPS4 (SeCh2Ca2), como se puede observar en el Anexo 12. Y los tratamientos del protocolo de desinfección para yemas (TPY) se codificaron desde TPY1 (YeCh1Ca1) a TPY4 (YeCh2Ca2), como se puede observar en el Anexo 13.

2.4.3. Unidad experimental

Para las semillas, la unidad experimental estuvo conformada por 4 semillas de Ichul de 1mm de diámetro, sembradas en 1 contenedor plástico.

Para las yemas, la unidad experimental estuvo conformada por 4 explantes de yemas de Ichul de un máximo de 3cm de longitud y 5mm de diámetro, sembradas en 1 contenedor plástico.

2.4.4. Análisis estadísticos

2.4.4.1. Diseño Experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) que se dispuso en un arreglo factorial 2X2 (2 concentraciones de hipoclorito de sodio por 2 concentraciones de alcohol etílico). Se realizaron 4 repeticiones por cada tratamiento.

2.4.4.2. Análisis de varianza y análisis funcional

Se realizó el análisis de varianza (ADEVA) para identificar diferencias significativas, y el análisis funcional se efectuó mediante la prueba significativa de Duncan al 5%, para los factores en estudio y sus interacciones empleando el programa de software INFOSTAT.

Los explantes seleccionados (semillas y yemas de Ichul) debido a la diferencia morfológica y fisiológica, fueron evaluados independientemente.

2.4.5. Variables y métodos de evaluación

2.4.5.1. Porcentaje de contaminación fúngica:

Se realizó la observación visual cada 7 días, se reportó la formación de micelios en explantes y medio de cultivo hasta los 15 días. Se calificó con 0 la ausencia de contaminación fúngica, y con 1 la presencia de contaminación fúngica.

2.4.5.2. Porcentaje de contaminación bacteriana:

Se realizó la observación visual cada 7 días, se reportó la formación de colonias bacterianas en explantes y medio de cultivo hasta los 15 días. Se calificó con 0 la ausencia de contaminación fúngica, y con 1 la presencia de contaminación bacteriana.

2.4.5.3. Porcentaje de fenolización:

Se realizó mediante observación visual cada 7 días, se reportó el oscurecimiento de los explantes y la presencia de compuestos fenólicos en el medio de cultivo hasta los 15 días. Se calificó con 1 la ausencia de fenolización, con 2 la fenolización parcial del explante y con 3 la fenolización completa.

2.4.5.4. Porcentaje de mortalidad:

Se realizó mediante observación visual cada 7 días, se reportó la mortalidad de los explantes hasta los 15 días. Se calificó con 0 la supervivencia y con 1 la mortalidad del explante.

La fórmula matemática para calcular los porcentajes en todas las variables, según el modelo del ejemplo a continuación, Fórmula 1:

$$Porcentaje\ de\ mortalidad\ (\%) = \frac{Número\ de\ explantes\ muertos}{Número\ de\ explantes\ totales} X100\%$$

2.5. Fase 3: Introducción y adaptación al medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó durante esta fase fue Murashige y Skoog (MS). Se evaluó la concentración de sales (100%, 50% y 25%), para seleccionar la concentración óptima, en yemas y semillas de Ichul. El medio fue enriquecido con 30 g/L de sucrosa y 6,0 g/L de Agar, se trabajó con un pH 5,6. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 30 minutos a 121°C y 15 psi.

Las semillas fueron escarificadas con ayuda de un bisturí, en cajas Petri que contenían una solución con 50ppm de ácido cítrico para prevenir la fenolización.

Los explantes de yemas fueron cortados, con ayuda de un bisturí, su longitud varió de 1 a 4 cm, conteniendo entre 3 a 5 yemas entre apicales y/o axilares. Los cortes se realizaron bajo una solución de ácido cítrico (50ppm), para prevenir la fenolización.

Inmediatamente los explantes fueron sembrados en el medio de cultivo e incubados a dos temperaturas (8°C, 20°C), para poder identificar la temperatura óptima para el establecimiento *in vitro* del Ichul.

2.5.1. Factores de estudio

a) Concentraciones de sales MS: evaluación de 3 concentraciones de sales MS (CS1, CS2, CS3).
b) Temperaturas de exposición: evaluación de dos niveles de temperatura (TE1, TE2).

2.5.2. Tratamientos

Para seleccionar el mejor tratamiento de introducción a medio de cultivo (TIM), se sembraron semillas (Se) y yemas (Ye) del Ichul en medio MS con concentraciones de sales al 100% (CS1), 50% (CS2) y 25% (CS3), y se incubaron a temperaturas de 8°C (TE1) y 20°C (TE2).

Los tratamientos de introducción de semillas de Ichul al medio de cultivo (TIMS) se codificaron desde TIMS1 (SeCS1TE1) a TIMS6 (SeCS3TE2), (Anexo 14). Los tratamientos de introducción de yemas de Ichul al medio de cultivo (TIMY) se codificaron desde TIMY1 (YeCS1TE1) a TIMY6 (YeCS3TE2), (Anexo 15).

2.5.3. Unidad experimental

Para las semillas, la unidad experimental estuvo conformada por un contendor de 5cm de diámetro y 5cm de alto; con 50ml de medio MS, con 4 semillas de Ichul.

Para las yemas, la unidad experimental estuvo conformada por un contendor de 5cm de diámetro y 5cm de alto; con 50ml de medio MS, con 4 explantes de yema de Ichul.

2.5.4. Análisis estadísticos

2.5.4.1. Diseño Experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) que se dispuso en un arreglo factorial 3X2 (3 concentraciones de sales MS por 2 temperaturas). Se realizaron cuatro repeticiones para cada tratamiento.

2.5.4.2. Análisis de varianza y análisis funcional

Se realizó el análisis de varianza (ADEVA) para identificar diferencias significativas, y el análisis funcional se efectuó mediante la prueba significativa de Duncan al 5%, para los factores en estudio y sus interacciones empleando el programa de software INFOSTAT.

Al igual que en la fase anterior, los explantes seleccionados (yemas y semillas), se evaluaron independientemente por su diferencia morfológica y fisiológica, mediante diferentes variables.

2.5.5. Variables y métodos de evaluación

2.5.5.1. Porcentaje de germinación (semillas):

Se realizó mediante observación visual cada 7 días, se reportó la germinación de semillas hasta los 20 días. Se calificó con 0 la ausencia de actividad germinativa y con 1 la presencia de actividad germinativa.

2.5.5.2. Longitud de las plántulas (provenientes de semillas):

Se evaluó la longitud de la plántula cada 7 días hasta los 20 días, con la ayuda de una regla se midió desde la base del cotiledón de la semilla hasta el final de la radícula.

2.5.5.3. Porcentaje de brotación (yemas):

El número total de brotes fueron contabilizados cada 7 días mediante observación visual hasta los 20 días. Se calificó con 0 la ausencia de brotes y con 1 la presencia de brotes.

La fórmula matemática para calcular los porcentajes en todas las variables, según el modelo del ejemplo de la Fórmula 1.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Fase 1: análisis de reactivos

Durante la etapa de análisis de reactivos se evaluaron distintas concentraciones de reactivos de desinfección y los tiempos de inmersión, para evitar la fenolización y necrosis celular de los órganos vegetales de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don.

3.1.1. Fungicida

Para la variable coloración del tallo no se encontró diferencia significativa para la concentración de fungicida, tiempo de inmersión ni para su interacción (Tabla 2).

Para la variable coloración de yema se encontró alta diferencia significativa para el tiempo de inmersión en fungicida (*p<0,0001*); pero para la concentración de fungicida y la interacción no se encontraron diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2.

Análisis de varianza (ADEVA) para el color en tallos y yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, respecto a la exposición al fungicida.

	Coloración del Tallo					Coloración de Yema				
F.V	**SC**	**gl**	**CM**	**F**	**p-valor**	**SC**	**gl**	**CM**	**F**	**p-valor**
Modelo	8,67	8	1,08	1,95	0,1141	10,52	8	1,31	8,87	0,0001
Tiempo	2,67	2	1,33	2,40	0,1191	9,41	2	4,70	31,75	<0,0001
Concentración	2,89	2	1,44	2,60	0,1019	0,52	2	0,26	1,75	0,2021
T*C	3,11	4	0,78	1,40	0,2739	0,59	4	0,15	1,00	0,4332
Error	10	18	0,56			2,67	18	0,15		
Total	18,67	26				13,19	26			

Nota: Realizado por los autores (2017).

Según la Tabla 3, se determinó que los tratamientos de fungicida (TaF1, TaF2, TaF3), con una concentración de 0,05% hasta los 30 minutos y los tratamientos (TaF4 y TaF5), con una concentración 0,1% hasta los 20 minutos, demostraron no causar daño para tallos de Ichul y evitar problemas de fenolización; ya que presentaron un valor promedio de 5, lo que refleja que no existió variación de color (Tabla 3), manteniendo su coloración inicial, verde Chartreuse (Figura 3).

Tabla 3.
Evaluación de color respecto a las concentraciones de fungicida Score 250 EC en tallos de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	Codificación	Tiempo (min)	Concentración (%)	Color promedio	Color
TaF1	TaC1Ti1	10	0,05	5,0	5
TaF2	TaC1Ti2	20	0,05	5,0	5
TaF3	TaC1Ti3	30	0,05	5,0	5
TaF4	TaC2Ti1	10	0,1	5,0	5
TaF5	TaC2Ti2	20	0,1	5,0	5
TaF6	TaC2Ti3	30	0,1	4,0	4
TaF7	TaC3Ti1	10	0,2	4,3	4
TaF8	TaC3Ti2	20	0,2	4,3	4
TaF9	TaC3Ti3	30	0,2	4,0	4

Nota: Realizado por los autores (2017).

En la tabla 4, se observa que existen tres subconjuntos para el color de la yema en relación al tiempo de inmersión del fungicida, siendo a los 10 minutos el tiempo adecuado para prevenir la fenolización en yemas.

Se determinó que los tratamientos de fungicida (YF1 y YF4), con concentraciones de 0,05 y 0,1% hasta los 10 minutos, demostraron causar menor daño para yemas de Ichul; ya que presentaron un valor promedio de 3, lo que refleja que existió una menor variación de color (Tabla 5), pasando del color óptimo Escarlata (4), a un color Rojo (3) (Figura 3).

Tabla 4.

Promedios y prueba de significación para la variable color de las yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, para la evaluación de daño del tejido vegetal, con respecto a la acción del fúngicida.

Tiempo	Medias	E.E	Grupo		
30 minutos	1,00	0,1481	A		
20 minutos	1,78	0,1481		B	
10 minutos	2,44	0,1481			C

Nota: Promedio de letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan (≤ 0,05). Realizado por los autores (2017).

Según los tratamientos para yemas se puede evidenciar que a medida que aumenta la concentración (0,05-0,2%) y el tiempo de inmersión (10-30 minutos), se presentan mayores problemas de fenolización por los cambios de coloración. Pero Gaviria, Patiño & Saldarriaga (2013), resaltan que la utilización del fungicida químico Kocide® 101; a una concentración a la mitad de la recomendada comercialmente (1230ppm), se obtiene un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del 100% y un porcentaje de inhibición de la biomasa del 69% para *C. gloeosporioides;* mientras que para *C. acutatum* obtuvieron un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del 100%, pero un porcentaje de inhibición de la biomasa del 31%; y a una concentración superior a la recomendada comercialmente (3690ppm), se obtiene un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del 100% para ambas especies y un porcentaje de inhibición de la biomasa del 96% para *C. gloeosporioides* y 86,3% para *C. acutatum*; concentraciones entre los 1000ppm y 4000ppm de fungicidas químicos, inhiben en mayor medida el crecimiento micelial y la biomasa de hongos.

Tabla 5.

Evaluación de color respecto a las concentraciones de fungicida Score 250 EC en yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	Codificación	Tiempo (min)	Concentración (%)	Color promedio	Color
YF1	YeC1Ti1	10	0,05	2,7	3
YF2	YeC1Ti2	20	0,05	2,0	2
YF3	YeC1Ti3	30	0,05	1,0	1
YF4	YeC2Ti1	10	0,1	2,7	3
YF5	YeC2Ti2	20	0,1	1,7	2
YF6	YeC2Ti3	30	0,1	1,0	1
YF7	YeC3Ti1	10	0,2	2,0	2
YF8	YeC3Ti2	20	0,2	1,7	2
YF9	YeC3Ti3	30	0,2	1,0	1

Nota: Realizado por los autores (2017).

En el área bajo la curva de la variación de color se puede observar que la concentración óptima de fungicida es de 0,05%, obteniendo la mayor área total de 150 para tallos y 68,3 para yemas, indicando menor variación en la coloración (Anexo 16). Dado que la yema de Ichul es el órgano vegetal de interés por la presencia de células meristemáticas, se determinó que las 3 concentraciones de 0,05%, 0,1% y 0,2% de fungicida Score 250 EC presentaron un similar efecto en la variación de color de yemas, determinando así que a cualquier concentración se obtendrán los mismos efectos, pero dependerá directamente del tiempo de inmersión el daño efectuado (Figura 4).

Tanto para yemas como para semillas se seleccionó una inmersión durante 30 minutos en fungicida Score 250 EC, para estandarizar el protocolo de desinfección con una concentración de 0,2% de fungicida, para asegurar en mayor proporción la inocuidad de los explantes, debido a que su ficha técnica especifica que la máxima absorción se alcanza en 2 horas a una dosis de 0,2% (Syngenta, 2015). Vaca (2008), recomienda la adición de Benlate 1000ppm (0,1%) por una hora, en su protocolo de desinfección de yemas de Babaco, ya que sus explantes no presentaron contaminación fúngica ni

mortalidad, sin embargo indica que exposiciones de 20 minutos presentaron problemas de contaminación.

Variación de color de tallo y yema de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

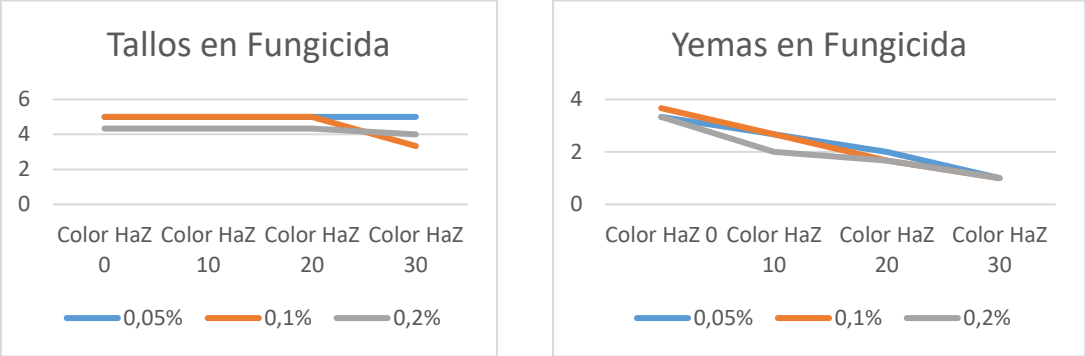


Figura 4. Variación de color de tallo y yema de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, con respecto al tiempo de inmersión y concentraciones de fungicida Score 250 EC.
Nota: Realizado por los autores (2017).

Fungicida Score 250 EC, cuyo principio activo es el difenoconazol, actúa en el crecimiento subcuticular de las hifas, además de ser absorbido de manera rápida por la planta pero presenta una toxicidad moderada, por lo que recomienda su aplicación con una concentración de 0,1% (Chuquimarca, 2011, pág. 54). Además, el difenoconazol pertenece al grupo de los Triazoles, que inhiben la biosíntesis de enzimas, interrumpiendo la formación de la membrana celular y reduciendo el crecimiento del hongo (Viera, 2002). Sin embargo en ensayos previos de la investigación, se determinó que a concentraciones menores, existían problemas de contaminación fúngica con un porcentaje del 100%, por lo que se seleccionó la concentración al 0,2% para evitar la contaminación fúngica.

3.1.2. Ácido acético

Para la variable coloración del tallo se encontró diferencia significativa para la concentración de ácido acético (*p=0,0016*), sin embargo para el tiempo de inmersión en ácido acético y la interacción no se encontraron diferencias significativas (Tabla 6).

Para la variable coloración de yema no se encontró diferencia significativa para la concentración de ácido acético, tiempo de inmersión ni para su interacción (Tabla 6).

Tabla 6.

Análisis de varianza (ADEVA) para el color en tallos y yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, respecto a la exposición a ácido acético.

	Análisis de Varianza para Tallos					Análisis de Varianza para Yemas				
F.V	**SC**	**gl**	**CM**	**F**	**p-valor**	**SC**	**gl**	**CM**	**F**	**p-valor**
Modelo	23,19	8	2,90	2,45	0,0549	0,67	8	0,08	0,20	0,9862
Tiempo	0,30	2	0,15	0,12	0,8833	0,22	2	0,11	0,27	0,7644
Concentración	22,30	2	11,15	9,41	0,0016	0,00	2	0,00	0,00	>0,9999
T*C	0,59	4	0,15	0,13	0,9715	0,44	4	0,11	0,27	0,8917
Error	21,33	18	1,19			7,33	18	0,41		
Total	44,52	26				8,00	26			

Nota: Realizado por los autores (2017).

En la tabla 7, se observa que existen dos subconjuntos para la concentración de ácido acético, siendo las concentraciones a 1% y 2% las adecuadas para prevenir la fenolización en tallos.

Tabla 7.

Promedios y prueba de significación para la variable color de los tallos de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, para la evaluación de daño del tejido vegetal, con respecto a la acción de ácido acético.

Concentración	Medias	E.E	Grupo
0,5%	2,44	1,1852	A
1%	3,67	1,1852	B
2%	4,67	1,1852	B

Nota: Promedio de letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan (≤ 0,05). Realizado por los autores (2017).

Los tratamientos de ácido acético TaAA1, TaAA2 y TaAA3 (2%), demostraron ser los adecuados para evitar problemas de fenolización en tallos de Ichul, ya que presentaron

un valor promedio de 5, lo que refleja que no existió variación de color (Tabla 8), manteniendo su coloración Cartreuse (Figura 3).

Tabla 8.

Evaluación de color respecto a las concentraciones de ácido acético en tallos de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	codificación	Tiempo (min)	Concentración (%)	Color promedio	Color
TaAA1	TaC1Ti1	10	2	4,7	5
TaAA2	TaC1Ti2	20	2	4,7	5
TaAA3	TaC1Ti3	30	2	4,7	5
TaAA4	TaC2Ti1	10	1	3,7	4
TaAA5	TaC2Ti2	20	1	3,7	4
TaAA6	TaC2Ti3	30	1	3,7	4
TaAA7	TaC3Ti1	10	5,0	2,7	3
TaAA8	TaC3Ti2	20	5,0	2,7	3
TaAA9	TaC3Ti3	30	5,0	2	2

Nota: Realizado por los autores (2017).

El tratamiento YAA1 para yemas, demostró presentar el menor cambio de coloración, a pesar de que no existieron diferencias estadísticas entre tratamientos. Existió una ligera variación de color de las yemas (Tabla 9), pasando del color óptimo Escarlata (4) hasta el color Rojo (3) (Figura 3).

Se obtuvo la tasa más baja de variación de color en la concentración 2% de ácido acético tanto para tallos como para yemas (Tablas 8 y 9, Anexo 17), se exhibe el área bajo la curva con respecto a las concentraciones de ácido acético, definiendo el mayor área total de 140 para tallos y 95 para yemas. Dado que la yema del Ichul es el órgano vegetal de interés por la presencia de células meristemáticas, se determinó que las 3 concentraciones 2%, 1% y 0,5% de ácido acético a los 30 minutos, fueron iguales estadísticamente en la variación de color de yemas, determinando así que a cualquier concentración se obtuvieron los mismos efectos (Anexo18).

Tabla 9.

Evaluación de color respecto a las concentraciones de ácido acético en yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	codificación	Tiempo (min)	Concentración (%)	Color promedio	Color
YAA1	YeC1Ti1	10	2	3,3	3
YAA2	YeC1Ti2	20	2	3	3
YAA3	YeC1Ti3	30	2	3	3
YAA4	YeC2Ti1	10	1	3	3
YAA5	YeC2Ti2	20	1	3	3
YAA6	YeC2Ti3	30	1	3	3
YAA7	YeC3Ti1	10	0,5	3	3
YAA8	YeC3Ti2	20	0,5	3	3
YAA9	YeC3Ti3	30	0,5	3	3

Nota: Realizado por los autores (2017).

Estos resultados demostraron que a mayores concentraciones de ácido acético los tallos y yemas de Ichul se conservan viables sin importar el tiempo de inmersión por lo que se optó por sumergir los explantes a una concentración de 2% de ácido acético durante 30 minutos para la estandarización del protocolo de desinfección. Bonga & Durzan (1982), citado en Azofeifa (2009), recomiendan utilizar ácido ascórbico más ácido acético como solución antioxidante para mantener viables los explantes desde que son separados de la planta donadora hasta el establecimiento *in vitro*. El ácido acético se caracteriza por ser un agente fijador, es decir que permite mantener la estructura celular (Molist & Pombal, 2016).

3.1.3. Ácido cítrico

Para las variables coloración de tallo y yema no se encontró diferencia significativa para la concentración de ácido cítrico, tiempo de inmersión ni para su interacción (Tabla 10).

Tabla 10.
Análisis de varianza (ADEVA) para el color en tallos y yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, respecto a la exposición a ácido cítrico.

	Análisis de Varianza para Tallos					Análisis de Varianza para Yemas				
F.V	**SC**	**gl**	**CM**	**F**	**p-valor**	**SC**	**gl**	**CM**	**F**	**p-valor**
Modelo	6,07	8	0,76	0,57	0,7893	3,33	8	0,42	0,80	0,6077
Tiempo	0,07	2	0,04	0,03	0,9726	0,89	2	0,44	0,86	0,4410
Concentración	5,85	2	2,93	2,19	0,1403	2,00	2	1,00	1,93	0,1742
T*C	0,15	4	0,04	0,03	0,9984	0,44	4	0,11	0,21	0,9271
Error	24,00	18	1,33			9,33	18	0,52		
Total	30,07	26				12,67	26			

Nota: Realizado por los autores (2017).

Los tratamientos de ácido cítrico TaAC4 al TaAC9, demostraron ser los adecuados para evitar problemas de fenolización en tallos de Ichul, ya que no hay diferencia estadística. Sin embargo se observa ligera variación de color del tallo (Figura 3), pasando del color Chartreuse (5) al color Verde manzana (3).

Tabla 11.
Evaluación de color respecto a las concentraciones de ácido cítrico en tallos de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	codificación	Tiempo (min)	Concentración (ppm)	Color promedio	Color
TaAC1	TaC1Ti1	10	200	3,3	3
TaAC2	TaC1Ti2	20	200	3,3	3
TaAC3	TaC1Ti3	30	200	3,3	3
TaAC4	TaC2Ti1	10	100	3,7	4
TaAC5	TaC2Ti2	20	100	3,7	4
TaAC6	TaC2Ti3	30	100	3,7	4
TaAC7	TaC3Ti1	10	50	4,7	5
TaAC8	TaC3Ti2	20	50	4,3	4
TaAC9	TaC3Ti3	30	50	4,3	4

Nota: Realizado por los autores (2017).

El mayor valor numérico se presentó en el tratamiento TaAC7 con un promedio de 4,7 (Tabla 11), manteniendo su coloración Chartreuse (5) (Figura 3).

Esto evidencia que los tallos expuestos a soluciones menos concentradas y menor tiempo de exposición se afectan menos, sin embargo en el cultivo de tejido por los cortes que se causan al explante, el mismo se fenoliza requiriendo la aplicación de antioxidantes como el ácido cítrico (Valdez, *et al.*, 2002, p. 32). Esto se puede deber a la fisiología del tallo, dado que es un órgano diferenciado, que se encarga de la conducción y almacén de sustancias, por ende se pueden generar reacciones químicas adversas (Megías, Molist, & Pombal, 2015, pág. 4).

Los tratamientos de ácido cítrico YAC1 y YAC2 (200ppm), fueron adecuados por causar menores problemas de fenolización en yemas de Ichul al existir una menor variación de color, pasando del color Escarlata (4) al color Rojo (3) (Figura 3). Pero en ácido cítrico 50ppm durante 20 y 30 minutos, se demostró que a menores concentraciones existió mayor variación de coloración ya que pasaron de Escarlata (4) a Carmín (2) (Tabla 12).

Tabla 12.

Evaluación de color respecto a las concentraciones de ácido cítrico en yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	codificación	Tiempo (min)	Concentración (ppm)	Color promedio	color
YAC1	YeC1Ti1	10	200	3	3
YAC2	YeC1Ti2	20	200	3	3
YAC3	YeC1Ti3	30	200	2,6	3
YAC4	YeC2Ti1	10	100	2,6	3
YAC5	YeC2Ti2	20	100	2,6	3
YAC6	YeC2Ti3	30	100	2,6	3
YAC7	YeC3Ti1	10	50	2,6	3
YAC8	YeC3Ti2	20	50	2	2
YAC9	YeC3Ti3	30	50	2	2

Nota: Realizado por los autores (2017).

Se obtuvo la tasa más baja de variación en la concentración 50ppm para tallos, debido a que su área total fue de 135, para yemas la tasa más baja de variación se logró a 200 ppm de ácido cítrico, con un mayor área total fue de 88,3 (Anexo 19).

Los resultados revelaron que la concentración de ácido cítrico y el tiempo de inmersión, no son diferentes estadísticamente sobre la viabilidad de tallos y yemas de Ichul, sé seleccionó la aplicación de 200ppm de ácido cítrico para estandarizar el protocolo de desinfección, ya que la yema presenta menor daño a esta concentración. Estos resultados son respaldados gracias a las funciones del ácido cítrico como agente secuestrante de iones metálicos, antioxidante y acidificante disminuyendo el pH, inactivando enzimas oxidativas (Muñoz, Sáenz, López, Cantú, & Barajas, 2014, pág. 22), evitando el daño del tejido.

Vega *et al*., (2007), demostró en su investigación que 300ppm de ácido cítrico resultó eficiente para evitar la oxidación de compuestos fenólicos, como un tratamiento posterior al protocolo de desinfección, los explantes enjuagados durante 5 minutos con una solución de ácido cítrico y ácido ascórbico presentaron 56,8% de explantes necróticos, comparado con el tratamiento donde no se utilizó el enjuague con la solución antioxidante, que presento 71,2% de explantes necróticos, por lo cual recomienda la aplicación de soluciones antioxidantes durante un tiempo mayor a 5 minutos, para reducir el porcentaje de explantes necróticos (Vega, *et al.*, 2007, p. 108). Para reducir la cantidad de explanes necróticos, se determinó la aplicación de ácido cítrico durante un tiempo de exposición de 30 minutos.

3.1.4. Alcohol etílico

Para la variable coloración del tallo no se encontró diferencia significativa para la concentración de alcohol etílico, tiempo de inmersión ni para su interacción (Tabla 13).

Para la variable coloración de yema se encontró alta diferencia significativa para el tiempo de inmersión en alcohol etílico (*p<0,0001*), sin embargo para la concentración de alcohol etílico y la interacción no se encontraron diferencias significativas (Tabla 13).

Tabla 13.

Análisis de varianza (ADEVA) para el color en tallos y yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, respecto a la exposición a alcohol etílico.

	Análisis de Varianza para Tallos					**Análisis de Varianza para Yemas**				
F.V	**SC**	**Gl**	**CM**	**F**	**p-valor**	**SC**	**Gl**	**CM**	**F**	**p-valor**
Modelo	0,28	5	0,06	1,00	0,4582	3,61	5	0,72	13,00	0,0002
Tiempo	0,11	2	0,06	1,00	0,9366	3,44	2	1,72	31,00	<0,0001
Concentración	0,06	1	0,06	1,00	0,3370	0,06	1	0,06	1,00	0,3370
T*C	0,11	1	0,06	1,00	0,3966	0,11	1	0,06	1,00	0,3966
Error	0,67	12	0,06			9,33	18	0,52		
Total	0,94	17				12,67	26			

Nota: Realizado por los autores (2017).

El tratamiento de alcohol etílico (TaAE1), demostró evitar problemas de fenolización en los tallos de Ichul, ya que presentó un valor promedio de 4,3, lo que refleja que existió ligera variación de color (Tabla 14), pasando de un color Chartreuse (5) a un color Verde manzana (4) (Figura 3).

Tabla 14.

Evaluación de color respecto a las concentraciones de alcohol etílico en tallos de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	codificación	Tiempo (seg,min)	Concentración (%)	Color promedio	color
TaAE1	TaC1Ti1	30	70	4,3	4
TaAE2	TaC1Ti2	1	70	4	4
TaAE3	TaC1Ti3	2	70	4	4
TaAE4	TaC2Ti1	30	96	4	4
TaAE5	TaC2Ti2	1	96	4	4
TaAE6	TaC2Ti3	2	96	4	4

Nota: Realizado por los autores (2017).

En la tabla 15, se observa que existen dos subconjuntos para el tiempo de inmersión en alcohol etílico, siendo 30 segundos y 1 minuto los tiempos adecuados para prevenir la fenolización en yemas.

Tabla 15.

Promedios y prueba de significación para la variable color de las yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, para la evaluación de daño del tejido vegetal, con respecto a la acción del alcohol etílico.

Tiempo	Medias	n	E.E	Grupo	
2 minutos	2,00	6	0,0556	A	
1 minuto	2,83	6	0,0556		B
30 segundos	3,00	6	0,0556		B

Nota: Promedio de letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan (≤ 0,05). Realizado por los autores (2017).

Los tratamientos de alcohol etílico YAE1, YAE2, YAE4 y YAE5, demostraron que el alcohol etílico a concentraciones de 70 y 96% durante 30 segundos y 1 minuto, presentan menos variación de la coloración (Tabla 16), pasando de un color Escarlata (4), a un color Rojo (3) (Figura 3), por lo que son los tratamientos recomendados para yemas de Ichul.

Tabla 16.

Evaluación de color respecto a las concentraciones de alcohol etílico en yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	codificación	Tiempo (seg,min)	Concentración (%)	Color promedio	color
YAE1	YeC1Ti1	30	70	3	3
YAE2	YeC1Ti2	1	70	3	3
YAE3	YeC1Ti3	2	70	2	2
YAE4	YeC2Ti1	30	96	3	3
YAE5	YeC2Ti2	1	96	3	3
YAE6	YeC2Ti3	2	96	2	2

Nota: Realizado por los autores (2017).

Mediante el cálculo del área bajo la curva se determinó que la concentración al 70% de alcohol etílico fue la óptima tanto para tallos como para yemas, ya que su mayor área total fue de 8,3 para tallos y 5,8 para yemas (Anexo 20). Dado que la yema del Ichul es el órgano vegetal de interés por la presencia de células meristemáticas, se determinó que las concentraciónes de 96% y 70% de alcohol etílico durante 1 minuto, llegaron a obtener el mismo efecto en la variación de color de yemas.

En yemas se diferenció que hasta el minuto de inmersión no existe un elevado porcentaje de fenolización, por lo cual este efecto puede ser controlable, por ende las concentraciones al 70% y 96% de alcohol etílico durante 1 minuto, se emplearon como tratamientos para la estandarización de un protocolo de desinfección de explantes de Ichul.

Según Morales (2016), reconoce que el alcohol etílico posee propiedades antisépticas y desinfectantes; y que la utilización de este reactivo durante 30 a 60 segundos proporciona un porcentaje de contaminación hasta el 10%, lo cual es un porcentaje aceptable en este tipo de investigaciones.

Smith (2000©), el alcohol etílico al 70% (V/V), se utiliza para limpiar tejidos vegetales previo a la desinfección durante un tiempo de exposición entre 1 a 5 minutos, antes o

después de la aplicación con hipoclorito de sodio. Benavides & Córdova (2015), detallan que los mejores tratamientos de desinfección de *Geranium chilloense* fueron los tratamientos P1 y P3, el primero se basó en la aplicación de alcohol etílico al 96% durante 10 segundos, obteniendo 0% de contaminación bacteriana y con un porcentaje de germinación del 32%, y el segundo, consistió en la aplicación de etanol al 70% durante 1 minuto, resultando 3% de contaminación bacteriana y fúngica, con un 29% de germinación.

3.1.5. Hipoclorito de sodio

Aplicando el análisis de varianza Kruskal Wallis de las concentraciones efectuadas se obtuvo un valor $H=13,5$ y $p=0,0011$, por lo que se determina que hay alta diferencia significativa de las concentraciones de hipoclorito de sodio en cuanto a la variación de color en el tallo.

La prueba de Kruskal Wallis reveló que los tratamientos TaAH1 al TaAH7, son los recomendados, ya que conforman el mismo subgrupo (Tabla 17).

Los tratamientos de hipoclorito de sodio TaAH1 al TaAH7, demostraron ser adecuados para evitar problemas de fenolización en tallos de Ichul, ya que presentaron un valor promedio de 3, lo que refleja menor variación de color pasando de un color Verde manzana (4) a un color Verde palta (3), excepto en la interacción 1,5% a 10 y 15 minutos, (Tabla 17), pasando de un color Verde manzana (4) a un color Oliva (2) (Figura 3).

Tabla 17.

Evaluación de color respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio en tallos de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	codificación	Tiempo (min)	Concentración (%)	Ranks		Color promedio	Color
TaAH1	TaC1Ti1	5	0,5	17,00	B	3	3
TaAH2	TaC1Ti2	10	0,5	17,00	B	3	3
TaAH3	TaC1Ti3	15	0,5	17,00	B	3	3
TaAH4	TaC2Ti1	5	1	17,00	B	3	3
TaAH5	TaC2Ti2	10	1	17,00	B	3	3
TaAH6	TaC2Ti3	15	1	17,00	B	3	3
TaAH7	TaC3Ti1	5	1,5	17,00	B	3	3
TaAH8	TaC3Ti2	10	1,5	3,50	A	2	2
TaAH9	TaC3Ti3	15	1,5	3,50	A	2	2

Nota: Realizado por los autores (2017).

Para la variable coloración de yema se encontró diferencia significativa para el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio (*p<0,0001*), sin embargo para su concentración y la interacción no se encontraron diferencias significativas (Tabla 18).

Tabla 18.

Análisis de varianza (ADEVA) para el color en yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, respecto a la exposición a hipoclorito de sodio.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20,67	8	2,58	34,88	<0,0001
Tiempo	20,22	2	10,11	136,50	<0,0001
Concentración	0,22	2	0,11	1,50	0,2467
T*C	0,22	4	0,06	0,75	0,5708
Error	1,33	18	0,07		
Total	22,00	26			

Nota: Realizado por los autores (2017).

En la Tabla 19, se observa que existen tres subconjuntos para el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio, siendo los 5 minutos el tiempo óptimo para prevenir la fenolización en yemas y los 15 minutos como el tiempo que presentó mayor afección en yemas de Ichul.

Tabla 19.

Promedios y prueba de significación para la variable color de las yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, para la evaluación de daño del tejido vegetal, con respecto a la acción del hipoclorito de sodio.

Tiempo	Medias	n	E.E	Grupo		
15 minutos	1,00	9	0,0741	A		
10 minutos	1,89	9	0,0741		B	
5 minutos	3,11	9	0,0741			C

Nota: Promedio de letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan (≤ 0,05). Realizado por los autores (2017).

Los tratamientos a concentraciones de 0,5; 1 y 1,5% durante 5 minutos (YAH1, YAH4 y YAH7), fueron los tratamientos que presentaron menor cambio en la variación de color en yemas (Tabla 20), pasando de un color Escarlata (4) a un color Rojo (3), seguidos por los tratamientos a concentraciones de 0,5; 1 y 1,5 % durante 10 minutos (YAH2, YAH5, YAH9), pasando de un color Escarlata (4) a un color Carmin (2) (Figura 3).

Tabla 20.

Evaluación de color respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio en yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	codificación	Tiempo (min)	Concentración (%)	Color promedio	Color
YAH1	YeC1Ti1	5	0,5	3	3
YAH2	YeC1Ti2	10	0,5	2	2
YAH3	YeC1Ti3	15	0,5	1	1
YAH4	YeC2Ti1	5	1	3	3
YAH5	YeC2Ti2	10	1	1,66	2
YAH6	YeC2Ti3	15	1	1	1
YAH7	YeC3Ti1	5	1,5	3	3
YAH8	YeC3Ti2	10	1,5	2	2
YAH9	YeC3Ti3	15	1,5	1	1

Nota: Realizado por los autores (2017).

Según la Tabla 20, se puede determinar que a medida que aumenta la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión, son más susceptibles las yemas de Ichul a presentar fenolización. Benavides & Córdova (2015), demostraron en su

investigación que la aplicación de hipoclorito de sodio a elevadas concentraciones (50%) reducía el porcentaje de contaminación fúngica, pero presentaba mayor porcentaje de contaminación bacteriana, fenolización del explante y menor valor de sobrevivencia, por lo que no se recomienda la más alta concentración de hipoclorito de sodio (1,5%). Borges, Estrada, Pérez, & Meneses (2009), demostraron en su investigación que a mayor concentración de hipoclorito de sodio y a mayor tiempo de inmersión aumenta la fenolización, seguida de la necrosis celular, provocado por el efecto fitotóxico intensificado a una concentración al 2%.

Aguilar, Ulloa e Hidalgo (2009), recomiendan diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio con un tiempo común de 10 minutos, para una desinfección óptima.

3.2. Fase 2: estandarización de un protocolo de desinfección

En esta fase se evaluó la contaminación fúngica y bacteriana, fenolización y mortalidad de los explantes de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, introducidas en medio de cultivo, aplicando como tratamientos hipoclorito de sodio y alcohol etílico a distintas concentraciones.

A continuación se presentan los resultados por cada variable evaluada.

3.2.1. Porcentaje de contaminación fúngica para semillas:

Al analizar la contaminación fúngica se encontró diferencia significativa para los tratamientos (*p=0,0211*) (Tabla 21).

Tabla 21.

Análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de contaminación fúngica en semillas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	694,44	6	115,74	3,00	0,0677
Tratamiento	625,00	3	208,33	5,40	0,0211
Error	347,22	9	38,58		
Total	1041,67	15			

Nota: Realizado por los autores (2017).

3.2.2. Porcentaje de contaminación bacteriana para semillas:

En la variable contaminación bacteriana no se presenta varianza significativa en los tratamientos para semillas al presentar 0% de contaminación por lo que se descartó la aplicación del análisis de varianza y el análisis funcional de Duncan (Tabla 22).

3.2.3. Porcentaje de fenolización para semillas:

En las semillas, los cuatro tratamientos no presentaron varianza significativa dado que presentaron un 0% de fenolización, por lo que se descartó la aplicación del análisis de varianza y el análisis funcional propuesto por Duncan (Tabla 22).

3.2.4. Porcentaje de mortalidad para semillas:

En las semillas, los cuatro tratamientos no presentaron varianza significativa dado que presentaron un 0% de mortalidad, por lo que se descartó la aplicación del análisis de varianza y el análisis funcional propuesto por Duncan (Tabla 22).

Tabla 22.

Promedio de contaminación fúngica, contaminación bacteriana y la fenolización de semillas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, con respecto a las concentraciones de Hipoclorito de sodio y Alcohol etílico.

	Concentración (%)		Contaminación (%)				
Tratamiento	**Hipoclorito de sodio**	**Alcohol etílico**	**Fúngica**		**Bacteriana**	**Fenolización (%)**	**Mortalidad (%)**
TPS1	1,00	70	4,16	A	0,00	0,00	0,00
TPS2	1,00	96	0,00	A	0,00	0,00	0,00
TPS3	1,50	70	4,16	A	0,00	0,00	0,00
TPS4	1,50	96	16,66	B	0,00	0,00	0,00

Nota: Promedio de letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan (≤ 0,05). Realizado por los autores (2017).

En las semillas se presentó contaminación fúngica en 3 de los 4 tratamientos. El tratamiento idóneo para contrarrestar la contaminación fúngica completamente fue el tratamiento TPS2 (Figura 5), que se basó en sumergir las semillas de Ichul en 1% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos y 96% de alcohol etílico durante 1 minuto, presentando 0% de contaminación (Tabla 22).

La interacción del hipoclorito de sodio y el alcohol etílico en todas las concentraciones analizadas durante el tiempo de inmersión establecido, demostraron ser 100% eficaces en la eliminación de la contaminación bacteriana para semillas de Ichul. Esto debido a la desnaturalización de proteínas bacterianas que se efectúa en concentraciones del 70% al 96% de alcohol etílico, esta desnaturalización solo se da en presencia de agua, por este motivo una concentración al 100% de alcohol etílico presenta una actividad antibacteriana mucho menor (Alba & Araujo, 2008, pág. 26).

Respecto al hipoclorito de sodio, el efecto germicida recae en la actividad oxidativa de enzimas esenciales, y además de generar cambios en la permeabilidad de la membrana celular de las bacterias, es por ello que bacterias Gram positivas y Gram negativas son muy susceptibles al hipoclorito de sodio (Alba & Araujo, 2008, pág. 26).

Jiménez (2016), especifica que la semilla se encarga de proteger el embrión de la planta cuando las condiciones no son favorables, específicamente la testa que es la parte externa de la semilla, la cual tiene la cualidad de ser rígida, proporciona al embrión protección a agentes externos y cuando este sale de la fase de latencia, la germinación del embrión rompe el epispermo o la testa, la cual no genera compuestos fenólicos, obteniendo 0% de fenolización y por ende un 0% de mortalidad.

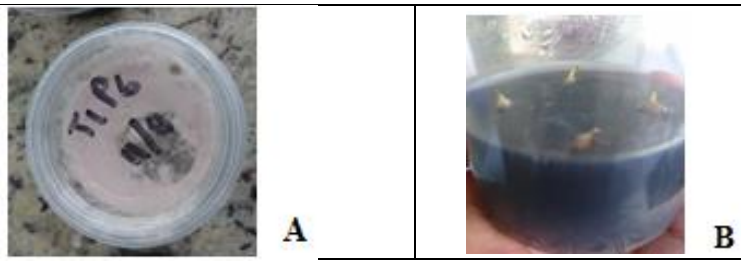


Figura 5. A) Semillas contaminadas de tratamientos previos, B) semillas sin contaminación del tratamiento TPS2.
Nota: Realizado por los autores (2017).

3.2.5. Porcentaje de contaminación fúngica para yemas :

En las yemas, los cuatro tratamientos no presentaron varianza significativa dado que presentaron un 0% de contaminación por lo que se descartó la aplicación del análisis de varianza y el análisis funcional propuesto por Duncan (Tabla 25).

3.2.6. Porcentaje de contaminación bacteriana para yemas:

En la variable contaminación bacteriana no se presenta varianza significativa para los tratamientos tanto para los explantes de semillas como para yemas de Ichul por presentar 0% de contaminación (Tabla 25).

3.2.7. Porcentaje de fenolización yemas:

Aplicando el análisis de varianza se obtuvo un valor $p=0,7431$, por lo que se determina que no hay diferencia significativa de los tratamientos con hipoclorito de sodio y alcohol etílico para la variable fenolización de yemas de Ichul. (Tabla 23).

Tabla 23.

Análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de fenolización de yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	339,51	6	56,58	0,66	0,6842
Tratamiento	108,02	3	36,01	0,42	0,7431
Error	771,60	9	85,73		
Total	1111,11	15			

Nota: Realizado por los autores (2017).

El tratamiento TPY3 fue el que presentó un menor porcentaje de fenolización de yemas de Ichul con el 65,28% (Tabla 25).

3.2.8. Porcentaje de mortalidad yemas:

Aplicando el análisis de varianza se obtuvo un valor *p=0,8661*, por lo que se determina que no hay diferencia significativa de los tratamientos con hipoclorito de sodio y alcohol etílico para la variable mortalidad de yemas de Ichul (Tabla 24).

Tabla 24.

Análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de mortalidad de yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1493,06	6	248,84	0,38	0,8725
Tratamiento	468,75	3	156,25	0,24	0,8661
Error	5850,69	9	650,08		
Total	7343,45	15			

Nota: Realizado por los autores (2017).

Los tratamientos TPY1 y TPY3 fueron los tratamientos que presentaron menor porcentaje de mortalidad (8,33%), siendo los tratamientos recomendados para tener bajos porcentajes de mortalidad en yemas de Ichul.

Tabla 25.

Porcentajes de contaminación fúngica, contaminación bacteriana, fenolización y mortalidad de yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, con respecto a las concentraciones de Hipoclorito de sodio y Alcohol etílico.

		Concentración (%)		Contaminación (%)			
Tratamiento	**Codificación**	**Hipoclorito de sodio**	**Alcohol etílico**	**Fúngica**	**Bacteriana**	**Fenolización (%)**	**Mortalidad (%)**
TPY1	YeCh1Ca1	1	70	0	0	69,44	8,33
TPY2	YeCh1Ca2	1	96	0	0	72,22	16,66
TPY3	YeCh2Ca1	1,5	70	0	0	65,28	8,33
TPY4	YeCh2Ca2	1,5	96	0	0	70,83	20,83

Nota: Realizado por los autores (2017).

Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, resultó ser una especie muy susceptible a reactivos con actividad oxidativa, como el hipoclorito de sodio que su capacidad antibacteriana se basa en la oxidación del cloro, siendo una fuente de oxidación alterna promoviendo la fenolización de los tejidos (Alba & Araujo, 2008, pág. 27).

El alcohol etílico evaluado en los tratamientos, varió en una concentración del 70 al 96%; Vignoli (2006), indica que el alcohol promueve la fenolización de tejidos a concentraciones del 60% al 90% como consecuencia de su mecanismo de acción, que deshidrata de una manera excesiva a las bacterias pero también provoca la deshidratación de tejidos vegetales, iniciando de esa forma la necrosis celular. Razón por la cual, las yemas presentaron tejido fenolizado.

La muerte de los tejidos vegetales se presentó exclusivamente en yemas de Ichul con un máximo de 20% (Figura 6), aunque el porcentaje de mortalidad de las yemas no es elevado, está altamente relacionado a la fenolización del tejido (Azofeifa, 2009, pág. 167). Ayala (2011), demuestra que al usar hipoclorito de sodio al 2% se logra contrarrestar la contaminación pero la sobrevivencia de explantes se ve afectada. Como se mencionó anteriormente para yemas, el hipoclorito de sodio y el alcohol etílico en todas las concentraciones analizadas durante el tiempo de inmersión

establecido, demostraron ser 100% eficaces en la eliminación de la contaminación bacteriana para semillas de Ichul. Borges, Estrada, Pérez & Meneses (2009), observó que mientras la concentración y el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio aumenta, se disminuye el procentaje de contaminación pero incrementa el procentaje de necrosis, debido al efecto fitotóxico que posee el hipoclorito de sodio a partir de una concentración del 2%.

Smith (2000©), menciona que el hipoclorito de sodio se utiliza del 5 al 25% (V/V), durante un tiempo de exposición de 5 a 30 minutos, seguidos por un máximo de 5 enjuagues con agua estéril. Benavides & Córdova (2015), especifican que los mejores tratamientos de desinfección fueron, para *Lupinus pubescens* hipoclorito de sodio al 50% V/V por 10 minutos (P1) con un porcentaje de sobrevivencia del 95% y, para *Geranium chilloense* un porcentaje del 31% de sobrevivencia.

Figura 6. A) Fenolización del explante, B) Explante sano
Nota: Realizado por los autores (2017).

3.3. Fase 3: introducción y adaptación al medio de cultivo

En esta fase se evaluó el porcentaje de germinación y el promedio de la longitud de la plántula generada a partir de semillas y el porcentaje de brotación de yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don (Anexo 21), introducidas en medio de cultivo, aplicando como tratamientos distintas concentraciones de sales MS a diferentes temperaturas de incubación.

3.3.1. Porcentaje de germinación en semillas:

Aplicando el análisis de varianza se obtuvo un valor *p=0,004*, por lo que se determina que si hay diferencia significativa de los tratamientos de introducción al medio de cultivo, para la variable germinación de semillas de Ichul (Tabla 26).

Tabla 26.

Análisis de varianza (ADEVA) para el porcentaje de germinación de semillas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

F.V	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	15937,50	8	1992,19	7,81	0,0004
Tratamiento	11484,38	5	2296,88	9,00	0,0004
Error	3828,13	15	255,21		
Total	19765,63	23			

Nota: Realizado por los autores (2017).

3.3.2. Longitud de las plántulas provenientes de semillas:

Aplicando el análisis de varianza se obtuvo un valor *p=0,0014*, por lo que se determina que si hay diferencia significativa de los tratamientos de introducción al medio de cultivo para la variable longitud de las plántulas generadas a partir de las semillas de Ichul (Tabla 27).

Tabla 27.

Análisis de varianza (ADEVA) para el promedio de longitud de las plántulas provenientes de semillas de yemas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don.

F.V	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	70,55	8	8,82	4,68	0,0050
Tratamiento	66,74	5	13,35	7,08	0,0014
Error	28,28	15	1,89		
Total	98,83	23			

Nota: Realizado por los autores (2017).

La germinación de semillas de Ichul se notó beneficiada a una concentración del 50% de sales minerales en medio MS, con interacción a una temperatura de 20°C (TIMS5), presentando 100% de germinación en 20 días (Tabla 29, Figura 7).

Figura 7. A) Germinación, B) Plántula proveniente de germinación
Nota: Realizado por los autores (2017).

Rodríguez *et al*., (2015), describe en su investigación que los porcentajes más altos de germinación se presentaron en medios MS al 25% y al 50%. Respaldado por la investigación de Faria, Santiago, Panayotes & Araújo (2002), donde el medio MS al 50% resulta más efectivo en la germinación, contrario a los resultados observados en el medio MS al 100%, que presentó el menor porcentaje de germinación. Rodríguez *et al*., (2015), aclara que MS al 50% genera la activación germinativa a los 5 días después de la siembra, mientras que en otros medios de cultivo MS a distintas concentraciones de sales minerales, se presenta desde los 7 a los 15 días después de la siembra. Según Pedroza & Caballero (2009), en su investigación determinan que una concentración del 50% de sales MS resultó ser más eficiente para obtener plantas con mejor vigor y mayor biomasa, a partir de propágulos de *Marchantia polymorpha* L; determinan que esto se debe a que los requerimientos nutricionales no son tan elevados, generando un mayor potencial redox, que resulta beneficiar al desarrollo de la plántula.

El mayor promedio de longitud de plántulas se presentó en el medio de cultivo MS con concentración al 50% de sales minerales, incubadas a 20°C, guardando relación con el porcentaje de germinación (Tabla 28). Una temperatura de 20°C resulto beneficiosa para estimular el desarrollo del Ichul, sin embargo es necesario resaltar

que esta planta naturalmente pueden tolerar temperaturas hasta los 17°C (MECN, 2009, pág. 10).

Tabla 28.

Promedio del el porcentaje de germinación y la longitud de plántulas generadas a partir de semillas de Gaiadendron punctatum (Ruiz y Pav.) G. Don, con respecto a las concentraciones de sales minerales en medio MS y temperaturas de incubación.

Tratamiento	Codificación	Temp. °C	% MS	Germinación (%)	$\bar{x}$ longitud plántulas (mm)
TIMS1	SeCS1TE1	8	100	75	2,63
TIMS2	SeCS2TE1	8	50	43,75	1,38
TIMS3	SeCS3TE1	8	25	81,25	2,31
TIMS4	SeCS1TE2	20	100	56,25	3,44
TIMS5	SeCS2TE2	20	50	100	6,5
TIMS6	SeCS3TE2	20	25	37,5	2

Nota: Realizado por los autores (2017).

3.3.3. Porcentaje de brotación en yemas:

Para el porcentaje de brotación a partir de yemas de Ichul, no se apreció varianza significativa con ningún tratamiento por presentar 0% de brotación, por lo que se descartó la aplicación del análisis de varianzas y el análisis funcional propuesto por Duncan.

Los tratamientos empleados en yemas de Ichul no favorecieron el desarrollo meristemático en yemas, obteniendo 0% de brotación, por lo tanto no se logró determinar un tratamiento eficaz para el desarrollo *in vitro* de yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don.

Al evaluar yemas a los 20 días, se obtuvo 0% de brotación a comparación con la germinación, se determinó que se requiere de un mayor tiempo de incubación para yemas. Según ensayos previos, las yemas necesitan aproximadamente 90 días para la adaptación *in vitro* y la activación de células meristemáticas, pero esta activación también se ve afectada por el efecto de fenolización y la mortalidad de yemas. Velandia

& Fajardo (2004), especifican que *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, se reproduce vía sexual, ya que mediante la evaluación de propagación por estacas durante 4 meses, obtuvieron un porcentaje de brotación del 0%, al igual que la formación de raíces, por lo que se determina que la vía de propagación de esta especie es recomendable mediante semillas.

Conclusiones

Por medio de los resultados obtenidos en la presente investigación se acepta parcialmente la hipótesis alternativa, ya que al menos uno de los explantes de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, yemas o semillas, se estableció en cultivo *in vitro*.

Los mejores tratamientos para el fungicida fueron a una concentración de 0,05% y 0,1%, para el ácido acético fue la concentración al 2%, para el ácido cítrico fue de 200ppm durante 30 minutos, para el alcohol las concentraciones recomendadas fueron al 96% y 70% durante 1 minuto y para el hipoclorito de sodio todas las concentraciones (0,5%, 1% y 1,5%) fueron adecuadas durante 5 minutos, para evitar problemas de fenolización en tallos y yemas de Ichul.

El tratamiento de desinfección adecuado para semillas fue el TPS2 (hipoclorito de sodio al 1% más alcohol al 96%), que presentó 0% de contaminación fúngica y bacteriana, además de presentar 0% de fenolización y mortalidad. Para yemas el tratamiento óptimo fue el TPY3 (hipoclorito de sodio al 1,5% más 70% de alcohol etílico), presentando 0% de contaminación fúngica, 0% de contaminación bacteriana, 65% de fenolización y 8,3% de mortalidad de yemas.

Se determinó que las semillas del Ichul germinaron con todos los tratamientos, pero el TIMS5 (50 % MS a 20°C) demostró ser el más eficiente para el desarrollo de las plántulas, ya que presentó el mayor porcentaje de germinación con un 100% y el mayor promedio de longitud de tallo con 6,5mm.

Recomendaciones

Aplicar como el tratamiento óptimo de desinfección para semillas de Ichul, la aplicación del tratamiento TPS2 (hipoclorito de sodio al 1% más alcohol al 96%), para evitar problemas de contaminación fúngica y bacteriana.

Utilizar de semillas de Ichul, para la propagación de esta especie *in vitro*, utilizando para la introducción al medio 50% de sales MS a una temperatura de 20°C.

Evaluar distintos tipos de fungicidas a diferentes concentraciones con tiempos de inmersión alternos para obtener un tratamiento fúngico que disminuya la fenolización y mortalidad, sobretodo en yemas de Ichul, evitando al 100% la necrosis celular.

Dar continuidad a la investigación, mediante la estandarización de las fases de multiplicación y climatización en invernadero de *vitroplantas* generadas a partir de explantes de Ichul, cultivadas *in vitro*.

Referencias Bibliográficas

Aguilar, Z., Ulloa, C., & Hidalgo, P. (2009). *Guía de Plantas útiles de los Páramos de Zuleta, Ecuador.* Obtenido de Proyecto de Manejo y Aprovechamiento Sustentable de Alpacas en los Páramos de Zuleta: http://ecociencia.org/guias-de-plantas-utiles-de-los-paramos-de-zuleta-ecuador/

Aguirre, Z. (02 de marzo de 2011). *Biodiversidad Loja*. Obtenido de Perdida de la biodiversidad del Ecuador: http://biodiversidadloja.blogia.com/2011/030202-perdida-de-la-biodiversidad-del-ecuador.php

Alba, N., & Araujo, F. (diciembre de 2008). *Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de fitoterapeúticos en laboratorios PRONABELL LTDA.* Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana: http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis232.pdf

Alegría, I. (2001). *Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas.* Obtenido de Univerasidad Politécnica de Madrid: http://www.inia.es/gcontrec/pub/germoplasma_1161158274546.pdf

Alfonso, D., & Sandoval, E. (julio de 2008). *Evaluación "in vitro" de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejesde clavel durante la fase de enraizamiento.* Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana: http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis136.pdf

Alzate, F., Gómez, M., & Rodríguez, S. (enero de 2008). *Epecies vegetales del antiplano del Oriente Antioqueño en peligro de extinciòn.* Obtenido de Modelo de financiaciòn alternativo para el manejo sostenible de los bosques de San Nicolas : http://www.itto.int/files/user/pdf/publications/PD%20240%2003/pd240-03-2%20rev1(F)%20s.pdf

Ayala, A. (16 de septiembre de 2011). *Establecimiento de cultivo in vitro de molle (Schinus molle L.) a partir de yemas axilares tomadas de plantas madre como una herramienta para la propagación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito.* Obtenido de Escuela Politécnica del Ejercito : http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4734/1/T-ESPE-032803.pdf

Azofeifa, Á. (2009). *Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro.* Obtenido de agronomía mesoamericana: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf

Barrera, E., & Acosta, N. (1995). *Distribuciòn Altitudinal y diversidad de hemiparasitas y parasitas del orden Xantales en el Santuario de Fauna y flora de Iguaque Boyaca.* Obtenido de Universidad Nacional de Colombia : http://www.bdigital.unal.edu.co/23668/1/20688-76252-1-PB.pdf

Benavides, T., & Córdova, A. (05 de 2015). *Desarrolo de un protocolo de propagación in vitro de Geranium chiloense Willd. ex Kunth. y Lupinus pubescens Benth. para la obtención de plantas completas, para la primera*

etapa de restauración de la quebradas ded Quito. Obtenido de Universidad Politécnica Salesiana: http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9372/1/UPS-QT07125.pdf

Bonga, J., & Durzan, D. (1982). *Tissue culture in forestry.* Obtenido de Nijhoff: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf

Borges, M., Estrada, E., Pérez, I., & Meneses, S. (2009). *Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de Dioscorea alata L. clon caraqueño.* Obtenido de http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11747/12292.

Cardona, P. (15 de octubre de 2013). *Fundamentos Morfogenesis en cultivos in-vitro.* Obtenido de Prezi: https://prezi.com/fh9hhgqfgh9d/fundamentos-morfogenesis-en-cultivos-in-vitro/

Cedeño, H., & Espinoza, S. (2015). *Aislamiento e identificaciòn de metabolitos secundarios de las hojas y flores de Gaiadendron punctatum (R. & S.) G. Don utilizada como especie medicinal para la comunidad indigena Saraguro en el sur del Ecuador.* Obtenido de Universidad técnica particular de Loja: http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/13230/1/Cedeno%20Blacio%20Hector%20Paulo%20y%20Espinosa%20Tapia%20Sandra%20Stefany.pdf

Chuquimarca, I. M. (2011). *Evaluación en el laboratorio del comportamiento de cuatro fungicidas biológicos para el control del antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides Desmazieres y Montagne) en tomate de árbol (Solanum betaceum).* Obtenido de Universidad de Cuenca: http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3039/1/tag286.pdf

Colores. (3 de febrero de 2017). *Lista de colores: Fundamentos y Escalas*. Obtenido de http://www.colores.org.es/granate.php

Cordiés, L., Machado, L., & Hamilton, M. (1998). *Tetraciclina.* Retrieved from Principios generales de la terapéutica antimicrobiana: http://bvs.sld.cu/revista/act/voI8_1_98/act11198.pdf

Cornare. (22 de Noviembre de 2011). *Acuerdo 262.* Obtenido de Corporación Autónoma Regional Rios Negro y Nare: http://www.cornare.gov.co/Acuerdos/Acuerdo_262_de_2011_cornare.pdf

Cubero, J. (2002). *Introducción a la mejora genética vegetal* (Segunda ed.). Córdoba: Mundi- Prensa.

Faria, R., Santiago, D., Panayotes, D., & Araújo, R. (2002). *Preservation of the brazilian orchid Cattleya walkeriana Gardner using in vitro propagation.* Obtenido de Brazilian Society of Plant Breeding: http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/uploads/c8128f42-54c7-be7f.pdf

Freire, A. (2004). *Botánica Sistemática Ecuatoriana.* Obtenido de ResearchGate: https://www.researchgate.net/publication/290435567_Botanica_Sistematica_Ecuatoriana

Gaviria, V., Patiño, L., & Saldarriaga, A. (2013). *Evaluación in vitro de fungicidas comerciales para el control de Colletotrichum spp., en mora de castilla.* Obtenido de Corpoica. Ciencia y Tecnología Agorpecuaria: http://www.redalyc.org/pdf/4499/449945181008.pdf

Gisbert, C. (2011). *Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica* . Obtenido de Universidad Politécnica de Valencia: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/11526/Microsoft%20Word%20-%20art%EDculo%20docente%20cgisbert%20sept2010.pdf?sequence=1

González, L. (2011). *Flora de Costa Rica I.* Obtenido de Guía practica: https://books.google.com.ec/books?id=YGUTlLTykbwC&pg=PA140&lpg=PA140&dq=gaiadendron+punctatum&source=bl&ots=oK6CV4AUso&sig=JJ0yVB_9WiM1o-sbs3WSAMEJFTw&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjD35isoLHRAhUIPiYKHbg5BS44HhDoAQggMAE#v=onepage&q=gaiadendron%20punctatum&f=fa

Google map. (30 de enero de 2017). Obtenido de https://www.google.es/maps/@-0.4678128,-78.589915,1579m/data=!3m1!1e3

Guaman, C. (julio de 2014). *Etnobotánica de la etnia Saraguro con énfasis en la fitoterapia de enfermedades de animales domésticos.* Obtenido de Maestria en Agroecología tropical Andina: http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7520/1/UPS-QT06126.pdf

Guerrero, D. T. (2008). *Elaboración de un jarabe para la tos causada por resfrío, a partir de dos especies medicinales Viola odorata (violeta de huerta) y Gaiadendron punctatum (violeta de campo).* Obtenido de http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/1785

Hurtado, D., & Merino, M. E. (2001). *Cultivo de tejidos vegetales.* México: Anfre`d.

Jiménez, M. (2016). *Funciones, morfología, tipos y diseminación de semillas.* Obtenido de CFGM TRABAJOS FORESTALES Y DE CONSERVACIÓN MEDIO NATURAL AGROTECNOLOGÍA (BOTÁNICA): http://servicios.educarm.es/templates/portal/ficheros/websDinamicas/20/Frutos.pdf

Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas* . Obtenido de Fisiología Vegetal: http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf

Kyrkby, E., & Römheld, V. (2007). *Micronutrientes en la fisiología de las plantas: funciones, absorción y movilidad.* Obtenido de http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/MicronutrientesenlaFisiologia.pdf

Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II.* Obtenido de Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología: http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf

MAE. (2012). *Sistema de clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental.* Obtenido de MINISTERIO DE AMBIENTE DEL ECUADOR. Subsecretaría de Patrimonio Natural. Quito: http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/09/LEYENDA-ECOSISTEMAS_ECUADOR_2.pdf

Martínez, B. (14 de octubre de 2013). *Acido acetico (vinagre).* Obtenido de Prezi: https://prezi.com/iqd65ecknwra/acido-acetico-vinagre/

MECN - INB. (2015). *Plantas de los páramos del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador.* Obtenido de Serie de Publicaciones del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales del Instituto Nacional de Biodiversidad. Publicación Patrimonio Natural del Ecuador Nro. 2. Quito-Ecuador: http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/staff/PDFs/ulloa/PlantasParamosDMQ.pdf

MECN. (2009). *Ecosistemas del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ).* Obtenido de Publicación Miscelánea No. 6. Serie de Publicaciones del Museo Ecuatoriano o de Ciencias Naturales (MECN) - Fondo Ambiental del MDMQ: http://www.quitoambiente.gob.ec/ambiente/images/Secretaria_Ambiente/Documentos/patrimonio_natural/biodiversidad/guia_ecosistemas_dmq.pdf

Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. (2015). *Atlas de histología vegetal y animal.* Obtenido de Órganos vegetales: Tallo: https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/o-v-tallo.pdf

Mena, P. (2005). *La Biodiversidad del Ecuador.* Obtenido de Flacsoandes: http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/49914.pdf

Molist, P., & Pombal, M. (2016). *Fijadores.* Obtenido de Atlas de histología vegetal y animal: https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/2-fijadores.php

Mora, A. (2008). *Acciones para la conservación de plantas: amenazas, retos y perspectivas.* Obtenido de revista La granja: http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8715/1/Acciones%20para%20la%20conservacion%20de%20plantas%20amenazas%20retos%20y%20perspectivas.pdf

Morales, J. (02 de 2016). *Establecimiento de un protocolo de propagación in vitro a partir de la semilla de Solanum caripense Dunal, para la obtención de plantas libres de bacterias y hongos.* Obtenido de Universidad Politécnica Salesiana: http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/11656

Muñoz, A., Sáenz, A., López, L., Cantú, L., & Barajas, L. (2014). *Ácido Cítrico: Compuesto Interesante.* Obtenido de Revista Científica de la Universidad

Autónoma de Coahuila, Volumen 6, No 12: http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%2012/4.pdf

Navarro, J. (17 de febrero de 2012). *La técnica del área bajo la curva.* Obtenido de Universidad de Costa Rica: http://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/585

OPEPA. (2015). *Tagua - Gaiadendron punctatum*. Obtenido de Organización para la Educación y Protección Ambiental: http://www.opepa.org/index.php?option=com_content&task=view&id=482&Itemid=30

Orqueda, G. (septiembre de 2013). *Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de Chuquiragua (Chuquiragua jussie) a partir de yemas apicales y axilares*. Obtenido de Universidad de las Fuerzas Armadas: http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7167/1/T-ESPE-047408.pdf

Parada, M. (2012). *Análisis comparativo de la lluvia de semillas de Gaiadendron punctatum (Ruiz & Pavón) G. Don (Loranthaceae) y Ternstroemia meridionalis Mutis EX L.F. (Theaceae) en el parque natural municipal Ranchería (Boyacá), Colombia.* Obtenido de Universidad Nacional de Colombia: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319028009012

Pedroza, J., & Caballero, M. (2009). *Evaluación del efecto del medio MS y la temperatura en el desarrollo de propágulos de Marchantia polymorpha L. (Marchantiaceae) bajo condiciones in vitro y ex vitro.* Obtenido de Universidad Distrital Francisco José Caldas: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11713/12286.

Pérez, J. F. (2006). *Cultivo in vitro de plantas y sus aplicacionesen agricultura.* Panamá: Arte comunicaciòn visualS.L.

Puche, F. (19 de febrero de 2012). *Componentes del medio de cultivo*. Obtenido de BIOTECNOLOGIA ITCA: http://biotecnologia-itca.blogspot.com/2012/02/2-1-4-componentes-del-medio-de-cultivo.html

Rivas, S., & Martínez. (01 de diciembre de 2008). *Clasificación Bioclimática de la Tierra*. Obtenido de Worldwide Bioclimatic Classification System, Phytosociological Research Center: http://www.globalbioclimatics.org/book/bioc/global_bioclimatics-2008_01.htm

Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones.* Cali, Colombia: CIAT.

Rodríguez, M., Vargas, J., Villegas, O., López, V., Guillen, D., & Alia, I. (2015, agosto). *Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de Cattleya (Brassolaeliocattleya) in vitro.* Retrieved from INERCIENCIA: http://www.interciencia.org/v40_08/549.pdf

Sales, C. (2012). *Morfogénesis in vitro.* Obtenido de Colegio Colsubsidio Las Mercedes I.E.D: http://es.calameo.com/read/001269180f14a15cb965a

Segretín, M. E. (2007). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales).* Obtenido de ArgenBio, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología: http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf

Segui, J. M. (2010). *Biología y biotecnologia reproductiva de las plantas* (Primera ed.). (F. S.L, Ed.) Valencia, España: Universitat Politécnica de Valéncia.

Smith, R. (2000©). *Plant Tissue Culture* (Segunda ed.). New York.

Syngenta. (2015). *Score 250 CE.* Obtenido de Ficha Técnica: http://fria.syngenta.com.mx/Data/Sites/1/agroquimicos_productos/fungicidas/score_250_ce/score_info.pdf

Tropicos. (07 de julio de 2009). *Gaiadendron punctatum (RUIZ & PAV.) G.DON*. Obtenido de Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador : http://www.tropicos.org/Name/19100506?projectid=2

Tropicos. (22 de 12 de 2016). *Missouri Botanical Garden*. Obtenido de http://www.tropicos.org/Name/19100506

Ulloa, C., & Moller, P. (2004). *Arboles y arbustos de los Andes del Ecuador.* Obtenido de *Gaiadendron* G. Don: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=113130

Vaca, I. (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.* Obtenido de ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO: http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/9652/T-ESPE-IASA%20I-003406.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Valdez, A., Orellana, P., García, L., Bermudez, N. V., García, L., & Padrón, Y. (2002). *Efecto de la fenolización sobre explantes de caña de azúcar (Saccharum spp. híbrido var. Sp 70-1284) en la formación de callos.* Retrieved from Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central “Martha Abreu” de las Villas: https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/125/107

Vega, C., Bermejo, J., Villegas, G., Quezada, J., Aguilar, M., & Conde, E. (2007). *Propagación masiva de Polylepis tomentella Weddell ssp. nana mediante técnicas de cultivo in vitro.* Retrieved from da-Portugal, M. Aguil: http://www.scielo.org.bo/pdf/reb/v42n2/v42n2a03.pdf

Velandia, D., & Fajardo, A. (2004). *Reproducción y adaptación en vivero de algunas especies representativas en las áreas rurales del ditrito capital de la región de Sumapaz.* Obtenido de Colombia Forestal:

http://oab2.ambientebogota.gov.co/apc-aa-files/57c59a889ca266ee6533c26f970cb14a/vivero_sumapaz.pdf.

Viera, W. (2002). *Evaluación de fungicidas in vitro y pruebas de resistencia de cinco variedades de tomate de árbol (Solanun betaceum cav.) para antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides). Cutulagua, Pichincha*. Obtenido de Universidad Central del Ecuador: https://books.google.com.ec/books?id=HYEzAQAAMAAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Vignoli, R. (2006). *Esterilizació, desinfección y antisepsia.* Obtenido de Universidad de la Republica: http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/esterilizacionydesinfeccion.pdf

Anexos

Anexo 1: Tabla de composición del medio de cultivo Murashige y Skoog.

Macronutrientes (mg/L)	
Componentes	**Medio MS**
$CaCl_2.2H_2O$	440
KH_2PO_4	170
KNO_3	1900
$MgSO_4.7H_2O$	125
NH_4NO_3	1650
Micronutrientes (mg/L)	
$CoCl_2.6H_2O$	0,025
$CuSO_4.5H_2O$	0,025
$FeSO_4.7H_2O$	27,8
H_3BO_3	6,2
KI	0,83
$MnSO_4.4H_2O$	22,3
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6
Na_2EDTA	37
Vitaminas y aminoácidos (mg/L)	
Glicina	2
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina HCL	0,5
Tiamina HCL	0,1
Fuente de carbono (mg/L)	
Sacarosa	30.000,00
pH	
pH	5.7

Nota: Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski (2010)

Anexo 2: Tratamientos de fungicida para tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

Tratamiento	Órgano vegetal	Codificación	Descripción
TaF1	Tallo	TaC1Ti1	Tallo en solución fúngica 0,05% durante 10 minutos
TaF2	Tallo	TaC1Ti2	Tallo en solución fúngica 0,05% durante 20 minutos
TaF3	Tallo	TaC1Ti3	Tallo en solución fúngica 0,05% durante 30 minutos
TaF4	Tallo	TaC2Ti1	Tallo en solución fúngica 0,1% durante 10 minutos
TaF5	Tallo	TaC2Ti2	Tallo en solución fúngica 0,1% durante 20 minutos
TaF6	Tallo	TaC2Ti3	Tallo en solución fúngica 0,1% durante 30 minutos
TaF7	Tallo	TaC3Ti1	Tallo en solución fúngica 0,2% durante 10 minutos
TaF8	Tallo	TaC3Ti2	Tallo en solución fúngica 0,2% durante 20 minutos
TaF9	Tallo	TaC3Ti3	Tallo en solución fúngica 0,2% durante 30 minutos

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 3: Tratamientos de fungicida para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

Tratamiento	Órgano vegetal	Codificación	Descripción
YF1	Yema	YeC1Ti1	Yema en solución fúngica 0,05% durante 10 minutos
YF2	Yema	YeC1Ti2	Yema en solución fúngica 0,05% durante 20 minutos
YF3	Yema	YeC1Ti3	Yema en solución fúngica 0,05% durante 30 minutos
YF4	Yema	YeC2Ti1	Yema en solución fúngica 0,1% durante 10 minutos
YF5	Yema	YeC2Ti2	Yema en solución fúngica 0,1% durante 20 minutos
YF6	Yema	YeC2Ti3	Yema en solución fúngica 0,1% durante 30 minutos
YF7	Yema	YeC3Ti1	Yema en solución fúngica 0,2% durante 10 minutos
YF8	Yema	YeC3Ti2	Yema en solución fúngica 0,2% durante 20 minutos
YF9	Yema	YeC3Ti3	Yema en solución fúngica 0,2% durante 30 minutos

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 4: Tratamientos de Ácido acético para tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

Tratamiento	Órgano vegetal	Codificación	Descripción
TaAA1	Tallo	TaC1Ti1	Tallo en solución de Ácido acético 5% durante 10 minutos
TaAA2	Tallo	TaC1Ti2	Tallo en solución de Ácido acético 5% durante 20 minutos
TaAA3	Tallo	TaC1Ti3	Tallo en solución de Ácido acético 5% durante 30 minutos
TaAA4	Tallo	TaC2Ti1	Tallo en solución de Ácido acético 10% durante 10 minutos
TaAA5	Tallo	TaC2Ti2	Tallo en solución de Ácido acético 10% durante 20 minutos
TaAA6	Tallo	TaC2Ti3	Tallo en solución de Ácido acético 10% durante 30 minutos
TaAA7	Tallo	TaC3Ti1	Tallo en solución de Ácido acético 20% durante 10 minutos
TaAA8	Tallo	TaC3Ti2	Tallo en solución de Ácido acético 20% durante 20 minutos
TaAA9	Tallo	TaC3Ti3	Tallo en solución de Ácido acético 20% durante 30 minutos

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 5: Tratamientos de Ácido acético para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

Tratamiento	Órgano vegetal	Codificación	Descripción
YAA1	Yema	YeC1Ti1	Yema en solución de Ácido acético 5% durante 10 minutos
YAA2	Yema	YeC1Ti2	Yema en solución de Ácido acético 5% durante 20 minutos
YAA3	Yema	YeC1Ti3	Yema en solución de Ácido acético 5% durante 30 minutos
YAA4	Yema	YeC2Ti1	Yema en solución de Ácido acético 10% durante 10 minutos
YAA5	Yema	YeC2Ti2	Yema en solución de Ácido acético 10% durante 20 minutos
YAA6	Yema	YeC2Ti3	Yema en solución de Ácido acético 10% durante 30 minutos
YAA7	Yema	YeC3Ti1	Yema en solución de Ácido acético 20% durante 10 minutos
YAA8	Yema	YeC3Ti2	Yema en solución de Ácido acético 20% durante 20 minutos
YAA9	Yema	YeC3Ti3	Yema en solución de Ácido acético 20% durante 30 minutos

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 6: Tratamientos de Ácido cítrico para tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

Tratamiento	Órgano vegetal	Codificación	Descripción
TaAC1	Tallo	TaC1Ti1	Tallo en solución de Ácido cítrico 50ppm durante 10 minutos
TaAC2	Tallo	TaC1Ti2	Tallo en solución de Ácido cítrico 50ppm durante 20 minutos
TaAC3	Tallo	TaC1Ti3	Tallo en solución de Ácido cítrico 50ppm durante 30 minutos
TaAC4	Tallo	TaC2Ti1	Tallo en solución de Ácido cítrico 100ppm durante 10 minutos
TaAC5	Tallo	TaC2Ti2	Tallo en solución de Ácido cítrico 100ppm durante 20 minutos
TaAC6	Tallo	TaC2Ti3	Tallo en solución de Ácido cítrico 100ppm durante 30 minutos
TaAC7	Tallo	TaC3Ti1	Tallo en solución de Ácido cítrico 200 ppm durante 10 minutos
TaAC8	Tallo	TaC3Ti2	Tallo en solución de Ácido cítrico 200 ppm durante 20 minutos
TaAC9	Tallo	TaC3Ti3	Tallo en solución de Ácido cítrico 200 ppm durante 30 minutos

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 7: Tratamientos de Ácido cítrico para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

Tratamiento	Órgano vegetal	Codificación	Descripción
YAC1	Yema	YeC1Ti1	Yema en solución de Ácido cítrico 50ppm durante 10 minutos
YAC2	Yema	YeC1Ti2	Yema en solución de Ácido cítrico 50ppm durante 20 minutos
YAC3	Yema	YeC1Ti3	Yema en solución de Ácido cítrico 50ppm durante 30 minutos
YAC4	Yema	YeC2Ti1	Yema en solución de Ácido cítrico 100ppm durante 10 minutos
YAC5	Yema	YeC2Ti2	Yema en solución de Ácido cítrico 100ppm durante 20 minutos
YAC6	Yema	YeC2Ti3	Yema en solución de Ácido cítrico 100ppm durante 30 minutos
YAC7	Yema	YeC3Ti1	Yema en solución de Ácido cítrico 200 ppm durante 10 minutos
YAC8	Yema	YeC3Ti2	Yema en solución de Ácido cítrico 200 ppm durante 20 minutos
YAC9	Yema	YeC3Ti3	Yema en solución de Ácido cítrico 200 ppm durante 30 minutos

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 8: Tratamientos de Alcohol etílico para tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

Tratamiento	Órgano vegetal	Codificación	Descripción
TaAE1	Tallo	TaC1Ti1	Tallo en solución de Alcohol etílico 70% durante 30 segundos
TaAE2	Tallo	TaC1Ti2	Tallo en solución de Alcohol etílico 70% durante 1 minuto
TaAE3	Tallo	TaC1Ti3	Tallo en solución de Alcohol etílico 70% durante 2 minutos
TaAE4	Tallo	TaC2Ti1	Tallo en solución de Alcohol etílico 96% durante 30 segundos
TaAE5	Tallo	TaC2Ti2	Tallo en solución de Alcohol etílico 96% durante 1 minuto
TaAE6	Tallo	TaC2Ti3	Tallo en solución de Alcohol etílico 96% durante 2 minutos

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 9: Tratamientos de Alcohol etílico para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

Tratamiento	Órgano vegetal	Codificación	Descripción
YAE1	Yema	YeC1Ti1	Yema en solución de Alcohol etílico 70% durante 30 segundos
YAE2	Yema	YeC1Ti2	Yema en solución de Alcohol etílico 70% durante 1 minuto
YAE3	Yema	YeC1Ti3	Yema en solución de Alcohol etílico 70% durante 2 minutos
YAE4	Yema	YeC2Ti1	Yema en solución de Alcohol etílico 96% durante 30 segundos
YAE5	Yema	YeC2Ti2	Yema en solución de Alcohol etílico 96% durante 1 minuto
YAE6	Yema	YeC2Ti3	Yema en solución de Alcohol etílico 96% durante 2 minutos

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 10: Tratamientos de Hipoclorito de sodio para tallos de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

Tratamiento	Órgano vegetal	Codificación	Descripción
TaAH1	Tallo	TaC1Ti1	Tallo en solución de Hipoclorito de sodio 0,5% durante 5 minutos
TaAH2	Tallo	TaC1Ti2	Tallo en solución de Hipoclorito de sodio 0,5% durante 10 minutos
TaAH3	Tallo	TaC1Ti3	Tallo en solución de Hipoclorito de sodio 0,5% durante 15 minutos
TaAH4	Tallo	TaC2Ti1	Tallo en solución de Hipoclorito de sodio 1% durante 5 minutos
TaAH5	Tallo	TaC2Ti2	Tallo en solución de Hipoclorito de sodio 1% durante 10 minutos
TaAH6	Tallo	TaC2Ti3	Tallo en solución de Hipoclorito de sodio 1% durante 15 minutos
TaAH7	Tallo	TaC3Ti1	Tallo en solución de Hipoclorito de sodio 1,5% durante 5 minutos
TaAH8	Tallo	TaC3Ti2	Tallo en solución de Hipoclorito de sodio 1,5% durante 10 minutos
TaAH9	Tallo	TaC3Ti3	Tallo en solución de Hipoclorito de sodio 1,5% durante 15 minutos

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 11: Tratamientos de Hipoclorito de sodio para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don

Tratamiento	Órgano vegetal	Codificación	Descripción
YAH1	Yema	YeC1Ti1	Yema en solución de Hipoclorito de sodio 0,5% durante 5 minutos
YAH2	Yema	YeC1Ti2	Yema en solución de Hipoclorito de sodio 0,5% durante 10 minutos
YAH3	Yema	YeC1Ti3	Yema en solución de Hipoclorito de sodio 0,5% durante 15 minutos
YAH4	Yema	YeC2Ti1	Yema en solución de Hipoclorito de sodio 1% durante 5 minutos
YAH5	Yema	YeC2Ti2	Yema en solución de Hipoclorito de sodio 1% durante 5 minutos
YAH6	Yema	YeC2Ti3	Yema en solución de Hipoclorito de sodio 1% durante 5 minutos
YAH7	Yema	YeC3Ti1	Yema en solución de Hipoclorito de sodio 1,5% durante 5 minutos
YAH8	Yema	YeC3Ti2	Yema en solución de Hipoclorito de sodio 1,5% durante 5 minutos
YAH9	Yema	YeC3Ti3	Yema en solución de Hipoclorito de sodio 1,5% durante 5 minutos

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 12: Protocolos de desinfección para semillas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	Codificación	Explante	Descripción del protocolo de desinfección
TPS1	SeCh1Ca1	Semilla	Semilla en hipoclorito de sodio 1% durante 15 minutos + alcohol 70% durante 1 minuto.
TPS2	SeCh1Ca2	Semilla	Semilla en hipoclorito de sodio 1% durante 15 minutos + alcohol 90% durante 1 minuto.
TPS3	SeCh2Ca1	Semilla	Semilla en hipoclorito de sodio 1,5% durante 15 minutos + alcohol 70% durante 1 minuto.
TPS4	SeCh2Ca2	Semilla	Semilla en hipoclorito de sodio 1,5% durante 15 minutos + alcohol 90% durante 1 minuto.

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 13: Protocolos de desinfección para yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don.

Tratamiento	Codificación	Explante	Descripción del protocolo de desinfección
TPY1	YeCh1Ca1	Yema	Yema en hipoclorito de sodio 1% durante 15 minutos + alcohol 70% durante 1 minuto.
TPY2	YeCh1Ca2	Yema	Yema en hipoclorito de sodio 1% durante 15 minutos + alcohol 90% durante 1 minuto.
TPY3	YeCh2Ca1	Yema	Yema en hipoclorito de sodio 1,5% durante 15 minutos + alcohol 70% durante 1 minuto.
TPY4	YeCh2Ca2	Yema	Yema en hipoclorito de sodio 1,5% durante 15 minutos + alcohol 90% durante 1 minuto.

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 14: Tratamiento para la introducción *in vitro* de semillas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, a concentraciones al 100%, 50% y 25% de sales de medio MS a temperaturas de 8°C y 20°C.

Tratamiento	Codificación	Explante	Descripción del protocolo de desinfección
TIMS1	SeCS1TE1	Semilla	Semilla en medio MS al 100% a 8°C de temperatura.
TIMS2	SeCS2TE1	Semilla	Semilla en medio MS al 50% a 8°C de temperatura.
TIMS3	SeCS3TE1	Semilla	Semilla en medio MS al 25% a 8°C de temperatura.
TIMS4	SeCS1TE2	Semilla	Semilla en medio MS al 100% a 20°C de temperatura.
TIMS5	SeCS2TE2	Semilla	Semilla en medio MS al 50% a 20°C de temperatura.
TIMS6	SeCS3TE2	Semilla	Semilla en medio MS al 25% a 20°C de temperatura.

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 15: Tratamiento para la introducción *in vitro* de yemas de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, a concentraciones al 100%, 50% y 25% de sales de medio MS a temperaturas de 8°C y 20°C.

Tratamiento	Codificación	Explante	Descripción del protocolo de desinfección
TIMY1	YeCS1TE1	Yema	Yema en medio MS al 100% a 8°C de temperatura.
TIMY2	YeCS2TE1	Yema	Yema en medio MS al 50% a 8°C de temperatura.
TIMY3	YeCS3TE1	Yema	Yema en medio MS al 25% a 8°C de temperatura.
TIMY4	YeCS1TE2	Yema	Yema en medio MS al 100% a 20°C de temperatura.
TIMY5	YeCS2TE2	Yema	Yema en medio MS al 50% a 20°C de temperatura.
TIMY6	YeCS3TE2	Yema	Yema en medio MS al 25% a 20°C de temperatura.

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 16: Área bajo la curva respecto a las concentraciones de fungicida Score 250 EC en órganos vegetales de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don.

Órgano vegetal	Concentración	Área Total
TALLO	0,5 ppm	150
TALLO	1ppm	141,6
TALLO	2ppm	128,3
YEMA	0,5 ppm	68,3
YEMA	1ppm	66,6
YEMA	2ppm	58,3

Nota: Realizado por los autores (2017)

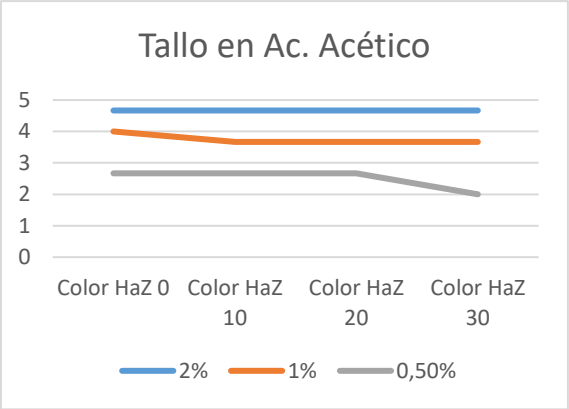
Anexo 17: Área bajo la curva respecto a las concentraciones de ácido acético en órganos vegetales de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don.

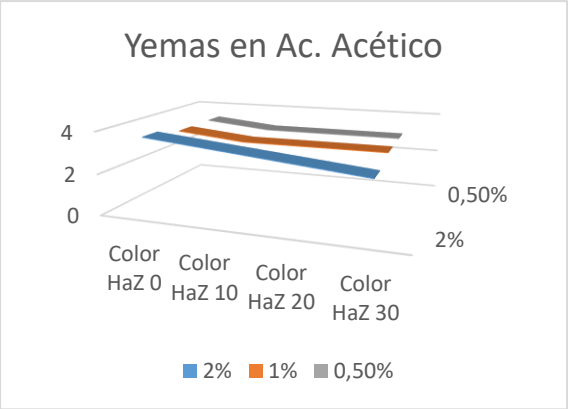
Órgano vegetal	Concentración	Área Total
TALLO	20%	140
TALLO	10%	111,6
TALLO	5%	76,6
YEMA	20%	95
YEMA	10%	91,6
YEMA	5%	91,6

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 18: Variación de color de tallo y yema de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don, con respecto al tiempo de inmersión en concentraciones de ácido acético.

Variación de color de tallo y yema de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don





Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 19: Área bajo la curva respecto a las concentraciones de ácido cítrico en órganos vegetales de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don.

Órgano vegetal	Concentración	Área Total
TALLO	200ppm	100
TALLO	100ppm	110
TALLO	50ppm	135
YEMA	200ppm	88,3
YEMA	100ppm	78,3
YEMA	50ppm	71,6

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 20: Área bajo la curva respecto a las concentraciones de alcohol etílico en órganos vegetales de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don.

Órgano vegetal	Concentración	Área Total
TALLO	90%	8
TALLO	70%	8,3
YEMA	90%	5,4
YEMA	70%	5,75

Nota: Realizado por los autores (2017)

Anexo 21: Certificado de identificación de *Gaiadendron punctatum* (Ruiz y Pav.) G. Don.

Quito, 15 de febrero de 2017

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

El espécimen examinado corresponden a:

***Gaiadendron punctatum* (Ruiz & Pav.) G. Don**

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Santalanae Thorne ex Reveal
- Orden: Santalales R. Br. ex Bercht. & J. Presl
- Familia: Loranthaceae Juss.
- Género: *Gaiadendron* G. Don
- especie: *punctatum* (Ruiz & Pav.) G. Don

Álvaro J. Pérez
Curador de Angiospermas, Herbario QCA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR
HERBARIO
Q C A
QUITO