

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Tesis previa a la obtención del título de: INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE REGENERACIÓN *in vitro* Y
ACLIMATACIÓN PARA *Fuchsia pilaloensis* Y *Fuchsia hybrida* PARA SU
CONSERVACIÓN**

AUTORAS:

**VIVIANA ELIZABETH NIETO VARGAS
MARIELA LIZETH VALDIVIESO MENÉNDEZ**

**DIRECTORA:
IVONNE VACA SUQUILLO**

Quito, enero del 2013

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Declaramos que el presente trabajo de investigación (desarrollo y análisis de las conclusiones emitidas), realizado por Viviana Elizabeth Nieto Vargas y Mariela Lizeth Valdivieso Menéndez, cuyo título es “Establecimiento de un protocolo de regeneración *in vitro* y aclimatación para *Fuchsia pilaloensis* y *Fuchsia hybrida* para su conservación”, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales; son de exclusiva responsabilidad de las autoras.

Quito, enero, 2013

(f)_____

Viviana Elizabeth Nieto Vargas

C.I: 1714565304

(f)_____

Mariela Lizeth Valdivieso Menéndez

C.I: 1721778502

DEDICATORIAS

El presente trabajo, está dedicado a nuestros padres, por sus sabios consejos y por estar a nuestro lado en los momentos difíciles, también a nuestros hermanos y compañeros que nos ayudaron para llevar a cabo esta investigación.

Dedicamos esta tesis y toda nuestra carrera universitaria a Dios por ser quien ha estado a nuestro lado en todo momento dándonos la fuerza necesaria para continuar luchando día tras día y seguir adelante rompiendo todas las barreras que se nos han presentado.

AGRADECIMIENTOS

A nuestra directora de Tesis la Ing. Ivonne Vaca Suquillo, por su valiosa ayuda en el desarrollo de la investigación.

Al Bqf. Pablo Coba Santamaría MSc. por su colaboración con el material vegetal y la identificación de los microorganismos endófitos durante la etapa de nuestra investigación.

A la Bióloga Venus Arévalo, Docente de la Escuela Politécnica del Ejercito IASA II-Sto Domingo, por brindarnos sus conocimientos para desarrollar nuestra investigación.

A la Ing. Diana Calero por brindarnos la facilidad necesaria en el laboratorio para desarrollar nuestra investigación, además de darnos sus conocimientos para sacar adelante este proyecto.

Al Estadístico Patricio Yáñez por su valioso apoyo para el desarrollo de la estadística de nuestra investigación.

A la Ing. María Belén Aldás por su valioso apoyo y su ayuda incondicional en el desarrollo de nuestra investigación.

A la Ing. Tatiana Mosquera por brindarnos la facilidad necesaria en el laboratorio para desarrollar nuestra investigación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
1.1. Justificación	3
1.2. Hipótesis	4
1.2.1. Hipótesis Alternativa (Ha)	4
1.2.2. Hipótesis Nula (Ho)	4
1.3. Objetivos	4
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO II	5
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Familia Onagraceae	5
2.2. Especies en extinción	10
2.3. Propagación de <i>Fuchsia</i>	13
2.4. Cultivo de tejidos	14
CAPÍTULO III	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1. Localización Geográfica de <i>Fuchsia pilaloensis</i> y <i>Fuchsia hybrida</i>	40
3.2. Materiales, Reactivos y Equipos	40
3.3. Desinfección de brotes de <i>F. hybrida</i> y <i>F. pilaloensis</i>	41
3.4. Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> de <i>F. hybrida</i> y <i>F. pilaloensis</i>	46
3.5. Aclimatación de <i>F. hybrida</i>	48
CAPÍTULO IV	52
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1. Desinfección para brotes de <i>F. pilaloensis</i> y <i>F. hybrida</i>	52
4.2. Microorganismos Endófitos	56
4.3. Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>F. pilaloensis</i> y <i>F. hybrida</i>	61
4.4. Aclimatación de <i>F. hybrida</i>	69
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Descripción taxonómica de <i>Fuchsia hybrida</i>	8
Cuadro 2: Descripción taxonómica de <i>Fuchsia pilaloensis</i> .	8
Cuadro 3: Información de la evolución, distribución geográfica, hábitat y ecología, amenazas y acciones de conservación de <i>F. pilaloensis</i> .	9
Cuadro 4: Componentes de la turba.	25
Cuadro 6: Protocolos de desinfección aplicados para ambas especies.	44
Cuadro 7: Tratamientos evaluados en la fase de aclimatación para <i>F. hybrida</i>	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aislamiento del hongo endófito de <i>F. pilaloensis</i>	42
Figura 2: Aislamiento de bacterias endófitas de <i>F. pilaloensis</i>	43
Figura 3: Desinfección de brotes de <i>F. pilaloensis</i>	45
Figura 4: Siembra de <i>Fuchsia</i> en cámara de flujo laminar.	47
Figura 5: Fase de aclimatación <i>F. hybrida</i>	50
Figura 6: Porcentajes de contaminación fúngica para ambas especies de <i>Fuchsia</i> .	52
Figura 7: Porcentajes de contaminación bacteriana para ambas especies de <i>Fuchsia</i> .	54
Figura 8: Porcentaje de Fenolización para <i>F. pilaloensis</i> y <i>F. hybrida</i>	55
Figura 9: Mortalidad de los explantes en la desinfección	55
Figura 10: Hongo en la fase <i>in vitro</i> (brote de <i>F. pilaloensis</i>)	57
Figura 11: Hongo endófito de <i>F. pilaloensis</i>	57
Figura 12: Aislamiento de bacterias endófitas de <i>F. pilaloensis</i>	58
Figura 13: Tinción de Gram de bacterias aisladas de <i>F. pilaloensis</i>	59
Figura 14: Porcentaje de formación de callos en el medio de cultivo para <i>F. pilaloensis</i> y <i>F. hybrida</i>	62
Figura 15: Promedio (cm) de la longitud del crecimiento del tallo	63
Figura 16: Porcentaje de crecimiento del brote de <i>F. pilaloensis</i>	64
Figura 17: Introducción de <i>F. pilaloensis</i>	66
Figura 18: Porcentaje de enraizamiento de <i>F. hybrida</i> y <i>F. pilaloensis</i>	67
Figura 19: Explantes <i>in vitro</i> de <i>F. hybrida</i>	67
Figura 20: Porcentaje de mortalidad de los explantes de <i>F. pilaloensis</i> sembrados <i>in vitro</i> .	68
Figura 21: Supervivencia de <i>F. hybrida</i> en la fase de aclimatación	70
Figura 22: Porcentajes de supervivencia y mortalidad para <i>F. hybrida</i> en la fase de aclimatación.	71
Figura 23: Supervivencia de <i>F. hybrida</i> en sustratos.	71
Figura 24: Longitud promedio del tallo de <i>F. hybrida</i> en relación a los sustratos	73
Figura 25: Longitud promedio del tallo de <i>F. hybrida</i> en relación a los medios de cultivo.	74
Figura 26: Longitud promedio (cm) del tallo de <i>F. hybrida</i> .	74

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Familias nativas del Ecuador enumeradas en orden descendente según su número de especies, con el porcentaje de especies endémicas.	90
Anexo 2: Muestras Herbario Nacional del Ecuador (referencia para la identificación de la especie <i>F. pilaloensis</i>)	97
Anexo 3: Formulación de Medio MS para 1 litro	102
Anexo 5: Formulación de Medio Woody Plants Medium (WPM) establecido como T4	103
Anexo 6: Formulación de Medio de Kundson, Knudson “C” y Phytamax	104
Anexo 7: Análisis de Suelo de la zona de Recolección	105

RESUMEN

El género *Fuchsia* es extremadamente diverso, 22 especies se han registrado en los bosques andinos y subpáramos, 12 especies endémicas del Ecuador entre las cuales están *Fuchsia pilaloensis* y *F. hybrida*; la primera, distribuida en las provincias de Bolívar y Cotopaxi, se encuentra en peligro de extinción, siendo clasificada como vulnerable en la lista roja de especies endémicas, por la UICN. Mientras que *F. hybrida* está distribuida en el callejón interandino y en las estribaciones occidentales y orientales.

El propósito de la presente investigación fue establecer un protocolo de regeneración *in vitro* y aclimatación para *Fuchsia pilaloensis* y *Fuchsia hybrida* a partir de sus brotes, para su conservación. Se evaluaron tres tratamientos de desinfección, siendo el tercer protocolo (T3) el óptimo, donde se aplicaron fungicidas (Carbendazim y Benomil 2g.l^{-1}), bactericidas (Ampicilina y Solución de Iodo 1ml.l^{-1}), Hipoclorito de Sodio al 3%, alcohol al 70%, y tween 20. Para los dos primeros tratamientos evaluados se obtuvieron altos porcentajes de contaminación, mientras que para el último protocolo (T3), la contaminación disminuyó considerablemente hasta 1% de contaminación fúngica y 0% para contaminación bacteriana. Para el cultivo *in vitro* se ensayaron cinco medios de cultivo que fueron: Knudson (T1), Knudson "C" (T2), Phytamax (T3), Woody Plants Medium (T4) y Woody Plants Medium (WPM)+ Auxinas (ANA 0,5mg/l) (T5), se evaluaron variables como: porcentaje de formación de callos, en donde T4 presentó el porcentaje más alto, con 33,33% de explantes con callos, en *Fuchsia pilaloensis*; mientras que *F. hybrida* no formó callos. La longitud del tallo para *F. hybrida* fue de 7,42cm, mientras que para *F. pilaloensis* fue de 1,5cm en T4; el porcentaje de enraizamiento de *F. hybrida*, fue del 100% para los tratamientos T1, T2, T3 y T4. Mientras que para *F. pilaloensis* fue del 7,5% en T1. Con los datos obtenidos, se determinó que el medio WPM (T4) fue óptimo para el crecimiento de *Fuchsia hybrida*. Debido a la presencia de microorganismos endófitos y su elevada mortalidad en *F. pilaloensis*, no se seleccionó ningún medio *in vitro* y no pasó a la fase de aclimatación. Se realizó la adaptación de *F. hybrida* en dos sustratos, determinándose S1 (Turba+ cascarilla) y S2 (Musgo+ piedra pómez + tierra) como óptimos para su aclimatación, presentando un 87% de sobrevivencia para ambos tratamientos.

Palabras claves: Regeneración, *in vitro*, Aclimatación, *Fuchsia pilaloensis*, *Fuchsia hybrida*, Conservación.

ABSTRACT

The genus *Fuchsia* is extremely diverse, 22 species have been recorded in the Andean forests and sub badlands, 12 endemic species which *Fuchsia pilaloensis*, and *F. hybrida*, the first is endemic to Ecuador and is in danger of extinction, being classified as vulnerable on the UICN Red List of endemic species by IUCN, and is distributed in the provinces of Bolivar and Cotopaxi. While *F. hybrida* is distributed in the Inter Andean foothills, and both Western and Eastern.

The purpose of the research was to establish a protocol for *in vitro* regeneration and acclimatization for *Fuchsia pilaloensis* and *Fuchsia hybrida* to preserve them, from their buds, which was developed in the laboratory of Biotechnology in the Salesian Polytechnic University. We evaluated three disinfection treatments, the third protocol (T3) the optimum for disinfection, which were applied fungicides (Carbendazim y Benomil 2g.l^{-1}), bactericides (Ampicilina y Solución de Iodo 1ml.l^{-1}), sodium hypochlorite 3%, alcohol 70%, and Tween 20. The results were a high percentage of contamination for the first two treatments evaluated, while for the latter protocol, pollution sharply decreased to 1% and 0% fungal contamination to bacterial contamination.

For *in vitro* cultivation were used 5 mediums which were: Knudson (T1), Knudson "C" (T2), Phytamax (T3), Woody Plants Medium (T4) and Woody Plants Medium (WPM) + auxin (NAA 0.5 mg / l) (T5), and were valued variables such as percentage of callus formation, where T4 showed the highest percentage, with 33.33% of explants with callus in *Fuchsia pilaloensis*, as *F. hybrida* not form calluses. Stem length for *F. hybrida* was 7.42 cm, while for *F. pilaloensis* was 1.5 cm, the rooting percentage of *F. hybrida*, was 100% for T1, T2, T3 and T4. While for *F. pilaloensis* was 7.5% in T1. With the data obtained, was determined that the medium WPM (T4) is optimal for the growth of *Fuchsia hybrida*. *F. pilaloensis* due to the presence of endophytes microorganisms and high mortality, above 50% in all medium, the latter not passed to the acclimatization phase. In addition, we performed adaptation of *F. hybrida* in two substrates, determining S1 (peat + husk) and S2 (Moss + pumice + earth) as optimal for acclimatization, showing an 87% survival for both treatments.

Keywords: Regeneration, *in vitro*, Acclimation, *Fuchsia pilaloensis*, *Fuchsia hybrida*, Conservation.

INTRODUCCIÓN

La familia Onagraceae está constituida por alrededor de 17 géneros y más de 675 especies a nivel mundial, especialmente en las regiones templadas o subtropicales, principalmente del Nuevo Mundo, siendo abundantes en el Oeste de EE.UU, Centro y Sudamérica. En el Ecuador la familia Onagraceae, posee alrededor de 53 especies, de las cuales 13 son endémicas, que representa un porcentaje de endemismo del 24.5% (anexo 1) (León-Yáñez, 1995). Entre los géneros pertenecientes a esta familia se destacan: *Fuchsia*, *Oenothera*, *Circacea*, *Epilobium*, *Ludwigia*, *Boisduvallia*, *Gayophytum*, *Stenosiphon*, *Calylophus*, *Xylonagra*, *Camissonia*, *Hauya*, *Chamerion*, *Hemifuchsia*, *Heterogaura*, *Clarkia*, *Zauschneria*, *Gongylocarpus*, *Lopezia*, *Eucharidium*, *Gaura* (UNNE, 2011 y Smithsonian National Museum of Natural History, 2011). El género *Fuchsia* consta de 30 especies, de las cuales 12 son endémicas, con una distribución altitudinal entre 1000 a 4000msnm, ubicándose en todo el callejón interandino; sin embargo, estas son desconocidas en el país, pese a su enorme potencial ornamental (Sierra, 1999).

Fuchsia pilaloensis y *F. hybrida* cumplen un rol central en la ecología altoandina, constituyendo el hábitat de muchas especies de plantas y animales, lo que permite regular la escorrentía, controlar los procesos erosivos, aumentar el aporte hídrico mediante la condensación de neblina en sus hojas, proteger las cuencas, la calidad de los suelos y del agua, razón por la cual, la pérdida de estos bosques generaría un gran impacto al ambiente y a la biodiversidad. La conversión de áreas selváticas en suelos productivos, la tala indiscriminada de los bosques, la contaminación ambiental, la construcción de carreteras conlleva a la pérdida de la biodiversidad de estas especies, por la disminución de la humedad relativa, factor importante para el desarrollo del género (Arkive, 2010).

Debido a la importancia que tienen ambas especies de *Fuchsia* en el ecosistema, la presente investigación se basa en el establecimiento de un protocolo de regeneración *in vitro* y aclimatación para *Fuchsia pilaloensis* y *Fuchsia hybrida* para su conservación. El cultivo *in vitro* es un método de propagación de plantas, que se realiza en laboratorio, en condiciones estériles. Para introducir especies en cultivo *in vitro*, se toma en consideración criterios como: especies que presentan problemas para

ser regeneradas *in vivo*, es decir, bajo porcentaje de germinación (*F. hybrida*); especies que tienen valor comercial (*F. hybrida* como ornamental) y especies leñosas en peligro de extinción, cuyo objetivo sea su conservación (*F. pilaloensis*) (Estopa, 2005).

No existen estudios previos sobre *F. pilaloensis* en *in vitro*; sin embargo Chávez (2000), realizó un estudio para *F. hybrida* sobre propagación *in vitro* en el medio WPM, en base a ello, y a diversos estudios realizados para plantas leñosas, la presente investigación se basó en seleccionar un método de desinfección óptimo para brotes de *Fuchsia pilaloensis* y *Fuchsia hybrida*, mediante la evaluación de tres protocolos, con la finalidad de establecer explantes libres de microorganismos *in vitro*.

La desinfección de los explantes de *Fuchsia pilaloensis* y *F. hybrida* fue superficial, consistió en lavar los explantes, adicionar etanol al 70% por 1 minuto, hipoclorito de sodio (0,5 a 3% de cloro) más tensoactivos para favorecer su penetración y actividad, como Tween 20 o Tween 80 al 1%.

La fase de introducción consistió en la evaluación de explantes de *F. pilaloensis* y *F. hybrida*, en cinco medios de cultivo, que fueron: Woody Plant Medium (WPM), Woody Plant Medium con auxinas (WPM+ aux 0,5- 1mg/l⁻¹), Knudson, Knudson "C" y Phytamax.

Según Flores (2009) y Gilsanz (2007), para la fase de aclimatación de *F. pilaloensis* y *F. hybrida* se extrajeron los explantes de los tubos de ensayo, y se lavaron las raíces para eliminar residuos de medio de cultivo, posteriormente, fueron colocados en dos mezclas de sustratos: S1 (Turba + cascarilla) y S2 (Musgo+ piedra pómez+ tierra).

CAPÍTULO I

1.1. Justificación

La familia Onagraceae comprende de un conjunto de plantas herbáceas bianuales, que constituyen alrededor de 650 especies. El género *Fuchsia*, perteneciente a dicha familia, consta de 100 a 110 especies, distribuidas en América y Oceanía, en las zonas montañosas desde México hasta Tierra del Fuego, en Nueva Zelanda y Tahití. En el Ecuador están representadas unas 30 especies andinas; distribuidas entre los 1000 msnm hasta los 4000 msnm (Caranqui, 2008).

El género *Fuchsia* es extremadamente diverso, 22 especies se han registrado en los bosques andinos y subpáramos (Ulloa, 2008), 12 especies endémicas entre las cuales está *F. pilaloensis*, que es desconocida en el Ecuador, pese a su enorme potencial ornamental (Caranqui, 2008), y especies como *Fuchsia hybrida*, originaria de América Central y Sudamérica. *Fuchsia pilaloensis*, es endémica del Ecuador y se encuentra en peligro de extinción, siendo clasificada como vulnerable en la lista roja de especies endémicas, por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza); se encuentra distribuida en las provincias de Bolívar y Cotopaxi. Mientras que *F. hybrida* es una planta, distribuida en el callejón interandino y las estribaciones tanto occidentales y orientales (Caranqui, 2008).

Los lugares donde se desarrolla la especie *F. pilaloensis* y *F. hybrida* cumplen un rol central en la ecología altoandina, constituyendo el hábitat de muchas especies de plantas y animales, lo que permite regular la escorrentía¹, controlar los procesos erosivos, aumentar el aporte hídrico mediante la condensación de neblina en sus hojas, proteger las cuencas, la calidad de los suelos y del agua, razón por la pérdida de estos bosques generaría un gran impacto al ambiente y a la biodiversidad. La conversión de áreas selváticas en suelos productivos, la tala indiscriminada de los bosques, la contaminación ambiental, la construcción de carreteras conlleva a la pérdida de la biodiversidad de las especies, por la disminución de la humedad relativa, factor importante para el desarrollo del género (Arkive, 2010).

¹ Término geológico de la hidrología, que hace referencia a la lámina de agua que circula sobre la superficie en una cuenca de drenaje, es decir la altura en milímetros del agua de lluvia escurrida y extendida.

La presente investigación evaluará el empleo de tres diferentes protocolos de desinfección, medios de cultivo y técnica de cultivo *in vitro*, para producir plantas completas de *F. pilaloensis* y *F. hybrida* libres de enfermedades, que serán adaptadas a sustratos para su conservación.

1.2. Hipótesis

F. pilaloensis y *F. hybrida* crecen en medios para cultivo *in vitro* y se aclimatan en campo para ser conservadas.

1.2.1. Hipótesis Alternativa (Ha)

Una de las dos especies de *Fuchsia* (*F. pilaloensis* o *F. hybrida*) crecerán en medios para cultivo *in vitro* y se aclimatarán en campo para ser conservadas.

1.2.2. Hipótesis Nula (Ho)

Ninguna de las especies de *Fuchsia* (*F. pilaloensis* o *F. hybrida*) crecerán en medios para cultivo *in vitro* y ni se aclimatarán en campo para ser conservadas.

1.3. Objetivos

Objetivo General

Establecer un protocolo de regeneración *in vitro* y aclimatación para *Fuchsia pilaloensis* y *Fuchsia hybrida* para su conservación.

Objetivos Específicos

- Seleccionar un método de desinfección óptimo para brotes de *Fuchsia pilaloensis* y *Fuchsia hybrida*, mediante la evaluación de tres protocolos, con la finalidad de establecer explantes libres de microorganismos *in vitro*.
- Determinar el medio óptimo para el establecimiento *in vitro* de *Fuchsia pilaloensis* y *F. hybrida* en las fases de introducción y elongación, mediante la evaluación de cinco medios.
- Establecer el sustrato óptimo para la aclimatación de *F. pilaloensis* y *F. hybrida*, mediante la evaluación de dos mezclas de sustratos.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Familia Onagraceae

Según la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE, 2011) y Smithsonian Nacional Museum of Natural History (2011), la familia Onagraceae comprende 700 especies de plantas anuales esparcidas en todo el mundo. Se caracterizan por ser plantas dicotiledóneas, dialipétalas, son principalmente hierbas, pero también hay arbustos y árboles.

Géneros: Comprende unos 17 géneros; los más importantes son: *Fuchsia*, *Oenothera*, *Circacea*, *Epilobium*, *Ludwigia*, *Boisduvallia*, *Gayophytum*, *Stenosiphon*, *Calylophus*, *Xylonagra*, *Camissonia*, *Hauya*, *Chamerion*, *Hemifuchsia*, *Heterogaura*, *Clarkia*, *Zauschneria*, *Gongylocarpus*, *Lopezia*, *Eucharidium*, *Gaura* (UNNE, 2011 y Smithsonian Nacional Museum of Natural History, 2011).

Características de la familia:

Las hojas son simples, alternas u opuestas, sin estípulas, el tallo es generalmente herbáceo, sin embargo también existen especies leñosas como las especies del género *Fuchsia*. Las flores son regulares, generalmente en racimos o solitarias; el cáliz con 4 sépalos libres, la corola con 4 pétalos libres, 8 estambres, el ovario es ínfero y estigma cuadrilobulado. El fruto es generalmente una cápsula (Patzelt, 2004).

2.1.1. Importancia y Distribución Geográfica

Importancia

Según UNNE (2011) y Álvarez (2011), diversas especies de *Clarkia* y *Oenothera* se cultivan como ornamentales en jardines, mientras algunos del género *Fuchsia* se cultivan como arbustos de interior. Especies de *Ludwigia* se cultivan como acuáticas en invernaderos. *Fuchsia boliviana* posee flores muy vistosas, que se agrupan en racimos pendulares de color rojo, por lo que es muy utilizada como ornamental, además sus frutos pueden comerse frescos, ya que son dulces, agradables y aptos para la elaboración de mermeladas.

Distribución Geográfica

Según la Universidad Nacional del Nordeste (2011), la familia Onagraceae está constituida por alrededor de 17 géneros y más de 675 especies a nivel mundial, especialmente en las regiones templadas o subtropicales, principalmente del Nuevo Mundo, siendo abundantes en el Oeste de EE.UU. Muchas especies se cultivan con fines ornamentales (*F. hybrida*), sólo *Fuchsia* tiene una distribución altitudinal entre los 1000 a 4000msnm ubicándose en todo el callejón interandino, especialmente en remanentes de bosques pie montanos hasta montano alto, además se puede encontrar en las estribaciones tanto de la cordillera occidental como la oriental. Se le puede observar en filo de carreteras entre mezclados con especies como *Bomarea multiflora*, *Centropogon spp*, *Brachyotum ledifolium*, principalmente, y depende del área geográfica para que estén entre mezclados con otras especies (Sierra, 1999).

2.1.2. Géneros de Onagraceae en Ecuador

En el Ecuador existe alrededor de 273 familias reportadas, de las cuales 254 son nativas. El mayor número de especies se encuentra en las Orchidaceae, seguido de las Asteraceae, Melastomataceae, Rubiaceae, Poaceae, Bromeliaceae, Piperaceae, Araceae, Solanaceae y Dryopteridaceae, Mientras que la familia Onagraceae, posee alrededor de 53 especies, de las cuales 13 son endémicas, con una porcentaje de endemismo de 24.5% (anexo 1) (León-Yáñez, 1995).

Según Ulloa (2008) y Gentry (1993), la familia Onagraceae en Ecuador constituye principalmente hierbas y arbustos, distribuidos en las regiones templada y tropical; consta de 53 géneros y 675 especies; de los cuales 4 géneros nativos y 45 especies.

En el Ecuador el género *Fuchsia* consta de 30 especies, de las cuales 12 son endémicas, sin embargo, estas son desconocidas en el país, pese a su enorme potencial ornamental, lo lamentable es que varias especies de *Fuchsia* cuyo uso es ornamental pero éstas son introducidas (Caranqui, 2008).

2.1.3. Especies de *Fuchsia* en Ecuador

Según Berry (1982), el género *Fuchsia* corresponde a arbustos, pequeños árboles y trepadores. Posee hojas opuestas, alternas o verticiladas, enteras o aserradas,

nervación pinnada; estípulas pequeñas, usualmente caducas. Inflorescencia paniculada o flores solitarias axilares. Flores bisexuales, rojas, anaranjadas o rosadas; hipanto² prolongado sobre el ovario; 4 sépalos lobulados, pétalos 4 o ausentes; estambres 8; ovario ínfero, 4-carpelos, numerosos óvulos en placentas axilar parietales, estilo filiforme y estigma -lobulado. Fruto una baya.

Según Caranqui (2008) y Ulloa (1995), el género *Fuchsia* consta de 100 especies distribuidas en las zonas montañosas desde México hasta Tierra del Fuego, en Nueva Zelanda y Tahití. En el Ecuador están representadas unas 30 especies andinas; muy pocas se distribuyen a 1000 msnm. El género es extremadamente diverso y se encuentra hasta los subpáramos; 22 especies se han registrado en los bosques andinos y subpáramos: *Fuchsia ampliata*, *F. ayavacensis*, *F. boliviana*, *F. cinerea*, *F. corollata*, *F. dependens*, *F. glaberrima*, *F. harlingii*, *F. lehmannii*, *F. loxensis*, *F. macrostigma*, *F. orientalis*, *F. pallescens*, *F. pilaloensis*, *F. polyantha*, *F. scabriuscula*, *F. scherffiana*, *F. sessilifolia*, *F. steyermarkii*, *F. sylvatica* y *F. vulcanica*. *Fuchsia hybrida* y *F. magellanica* son cultivadas por sus vistosas flores.

2.1.3.1. *Fuchsia hybrida*

Según Hidalgo (2009), Caranqui (2008) y Pereira (2007), el nombre científico es “*Fuchsia hybrida*” (Cuadro 1) en América es más popular como Aretillo y en Europa como *Fuchsia*, Pendientes de la reina y *Fuchsia hybrida*. Su origen es Centro y Sudamérica y pertenece a la familia *Onagraceae*. Es un arbusto caducifolio. La mayoría de las especies de *Fuchsia* son arbustos de 0.2-4m de talla, las hojas de *Fuchsia* son opuestas en grupos de 3-5, lanceoladas simples, con el borde dentado de 1-25cm de longitud, y hoja perenne. Posee diversos colores: las hay con cáliz desde blanco a fucsia intenso. Las flores son colgantes, de pedúnculos largos que las hacen mirar hacia abajo. El cáliz es cilíndrico, con cuatro lóbulos y corola de cuatro pétalos. Tienen forma de pendientes, tienen cuatro sépalos alargados y estrechos, y cuatro pétalos cortos y anchos; en muchas especies los sépalos son de color rojo brillante, y los pétalos de color púrpura (combinación de colores que atrae a los colibríes que las polinizan), pero los colores pueden variar de blanco a rojo oscuro, azul púrpura, y naranja. Unas pocas especies tienen tonos amarillos.

² Es el receptáculo cóncavo de las flores con ovario ínfero sobre el cual aparentemente nacen el cáliz, la corola y los estambres.

El fruto en baya pequeña (5-25mm) rojo-verdosa oscura a rojo intensa, es comestible y presenta numerosas semillas pequeñas en su interior. Es una especie que tolera las bajas temperaturas y la media sombra. Prefiere los ambientes húmedos, el suelo muy drenado, con tendencia ácida.

Cuadro 1: Descripción taxonómica de *Fuchsia hybrida*

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Mortales
Familia	Onagraceae
Nombre Científico	<i>Fuchsia hybrida</i>
Descriptor	Charles Plumier

Fuente: Caranqui, 2008.

Cuadro 2: Descripción taxonómica de *Fuchsia pilaloensis*.

Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Tracheophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Mortales</i>
Familia	<i>Onagraceae</i>
Nombre Científico	<i>Fuchsia pilaloensis</i>
Descriptor	<i>P.E. Berry</i>

Fuente: UICN, 1997.

Cuadro 3: Información de la evolución, distribución geográfica, hábitat y ecología, amenazas y acciones de conservación de *F. pilaloensis*.

Información de la Evaluación	
Categoría de la lista roja y criterios	Vulnerable D2
Año de publicación	2004
Asesor	León-Yáñez, S. & Pitman, N.
Publicador	Valencia, R., Pitman, N., León-Yáñez, S. & Jørgensen, PM (Plantas Ecuador Autoridad de la Lista Roja)
Justificación	<i>Fuchsia pilaloensis</i> es endémica de los Andes ecuatorianos. Conocida por una sola población. Descrito como localmente rara ³ . Clasificada en peligro por la <i>Lista Roja de 1997 de Plantas Amenazadas</i> ⁴ . La destrucción del hábitat es la única amenaza conocida
Historia	1997- <i>En peligro</i> (Walter y Gillet 1998)
Distribución Geográfica	
Descripción, rango	Endémica de Los Andes ecuatorianos (en la provincia de Cotopaxi). Se localiza en la población de Pilaló- Pujilí- Cotopaxi, a lo largo de la carretera Latacunga-Quevedo.
Países	Nativo: Ecuador
Hábitat y Ecología	
Hábitat y Ecología	Arbusto que se encuentra en el bosque alto andino (2,000-3,500m). Además de ser epífita ⁵ es leñosa y desarrolla tallos trepadores.
Sistema	Terrestre y aéreo
Amenazas	
Causa de la Amenaza	Destrucción del hábitat.
Acciones de conservación	
Acciones de conservación	No se sabe si se encuentra como área protegida de Ecuador

Fuente: UICN, 1997.

Descripción Botánica de *Fuchsia pilaloensis* según P. Berry (1982)

F. pilaloensis es un arbusto que se encuentra en el bosque alto andino/nublado (2,000-3,500msnm). El tallo es leñoso, mide 4m de largo, posee una raíz pivotante (predomina una raíz principal que se ramifica en raíces secundarias), las hojas son

³ P. Moreno, com. Pers.

⁴ Walter y Gillett, 1998

⁵ Berry 1982.

alternas, opuestas, membranosa, estrechamente ovadas, 40-120mm de longitud, 25-54cm de ancho, a menudo desiguales a cada lado del margen, ápice acuminado, base aguda a redondeada, poseen vellosidades a lo largo de los nervios y márgenes; margen dentado, venas secundarias 6-9 en cada lado de la vena central. Pecíolos pubescentes, 15-38mm de largo, las flores son colgantes de largos cálices, de color rosado de 15-22cm de largo; poseen ovario cilíndrico de 5-7cm de largo, 2cm de ancho; los sépalos blanquecino a rosado pálido, anteras oblongas, amarillas, 3-4cm de largo, 2.5-3cm de ancho, estilo de color rosa pálido, el fruto en baya de 5-25mm, es de color rojo. Época de floración corresponde desde Junio a Octubre.

2.2. Especies en extinción

Debido a la gran variedad de ambientes altitudinales y ecológicos en las diversas regiones del Ecuador, la flora es extremadamente diversa y rica. Esta variabilidad, se debe a que al ecosistema tropical se añade el efecto de la cordillera de los Andes, que crea fajas o pisos altitudinales, que a su vez dan lugar a la más variada gama de climas, ecologías y formaciones vegetales (Jaramillo, 2011).

Aunque aún no se ha estudiado en profundidad, se ha calculado que existen entre 22.000 y 25.000 especies de plantas, de las cuales más de 2.000 corresponden a especies arbóreas y más de 3.000 son orquídeas. La diversidad es tal que en algunas regiones de la selva húmeda ecuatoriana se han encontrado más de 200 especies de árboles por hectárea, casi 10 veces más que los más ricos bosques templados de Norteamérica (ESPOL, 2010).

La tasa de endemismo es muy alta por la gran cantidad de barreras geográficas que han favorecido la aparición de especies de distribución restringida. Se ha elaborado una lista de 40 especies prioritarias de conservación entre las que se encuentran el maíz, la zanahoria blanca, achira, yuca, miso, jícama, maní de árbol, achogcha, especies del género *Fuchsia* y varios frutos nativos (Álvarez, 2011).

Según Vargas y González (2011), Pabón y Sánchez (2010), Zamudio (2005), Peñafiel (2003) y la Unión Mundial para la Naturaleza (2000), el Ecuador es uno de los países con mayor riqueza en flora silvestre, pero muchos de ellos están en un serio peligro por factores como:

1. La destrucción de los bosques naturales, entre los que constan, los manglares, los bosques tropicales, los bosques secos de la costa y la vegetación de la región interandina. Los manglares han servido desde la época prehispánica para la extracción de madera, la obtención de la leña o carbón; pero desgraciadamente en la actualidad el manglar es destruido para crear piscinas camarónicas, lo que motiva constantes protestas por parte de las comunidades vecinas a los manglares, ya que estos bosques representan fuente de alimentación y negocio por abundancia de peces, moluscos y crustáceos. Los bosques tropicales, de una gran extensión de la costa, han sido sometidos a una enorme explotación maderera, y reemplazados por tierras agrícolas, o se han convertido en terrenos desérticos. Los bosques de la Amazonía y los bosques de las estribaciones andinas han sido, en parte, deforestados para dar paso a tierras para pasto y agricultura, lo mismo sucedió con los bosques interandinos.
2. La sobreexplotación de plantas, como la extracción de madera ha causado una gran disminución de vegetación y la pérdida de muchísimos animales. Muchas especies vegetales y animales se encuentran en proceso de extinción.
3. La contaminación del agua, suelo y aire, con toda clase de degradantes como plaguicidas, fertilizantes, productos agroindustriales de desecho, productos de la actividad petrolera, ha provocado un deterioro de la biodiversidad.

Existe una gran lista que enumera los cientos de especies amenazadas y que están catalogadas como en peligro crítico⁶, en peligro⁷ y vulnerables⁸, por la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 1997).

2.2.1. Especies endémicas y su importancia en el ecosistema

Se considera que una especie es endémica cuando se conoce únicamente de un solo lugar, ya sea país o región, y no existe en ningún otro. A medida que se avanza en el conocimiento de la biodiversidad, especies que eran consideradas endémicas dejan de serlo en el momento en que se encuentran en otro país o región (Instituto Nacional de Biodiversidad Costa Rica, 2010).

⁶ Enfrenta un riesgo extremadamente alto de extinción en estado silvestre.

⁷ Todos los miembros vivos de dicho taxón están en peligro de desaparecer.

⁸ Presenta una alta probabilidad de convertirse en "Especie en peligro de extinción"

La mayoría de las especies nativas del Ecuador también existen en otros países como Colombia y Perú o pueden alcanzar Centroamérica o Bolivia, o incluso otros continentes. Pero aproximadamente una de cada cuatro especies ecuatorianas es endémica, es decir, se encuentra exclusivamente en el Ecuador. Actualmente se conocen 4.143 especies endémicas (27% de las 15.306 registradas). Se estima que de cada dos especies nuevas que se descubren en el país, una resulta ser endémica. Con frecuencia el número de estas puede disminuir si se encuentran en zonas aún inexploradas de otros países (especialmente en los países vecinos) o puede aumentar si se encuentran nuevas endémicas en áreas inexploradas del Ecuador (Vargas y González, 2011).

En cuanto a regiones naturales, la más diversa es la región andina, a pesar de que ha sido la más deforestada del país. De cada 100 especies ecuatorianas 64 son andinas. Muchas se encuentran compartidas entre las regiones; así, por ejemplo, en la Costa se encuentran 1.956 especies que alcanzan estribaciones de los Andes hasta la Sierra y a su vez, en la Amazonía existen 1.803 especies también crecen en la Sierra (Zamudio, 2005).

Según Álvarez (2011) y Pérez (2011), la importancia de conservar las especies endémicas radica precisamente en que su representación está limitada al lugar que habitan, y en que su desaparición significaría la pérdida de una parte singular de la biodiversidad. Las áreas ricas en endemismos y especialmente si son pequeñas en extensión, son las más importantes para la conservación, pues la pérdida de estas áreas traería consigo la extinción de un gran número de especies. Simplemente, una especie endémica extinguida no podrá ser recuperada nunca más, con lo que eso significa en cuanto al estudio de la biología evolutiva, a la pérdida de diversidad genética, a las posibles conexiones de carácter trófico y a los beneficios que el hombre puede obtener de ella.

2.2.2. Especies en peligro de extinción en el Ecuador

La primera vez que las plantas fueron incluidas en la Lista Roja de la UICN (Unión Mundial para la Naturaleza) fue durante 1997. Ese año, las cifras revelaron que cerca de 380 especies se habían extinguido en estado silvestre y casi 370 fueron consideradas como amenazadas. Sin embargo, sólo era una primera aproximación, ya

que esta lista incluyó solamente plantas vasculares (helechos, coníferas y plantas que producen flores). Según la Lista Roja 2007 de la UICN, de las 12.043 plantas clasificadas, 8.447 están consideradas como especies amenazadas. En sectores como América Central y del Sur, África Central y Occidental y el Sudeste Asiático, los organismos vegetales endémicos están declinando a una velocidad inesperada.

2.3. Propagación de *Fuchsia*

Según Banda (1998), en el estudio “**Arbustos Ornamentales; *Fuchsia*; propagación vegetativa; propagación por esqueje; micropropagación; cultivo *in vitro*; enraizamiento; esquejes; reguladores de crecimiento; medio de cultivo**”, se han hecho ensayos en el Campus Experimental San Bernardo y los laboratorios de cultivo de tejidos de la Universidad Santo Tomas. En lo referente al cultivo *in vitro* se evaluaron distintos medios de cultivo (agar base, MS, MS 1/2, WPM, WPM 1/2) (ver anexo 2 y 3) en las cuatro estaciones del año (invierno, primavera, verano u otoño) con adición de distintos reguladores de crecimiento (ANA, AIB, BAP, Zea y AG3). Todos los medios fueron gelificados con agar en una concentración de 6g/L^{-1} y el pH fue ajustado a 5,8 con KOH previa esterilización en autoclave. Finalmente, los medios de cultivos fueron mantenidos en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 16 horas luz, suministrado por tubos fluorescentes.

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio del análisis de varianza, y las diferencias entre los promedios fueron establecidas mediante la prueba de rango múltiple de Duncan con un nivel de significación del 5%, utilizando 3 repeticiones para cada tratamiento. En cultivo *in vitro* utilizando el medio MS 1/2 se obtuvo un 84% de microestacas enraizadas durante el invierno, en primavera un 20%, en verano 1% y durante el otoño un 40%. Con los otros medios probados (MS, WPM, WPM 1/2 y agar base) no se obtuvo respuesta. Tampoco se observó una respuesta frente al uso de reguladores de crecimiento, pero encontrándose un efecto del pH con valor 5, aumentando el número de microestacas enraizadas (45% de enraizamiento) durante el otoño, lo que indicaría que este factor es de importancia para futuras investigaciones. De acuerdo a los antecedentes, se postuló que uno de los principales factores que influye en la capacidad regenerativa de la especie son las condiciones climáticas y la influencia del pH del suelo de la planta original o planta madre.

2.4. Cultivo de tejidos

Según Riviero (2011), Suárez (2011) y Olmos *et al.* (2005), el descubrimiento de la totipotencia⁹ de las células vegetales y la posibilidad de desarrollar plantas normales y completas a partir de diferentes explantes, ha derivado en diferentes estrategias para la conservación de germoplasma utilizando el cultivo de tejidos. Para ello se requieren condiciones específicas referidas al medio del cultivo, relaciones hormonales, temperatura, fotoperíodo (luz), etc. Periódicamente se debe hacer cambio de medios de cultivo (refrescamiento) después de cada división para suministrar constantemente condiciones nutricionales óptimas. La tasa de multiplicación es muy importante en términos de eficiencia, como en el número de explantes, la rapidez en el crecimiento en brotes formados a partir del explante inicial. La dediferenciación consiste en la transformación y pérdida de las características de especialización de un tipo celular para dar lugar a células de tipo meristemático¹⁰. El siguiente paso involucrado en la regeneración de una planta es la rediferenciación de las células previamente dediferenciadas. Todo proceso de diferenciación está regulado por el balance entre diferentes tipos de reguladores del crecimiento, fundamentalmente de auxinas y citocininas. El mantenimiento de los recursos fitogenéticos¹¹ mediante los métodos de cultivo *in vitro* se logra generando cambios en el ambiente de cultivo que permita desacelerar el crecimiento de las células y los tejidos, con esto se pretende aumentar el periodo de transferencia del cultivo. Este método cubre un amplio espectro de técnicas que implican el cultivo bajo condiciones de asepsia, de órganos o fragmentos de órganos (meristemas, semillas, embriones somáticos¹², embriones cigóticos¹³, hojas, tallos, raíces, yemas, polen, anteras, callos¹⁴ o protoplastos), en un medio de cultivo artificial definido, bajo condiciones ambientales controladas. El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro*, es una técnica de producción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo miles y millones de plantas genéticamente

⁹ Es la capacidad de regeneración de una planta entera a partir de una célula o grupo de células.

¹⁰ Son células morfológicamente indiferenciadas, pero especializadas en la función de dividirse ordenadamente.

¹¹ Material hereditario con valor económico, científico o social contenido en las especies.

¹² Formación de un embrión a partir de una célula somática, sin la necesidad de la fusión de gametos

¹³ Formación de un embrión a partir de una células haploides para en lo posterior pasar a semilla

¹⁴ Acumulación de células sin diferenciación.

iguales a la planta madre cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas o químicas controladas en un medio de cultivo (Segretin, 2006).

Para introducir especies en cultivo *in vitro*, se toma en consideración criterios como: especies que presentan problemas para ser regeneradas *in vivo*, es decir, bajo porcentaje de germinación (*Pelargonium peltatum*); especies que tienen valor comercial (*Ilex aquifolium* y *F. hybrida* como ornamental); especies leñosas en peligro de extinción y cuyo objetivo sea su conservación (*F. pilaloensis*) (Estopa, 2005).

Existen especies leñosas de interés agrícola en especial las especies frutícolas como la pera, la manzana, el mango, los cítricos y especies leñosas forestales como el eucalipto, coníferas, la teca, especies de *Fuchsia*, entre otras. Tradicionalmente, las especies forestales fueron propagadas vegetativamente mediante el enraizamiento de estacas. Sin embargo, para la mayoría de los árboles propagados por estacas se observa una rápida pérdida de capacidad de rizogénesis al aumentar la edad de la planta donante de las estacas (Jaramillo, 2008). La primera especie leñosa regenerada mediante el cultivo de tejidos fue *Populus tremuloides* a partir de callos; la primera gimnosperma fue *Pinus palustris* a partir de embriones; hasta la fecha 57 especies maderables a partir de las cuales se han podido regenerar plantas completas *in vitro* (Mroginski, 1991).

En los últimos años ha nacido el interés por especies leñosas amenazadas o en vía de extinción, un claro ejemplo es la especie del género *Fuchsia* como es el caso de *F. pilaloensis*, cuya propagación mediante técnicas de cultivo *in vitro*, no ha sido realizado ni estudiado a profundidad, mientras que en el caso de *F. hybrida* se han realizado ensayos de cultivo *in vitro*, obteniendo yemas axilares (Kevers *et al.*, 1983 y Marín, 1997).

2.4.1. Medios de cultivo

Los componentes de los medios de cultivo han sido objeto de estudio; se agrupan en cinco clases de compuestos: a) macro y microelementos; b) fuentes de carbono, generalmente sacarosa; c) vitaminas; d) nitrógeno reducido, y e) reguladores de crecimiento. El regulador de crecimiento más importante para la formación de brotes

es la cinetina; sin embargo, las auxinas en bajas concentraciones son efectivas en algunas especies (Riviero, 2011 y Mroginski, 1991).

Según Cárdenas (2011), Lozano (2011), Ponce *et al.* (2009), Chinchilla (2008), Matos-Escudero (2007), Cadavid (2006), Muñoz (2006), Jorge (2005) y Gonzáles *et al.* (2003), los medios basales más empleados en todas las especies, son el MS formulado por Murashige & Skoog (1962), diluido a la mitad o a un cuarto de su formulación original o el Woody Plant Medium (WPM), formulado por Lloyd & McCown (1981). Los cultivos *in vitro* no son autótrofos por lo que es necesario agregar una fuente de carbono, así la sacarosa al 2% a 5% es el azúcar utilizado, se puede utilizar también glucosa o fructosa. Los reguladores de crecimiento más utilizados son el Ácido Naftalenacético (ANA) y la Benciladenina (BA). También han sido efectivas auxinas como el Ácido Indolbutírico (IBA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y citocininas como la 2- Isopentil Amino Purina (2iP), Cinetina (CIN), Zeatina (Z) y Tidiazurón (TDZ).

En general, los cultivos se incuban a $27\pm 2^{\circ}$ C con 16 horas de fotoperíodo e intensidades lumínicas moderadas (Olmos, 2005).

2.4.1.1. Composición de los Medios de Cultivo

Según Lozano (2011), Segretín (2006), Olmos *et al.* (2005) y Erston (1998), el contenido químico del medio de cultivo debe satisfacer las necesidades para garantizar el crecimiento de la planta, estos componentes están clasificados en macro y micronutrientes además de fitohormonas, vitaminas, agente gelificante y fuentes de carbono.

Macroelementos.- Los macroelementos subdividen en: *primarios* que los constituyen el Nitrógeno, Fósforo y Potasio; *secundarios* Azufre, Calcio y Magnesio.

Microelementos.- Boro, Zinc, Manganeso, Cobre, Molibdeno, Hierro, Cloro.

Vitaminas.- Las vitaminas son compuestos orgánicos necesarios para la realización del metabolismo normal de ciertos organismos vivos, asemejándose a las enzimas u hormonas que el organismo necesita en cantidades relativamente mínimas para su normal crecimiento y desarrollo. Las vitaminas como Tiamina (B1), Biotina, Acido

Nicotínico, Piridoxina, Glicina, Mioinositol, participan en la nutrición y la asimilación, aumentando la cantidad de protoplasma, pero no afectan a la estructura de la planta.

Agente gelificante.- Uno de los mejores agentes gelificantes de que se dispone para realizar cultivos *in vitro* de tejidos vegetales es el agar, también conocido como agar-agar. Los gelificantes deben cumplir con los siguientes requisitos: no ser asimilado por el explante, lo que haría que al consumirse el medio retornase a su estado líquido, no interferir en la absorción de los nutrientes del medio de cultivo, y permanecer estable durante el tiempo de cultivo. En los medios semisólidos se adiciona agar (0.6% a 1.0%), uno de los agentes gelificantes usados en cultivo *in vitro* es phytigel. Los explantes cultivados en medios con phytigel absorben los nutrientes con mucha facilidad, lo que permite un crecimiento más rápido, sin embargo la velocidad de absorción puede ser excesiva, no pudiendo incorporarse a sus estructuras y compuestos sino que quedarían en solución dentro del explante, causando el problema conocido típicamente como hiperhidricidad, frecuente en cultivos de tipo leñoso.

Reguladores de crecimiento.- Son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que coordinan el crecimiento y desarrollo de las plantas. En algunos casos no son necesarios, pero en otros casos se debe añadir al medio sustancias reguladoras de crecimiento como auxinas. Según la Universidad Politécnica de Valencia (2003), se clasifican en: Auxinas, Citoquinina, Giberelinas, Ácido abscísico y Etileno.

✓ **Auxinas**

Las auxinas generalmente producen elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación del callo), formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares, adventicios y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión (Serrani, 2008). En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula (Abel, 1996).

La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la

célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación cuando aumenta la presión de turgencia. Durante este proceso se han detectado cambios en las concentraciones del trifosfato de inositol y del calcio iónico citoplasmático, los que actuarían como segundos mensajeros (Cleland, 1995). Las principales auxinas son: Ácido Indolacético (AIA), la misma que se añade en concentraciones de 0.01-10mg.l⁻¹, y 2,4-D, ANA, e IBA que se utilizan en concentraciones 0.001-10mg.l⁻¹ (Olmos *et al.*, 2005).

✓ **Citoquininas**

Son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemas en la punta de las raíces. Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo. La presencia de altos niveles de citoquininas puede facilitar su habilidad de actuar como una fuente demandante de nutrientes. Las citoquininas también se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles. Se encuentran en forma natural y sintética, las más conocidas son: zeatina, kinetina y 6- bencilaminopurina (BAP) (Lagoutte, 2009 y Lluna, 2006).

✓ **Giberelinas**

Son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en las puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. Sus funciones principales son: incrementar la tasa de división celular (mitosis), regular los procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, desarrollar raíces y floración, actuando sinérgicamente con las auxinas. Además de ser encontradas en el floema, las giberelinas también han sido aisladas de exudados del xilema, lo que sugiere un movimiento bidireccional de la molécula en la planta. El ácido giberélico es la hormona más conocida de esta clase de compuestos Ácido Giberélico (GA) (Contreras, 2001).

✓ **Ácido Abscísico**

Esta fitohormona tiene función antagónica a otras hormonas; es inhibidora del crecimiento de la plántula, la germinación de las semillas, estimula la senescencia de las hojas, el ABA (Ácido Abscísico) es importante en la aclimatación de las plantas a condiciones de sequía, frío y salinidad, y en el desarrollo de la latencia e inhibición de la germinación de semillas; regula el balance de agua en plantas en condiciones de estrés: con el cierre estomático y con la manutención de absorción de agua por la raíz (Roncancio, 2009 y Universidad Politécnica de Valencia, 2003).

✓ **Etileno**

Es una fitohormona que estimula el crecimiento transverso en las células de la planta; estimula la maduración de los frutos, el envejecimiento de las flores e inhibe el crecimiento de las semillas (Saavedra, 2008).

Fuentes de Carbono.- Tiene amplia disponibilidad, es asimilada con facilidad y es relativamente estable (Slater, 2008). Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, razón por la cual se le agregan fuentes de carbono, como la sacarosa (2-5%), siendo la más utilizada; sin embargo puede ser remplazada por glucosa y en menor medida por fructosa. La maltosa y la sacarosa son menos efectivas. En general, el incremento de los niveles de sacarosa favorece el crecimiento y la formación de productos, pero valores superiores al 10 % (p/v) pueden producir represión por catabolitos. Estos actúan como fuente energética y de carbono e incrementan el potencial osmótico del medio. (Mroginski, 1991).

2.4.2. Fases para cultivo *in vitro*

2.4.2.1. Preparación del material vegetal

Según Cárdenas (2011) y Olmos *et al.* (2005), para establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para lo cual se mantienen las plantas madre, durante un período que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades. Los factores que influyen sobre la

calidad del explante son: 1) El tipo de órgano que sirve como explante, 2) la edad ontogénica y fisiológica del mismo, 3) la estación en la cual se colecta el material vegetal, 4) el tamaño y 5) el estado sanitario general de la planta donante. En especies leñosas se utiliza como pre tratamiento la inmersión de los explantes primarios en soluciones con citoquininas a fin de inducir el brote de las yemas. Dentro de esta etapa se establece cultivos viables y asépticos¹⁵; para lo cual, la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explante son de gran importancia dentro del cultivo *in vitro*. En esta etapa se controla: la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes.

Los materiales que tienen mayor capacidad regenerativa son los tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas (Marín, 1997).

2.4.2.2. Protocolo de desinfección

El proceso de desinfección, consiste en eliminar los microorganismos, sin causar daño al explante, los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia (Abdelnour, 1994).

Según Flores (2009), Barbón *et al.* (2006), Suárez (2006), para el protocolo de desinfección en especies leñosas, los brotes se separan de la estaca, se lavan con agua y jabón durante 5 minutos y se enjuagan con agua destilada. Se realiza una primera desinfección utilizando una mezcla de Carbendazim 5g.l^{-1} y Benomil 5g.l^{-1} , durante un período de una hora en agitador orbital. Luego se aplica tres lavados con agua destilada estéril (ADE) dentro de la cámara de flujo laminar. Se realiza una segunda desinfección con Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 3,5%, a una dosis del 50% (v/v) del producto comercial, durante 8 minutos, y nuevamente tres enjuagues con agua destilada estéril. Por último, se eliminan las brácteas de los brotes en cámara de flujo laminar.

¹⁵ Libre de contaminante

La desinfección del material vegetal consiste en la obtención de yemas, trozos de hojas, porciones de raíces o semillas, a los cuales se les somete a desinfección superficial, la misma que incluye varios pasos: a) lavado de los explantes con agua corriente, b) empleo de etanol al 70% por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0,5 a 1,5% de cloro activo) con unas gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad como Tween 20 o Tween 80 al 1%. Los explantes deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril. Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio. Pueden observarse infecciones por bacterias y hongos que sobreviven a los tratamientos de esterilización. Los patógenos endógenos latentes dentro del sistema vascular, podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos¹⁶ o antibióticos¹⁷ en el medio de cultivo (Abello, 2006 y Acosta, 2002).

2.4.2.3. Reactivos usados para la desinfección de explantes

Jabón líquido: Los jabones son sustancias que alteran la tensión superficial (disminuyen la atracción de las moléculas de agua entre sí en la superficie) de los líquidos, especialmente el agua. Los jabones se utilizan como agentes limpiadores debido a la estructura singular de estos iones orgánicos especiales. (Jover, 2004).

Tween 20: Los surfactantes tween son tensoactivos. Éstos son agentes químicos que disminuyen la tensión superficial del agua mejorando la humectación (Fernández *et al.*, 2004).

Carbendazim: Según Gepp (2010), el Carbendazim es un fungicida que interfiere en algunas funciones celulares, como la división de las células y los mecanismos de transporte intracelulares.

¹⁶ Sustancia que no permiten la reproducción de microorganismos.

¹⁷ Sustancia química producida por un ser vivo o derivada sintética de ella que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias.

Benomil: Según Biesterfeld (2009) y RAP- AL¹⁸ (2008), es un fungicida foliar sistémico tóxico para los microorganismos y los invertebrados.

Solución Iodada como bactericida: La solución Iodada es desinfectante bactericida y fungicida, es letal para las bacterias, hongos, virus, protozoos, quistes amebas y esporas (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 1994).

Alcohol al 70%: Los alcoholes (etanol o alcohol etílico, alcohol isopropílico) son compuestos orgánicos del agua, poseen actividad antimicrobiana (Sánchez, 2005).

Hipoclorito: Sales como el Hipoclorito de Sodio o de Calcio; son buenas desinfectantes, debido a que su acción está determinada por el Cloro libre que actúa cuando se encuentra en dilución durante 15 a 20min y que además tiene la ventaja de una acción instantánea a concentraciones bajas (Asamoah, 2005 y Alfaro, 2000).

2.4.2.4. Introducción del material vegetal *in vitro*

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro* (Flores, 2009).

2.4.2.5. Multiplicación de los brotes

Según Flores (2009) y Olmos *et al.* (2005), el objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción. Se debe evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal¹⁹.

En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas, ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantos (Jhaesen, 1999).

Se multiplica nuevos brotes en un nuevo medio, mediante resiembras en tubos de ensayo; manteniendo las condiciones de asepsia en una cámara de flujo laminar. El

¹⁸ Asociación de Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina

¹⁹Fenómeno natural que ocurre en los procedimientos de cultivo de tejidos, a través del cual pueden recuperarse mutantes con o sin ventajas adaptativas

número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo, y además, permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Jardín Botánico de Córdoba, 2007).

Según Castillo (1992), la multiplicación comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha.

La primera implica, el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento Acido Naftalenacético (ANA), Ácido Indolbutírico (AIB), Bencil Amino Purina (BAP), Acido Giberélico (AG3); en un medio básico de Murashige & Skoog para favorecer la desdiferenciación²⁰ (Universidad Politécnica de Valencia, 2003 y Olmos *et al.*, 2005).

La segunda etapa requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular. Los tipos de auxinas (a) y citocininas (b) y los rangos de concentración más empleados se mencionan a continuación: a) IBA (ácido 3-indolbutírico): 0,1-2 mM; 2,4-D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético): 4-35 mM; AIA (ácido 3- indolacético): 0,1-2 mM; ANA (ácido naftalenacético): 1-5 mM; picloram: 1-10 mM; BAP: 1-10 μM; y AG3: 1-3 μM b) BA (N6-benciladenina): 1-20 mM; CIN (cinetina): 0,1-1 mM; ZEA (zeatina): 1-10 mM; 2ip (isopentiladenina): 1-5 mM; y, TDZ (tidizuron): 0,01-1 mM (Olmos *et al.*, 2005).

2.4.2.6. Fase de enraizamiento

En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta formar plantas completas y desarrollan un sistema radical que les permite ser trasplantadas a un sustrato, pero no siempre esta fase es llevada a cabo en condiciones "*in vitro*", existiendo la posibilidad de hacerlo en recipientes con sustratos como: humus, piedra pómez, cascarilla, turba, sumergiendo los brotes antes del trasplante en una solución enraizadora. En las especies leñosas, es difícil por su limitada capacidad rizogénica (Jaramillo, 2008).

²⁰ Diferenciación celular

En la etapa de enraizamiento las plántulas deben crecer, desarrollar un pseudotallo o tallo con las primeras hojas y formar raíces, ya que constituye una etapa de preparación y endurecimiento de los brotes para ser transferidos al suelo e incrementar la supervivencia (Criollo, 2011).

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente medios para plantas leñosas como Woody Plant Medium (WPM) con auxinas a concentraciones de 0,5- 1mg.l⁻¹ que impulsen su crecimiento (Olmos, 2005).

Existen muchos factores químicos y físicos que favorecen el enraizamiento *in vitro*. El estrés hídrico, la alta temperatura, la baja intensidad de luz y el uso de carbón activado son factores físicos que estimulan el enraizamiento. Mientras que un ambiente químico favorable al desarrollo de raíces puede lograrse mediante la reducción en la concentración de sales minerales del medio de cultivo, o bien, mediante el incremento de ciertos elementos menores (Bromo, Calcio y Manganeso) o por la adición de algunos fenoles y vitamina D. Así mismo, se requiere un balance hormonal adecuado dirigido al aumento en auxinas exógenas (Recalde, 2007).

2.4.2.7. Aclimatación de los explantes enraizados

Según Flores (2009) y Gilsanz (2007), en esta etapa las plantas sufren cambios que permiten la adaptación de las mismas a vivir en condiciones ambientales. En el momento en que se extraen los explantes de los frascos, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz.

Sustratos usados para el desarrollo de las plántulas del género *Fuchsia*

Turba.- Es un material orgánico compacto, de color pardo oscuro y rico en carbono, formado por una masa esponjosa y ligera en la que se aprecian los componentes vegetales que la originaron (Cuadro 4).

Cuadro 4: Componentes de la turba.

COMPOSICIÓN	
Carbono	59%
Hidrógeno	6%
Oxígeno	33%
Nitrógeno	2%
Materias volátiles	60%

Fuente: Ibáñez, 2006.

Posee sustancias activas como el ácido beta-indol-acético, que puede tener un efecto positivo sobre el enraizamiento; la foliculina²¹, de efecto estimulador sobre el crecimiento de los vegetales (Alecoconsult Internacional, 2009).

Propiedades nutricionales

Las turbas rubias tienen un buen nivel de retención de agua y de aireación, pero son muy variables en cuanto a su composición ya que depende de su origen; se la aplica al género *Fuchsia* por retener agua, y aumentar la aireación para el crecimiento y formación de raíces. La turba rubia es una turba menos degradada por lo que consta de múltiples filamentos que contribuyen a dar un mayor volumen de aire al sustrato, algo esencial (Hidalgo, 2009).

Preparación de sustratos con turba

En la fase de aclimatación se pretende que las plantas que han crecido *in vitro* y por lo tanto sólo han estado expuestas a un microambiente escogido por ofrecer unas condiciones mínimas de estrés y casi óptimas condiciones para la multiplicación de las plantas, se adapten a condiciones *ex vitro* donde las condiciones no son asépticas, ni la luz, temperatura y humedad están controladas, y donde el crecimiento es autotrófico²² y no heterotrófico como *in vitro*. Es necesario reconstruir y desarrollar los sistemas que por adaptación a la condiciones *in vitro*, es el caso de la lignificación, cubiertas cuticulares, estomas y estructuras fotosintéticas (López, 2008).

²¹ Hormona producida por los folículos de los ovarios

²² Organismo capaz de sintetizar sus metabolitos esenciales a partir de sustancias inorgánicas.

La turba, se coloca en cajas de plástico con la solución madre, posteriormente se coloca un vaso plástico para adaptar a la plántula a las nuevas condiciones del invernadero. Previo a la colocación de las plántulas obtenidas *in vitro* al sustrato, se lavan las raíces, limpiándolas por completo y eliminando las partículas de medio de cultivo (Chávez, 2000).

Piedra Pómez

Según Bedoya (2010), la piedra pómez es una roca volcánica vítrea, con baja densidad (flota en el agua) y muy porosa, de color blanco o gris. Posee una retención de agua de un 38%, posee una buena estabilidad física y durabilidad, desde el punto de vista biológico es completamente libre de microorganismos.

Suelo

Según Alvarado (2007), el suelo es la capa más superficial de la corteza terrestre, que resulta de la descomposición de las rocas por los cambios bruscos de temperatura y por la acción del agua, del viento y de los seres vivos. Es un elemento de enlace entre los factores bióticos y abióticos y se le considera un hábitat para el desarrollo de las plantas.

El suelo se encuentra constituido por compuestos como:

- **Inorgánicos**, como la arena, la arcilla, el agua y el aire
- **Orgánicos**, como los restos de plantas y animales. Uno de los componentes orgánicos de los suelos es el humus.
- **Humus** se encuentra en las capas superiores de los suelos y constituye el producto final de la descomposición de los restos de plantas y animales

Además, según Alvarado (2007) y Rodríguez (2007), el suelo consta de propiedades físicas como:

1. *Textura*: Depende de la proporción de partículas minerales de diverso tamaño presentes en el suelo. Para el caso de *Fuchsia* se utiliza suelos con arcilla.

- *Arcilla*: diámetro inferior a 0,002mm. Al ser humedecida es plástica y pegajosa; cuando seca forma terrones duros.
2. *Estructura*: Las partículas del suelo se unen para formar agregados.
 3. *Densidad*: Peso por volumen del suelo, está en relación a la porosidad. Para la multiplicación de *Fuchsia* se utiliza un suelo abonado mayor contenido de materia orgánica, para hacer que el suelo sea más poroso y menos denso.
 4. *Permeabilidad*: Transmite agua y aire. Mientras más permeable es el suelo, mayor es la filtración, y permitiendo el desarrollo de las raíces de la *Fuchsia*
 5. *Aireación*: Abastecimiento de Oxígeno, Nitrógeno y Dióxido de Carbono en el suelo.
 6. *Temperatura*: Determina la distribución de la planta e influye en los procesos bióticos y químicos. Para el desarrollo de *Fuchsia* la temperatura oscila entre 18-21° C
 7. *Color*: Depende de sus componentes; cuanto más negro es un suelo, más productivo será, por los beneficios de la materia orgánica.

Entre las propiedades químicas se destacan:

- *Acidez*: En *Fuchsia*, se utiliza neutros.
- *pH*: En *Fuchsia* es de 6.5-7

Según Chávez (2000), el suelo proporciona al género *Fuchsia*, elementos nutricionales tales como macro y micronutrientes, esenciales para su crecimiento y desarrollo; estos compuestos son:

Macronutrientes

Estos los toma en grandes cantidades, sobre todo los 3 primeros.

- Nitrógeno (N)
- Potasio (K)
- Fósforo (P)
- Calcio (Ca)

- Magnesio (Mg)

- Azufre(S)

Musgo

Está compuesto por fibras de hasta 100mm de musgo deshidratado. Su porcentaje de materia orgánica es de entre el 95 y 98%. Rango de pH entre 3.5 y 4.5. El musgo tiene una excelente capacidad de retención de agua y ayuda a reducir la frecuencia de riego. Este musgo se expande hasta 20 veces su volumen cuando se moja. Ideal para germinar cierto tipo de semillas y para plantas de semillero. Puede ser agregado a cualquier sustrato o bien colocarlo en la superficie, así evitará la evaporación del sustrato (Valdés, 2012 y Martínez *et al.*, 2004).

Debido a la longitud de sus fibras ahueca la tierra de modo que ofrece una oxigenación óptima a la planta. Induce la aparición de brotes de raíces en cortes de plantas leñosas. Es esencial en la producción de acodos aéreos. El musgo es amarrado o envuelto en plástico alrededor de los tallos de una planta para mantener la humedad, estimulando el desarrollo de raíces adventicias. Este tipo de relleno es óptimo para injertar árboles frutales. Plantas de Begonia y *Fuchsia* brotan y florecen más si sus macetas tienen una capa de musgo para separar la tierra de arriba rica en humus, de la del fondo del macetero (Rodríguez, 2007).

2.4.3. Factores que afectan el cultivo de tejidos

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por el material vegetal y las condiciones físicas y químicas que se crean *in vitro* (Pierik, 1990). En el caso del material vegetal, influye la constitución genética de la planta, la edad de la planta, la edad del órgano o tejido, el estado fisiológico, el estado sanitario, así como la posición del explante dentro de la planta, el tamaño de la planta, el ambiente y las condiciones en el que se ha desarrollado la planta madre, el tipo de corte que se realice en el explante y la forma en la que se coloque el explante en el medio (Gómez, 2002).

Los **factores físicos** en los que desarrolla la planta son principalmente la luz (intensidad y fotoperiodo), la temperatura, el pH, la humedad relativa y la concentración de O₂ y CO₂. Las condiciones de luz y temperatura que se eligen para

el cultivo *in vitro* generalmente son las que constituyen un óptimo para el crecimiento y el desarrollo del material experimental *in vivo*. La humedad relativa en el interior de los recipientes de cultivo es alta como se desprende de la condensación que se produce en las paredes. La influencia de la humedad relativa de la cámara influye sobre todo en la pérdida de agua en los tubos y se ha demostrado que un valor elevado de humedad relativa aumenta las posibilidades de infecciones. La disponibilidad de agua se puede controlar mediante la modificación de la concentración del agar y puede influir en la hiperhidricidad²³ de los explantes (Sánchez- Cuevas, 2004).

Las **condiciones químicas** están establecidas por los componentes nutritivos del medio de cultivo, agua, azúcar, macro y microelementos, reguladores de crecimiento, vitaminas y agar. Uno de los temas más importantes en la investigación en cultivo *in vitro* consiste en la optimización del medio de nutrición para una determinada planta y determinar cuándo y cómo se debe aplicar el medio a los explantes y plántulas *in vitro* (Alonso, 2002).

2.4.3.1. Contaminación

Según Mroginski (2010), Salas (2010), Sánchez- Cuevas (2004) y Cassell (1991), la contaminación puede causar pérdidas económicas muy importantes en la micropropagación.

La mayor parte de los contaminantes, en el cultivo de tejidos, proceden de la planta donadora. Al establecer los cultivos y dependiendo del explante utilizado, se pueden transmitir microorganismos de la superficie del explante o de su interior. Con el cultivo de meristemos y dependiendo del tamaño del mismo, se pueden eliminar la mayoría de los organismos pero, en el caso de hojas, pecíolos y tallos casi todos los microorganismos en el tejido pueden transmitirse. Por lo tanto, es conveniente analizar las plantas de las que proceden los explantes en búsqueda de individuos limpios y rechazando aquellos que están contaminados fuertemente.

²³ Trastorno fisiológico que se produce en cultivos de tejidos de plantas caracterizado por alta retención de agua a causa de condiciones adversas de los cultivos

Los principales microorganismos asociados a las superficies de las plantas son hongos, levaduras y bacterias. Muchos de estos microorganismos se pueden eliminar mediante esterilización superficial (Gamboa, 2006).

Según Pérez (2009) y Gonzáles (2003), los microorganismos endófitos que se pueden desarrollar en las plantas son virus, viroides, bacterias, micoplasmas y hongos y pueden afectar de forma inter o intracelular. Los microorganismos intercelulares son generalmente transmitidos mediante vectores o mediante el contacto entre plantas sanas e infectadas. Los microorganismos endógenos tanto intercelulares como intracelulares no se pueden eliminar mediante esterilizaciones y pueden desarrollarse en el medio de cultivo de las plantas aunque el crecimiento de algunos puede ser inhibido mediante altas concentraciones de sal o azúcar y el pH. Algunos de estos microorganismos se expresan con rapidez y son fáciles de detectar mediante inspecciones rutinarias pero otros permanecen latentes hasta que las condiciones sean favorables como la transferencia de los explantes a un medio nuevo especialmente cuando se reduce la concentración de sales y de azúcar en el medio. Se puede detectar la presencia de organismos cultivables mediante uso de medios específicos para hongos y bacterias.

Según García *et al.* (2011), Gaviria (2010) y Hernández (2010), las bacterias son los contaminantes *in vitro* más comunes y ocasionan serios problemas, porque pueden ser sistémicas, así como difíciles de detectar y eliminar, su distribución puede ser localizada o sistémica por xilema o floema. Estos contaminantes no se manifiestan en los primeros subcultivos, ya que la alta presión osmótica, el pH y ciertas hormonas de los medios de cultivo pueden inhibir su crecimiento. Debido a este efecto inhibitorio, muchos microorganismos requieren un período de adaptación a las nuevas condiciones antes de manifestar su presencia; esto ocurre por lo general en la fase de multiplicación.

Según Criollo (2010), Castro *et al.* (2006) y Acosta (2002), las plantas contaminadas pueden tratarse mediante termoterapia y/o cultivo de meristemas o también aplicando productos antifúngicos, antibióticos y antivíricos a las plantas madre durante su crecimiento, aunque en ocasiones estos compuestos químicos pueden tener efectos

bioestáticos²⁴ más que biocidas²⁵. La contaminación por la técnica o procedimiento de cultivo procede del instrumental utilizado como levaduras que pueden sobrevivir la esterilización mediante alcohol, esporas de bacterias resistentes al calor como *Bacillus* que pueden sobrevivir altas temperaturas. Los microorganismos pueden proceder también de un fallo en la campana de flujo laminar y de una esterilización insuficiente del medio de cultivo o del equipo.

- **Contaminación exógena**

La contaminación que el explante lleva en su superficie se puede eliminar mediante un eficiente protocolo de desinfección, generalmente se hace uso de soluciones de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) en concentraciones de 1 a 3%, es una de las preparaciones más útiles como germicida, se lo ha utilizado durante muchos años como esterilizante superficial en los tejidos, siempre y cuando no se produzcan lesiones debido a su acción blanqueadora. Como esterilizante superficial también se utiliza la solución de Bicloruro de Mercurio (HgCl₂), sin embargo es altamente tóxico y se debe utilizar con cautela en una solución acuosa entre 0.1 a 1.5% (p/v) por 3 a 10 minutos. También se puede hacer uso de desinfectantes como el Iodo, fungicidas, y otros bactericidas de naturaleza química (Roca y Mroginski, 1991).

- **Contaminación endógena**

Esta se produce cuando los contaminantes se encuentran dentro del tejido y por ende son difíciles de eliminar. En este caso puede ser útil la inclusión de fungistáticos o bacteriostáticos en el medio de cultivo; el sulfato de gentamicina, la penicilina y el sulfato de estreptomicina (10 a 50 mg.l⁻¹), son algunos de los productos de amplio espectro que se pueden utilizar (Roca y Mroginski, 1991). El cultivo de tejidos incrementa el promedio de multiplicación normal de las plantas y puede considerarse como una fuente de material limpio, ya que está libre de bacterias y otras enfermedades como la antracnosis, decadencia, mancha de la hoja y nudo de raíz (Salgado, 2007).

²⁴ Detiene el crecimiento o la multiplicación de los organismos vivos.

²⁵ Son aquellos destinados a destruir, neutralizar, impedir la acción o ejercer control de otro tipo sobre cualquier microorganismo dañino por medios químicos o biológicos.

2.4.3.2. Acción del medio sobre el explante

El agua debe ser destilada y si es posible estéril; para el cultivo de protoplastos, células o meristemas se debe utilizar agua bidestilada. El azúcar se utiliza en el cultivo *in vitro* como fuente de carbono para facilitar la fotosíntesis *in vitro*, generalmente se utiliza sacarosa. La nutrición mineral está compuesta de macro y micronutrientes. Se han formulado muchas soluciones nutritivas. La más utilizada es la formulación MS (Murashige y Skoog, 1962), que es una revisión del medio MS donde se modifica la composición de las vitaminas, WPM (Lloyd y McCown, 1980) para el cultivo de plantas leñosas (Trigiano y Gray, 1996).

La elección de una de las distintas soluciones nutritivas depende de la planta con la que se trabaja y de la etapa de micropropagación. El pH suele estar entre 5,0 y 6,5 ya que pH más bajos o más altos frenan el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Los reguladores de crecimiento pueden dividirse en hormonas (compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores) y otros productos sintéticos que actúan de forma semejante. Los reguladores de crecimiento son responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza y que determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta, influyen en los genes que controlan la diferenciación de tejidos a partir de callo controlando actividades tan variadas como el crecimiento, el control del ciclo celular y la reproducción. Los principales reguladores son las auxinas, las citocininas, las giberelinas y otros reguladores como las oligosacarinas²⁶, el ácido abscísico y el etileno. Las auxinas generalmente producen elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), formación de raíces adventicias, inhiben la formación de los vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente promocionan la embriogénesis en los cultivos en suspensión. Las citocininas se utilizan para estimular el crecimiento y el desarrollo, disminuyen la dominancia apical por lo que promueven la formación de brotes axilares, retardan el envejecimiento y, en concentraciones elevadas, pueden inducir la formación de brotes adventicios e inhibir la formación de raíces. La giberelina más utilizada es el Ácido Giberélico (AG3); induce la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas *in vitro*, puede romper la dormición de

²⁶Son hidratos de carbono complejos que provienen de la degradación de compuestos de la pared celular, como pectinas o xiloglucanos.

embriones aislados y de brotes e inhibe la formación de raíces y vástagos adventicios. (Pierik, 1988).

2.4.3.3. Vitrificación

Según Rojas (2007), Sánchez-Cuevas (2004), George (1996) y Reuther (1988), la hiperhidricidad se denomina también vitrificación, translucidez, transformación hiperhídrica, glaucosidad y vitrosidad. Produce la aparición de características atípicas en las plantas cultivadas *in vitro* a nivel anatómico, morfológico y fisiológico. Las características de plantas vitrificadas son una enorme cantidad de agua en los tejidos de las hojas y tallos, una reducción en la producción de las ceras epicuticulares²⁷ combinado con una gran pérdida de agua, una distorsión del movimiento de los estomas y una anatomía anormal de hojas, tallos y raíces. La baja tasa de supervivencia de las plantas vitrificadas se debe a una inestabilidad de los tallos, hojas cloróticas y retorcidas y una incontrolada pérdida de agua.

Según García (1999), los brotes afectados presentan entrenudos cortos y los brotes apicales aparecen con fasciaciones²⁸. Normalmente los brotes aparecen hinchados, de color verde claro y las hojas son traslúcidas o acuosas o bien de un color verde más oscuro y más gruesas. Se puede producir también una reducción de la dominancia apical produciéndose grupos de brotes atrofiados. Las plantas afectadas no suelen sobrevivir *ex vitro*. La saturación de vapor de agua y la acumulación de etileno y CO₂ en recipientes de cultivo sellados se considera que tienen un efecto en el grado de vitrificación. Sin embargo, la composición y la consistencia del medio también influyen en las propiedades estructurales: un alto contenido en citocininas y un bajo contenido en agar en el medio sólido o el crecimiento en medio líquido contribuyen al deterioro.

Una de las posibles causas de la hiperhidricidad es el fallo de la biosíntesis de lignina. Para mejorar la tasa de supervivencia de las plantas después de su traspaso a condiciones de invernadero, se han hecho varios intentos con el fin de cambiar la composición del medio y los tipos y sellado de contenedores.

²⁷Depósitos de cera sobre la cutícula de las hojas.

²⁸Crecimiento de una planta en la cual el meristema apical, que normalmente se concentra alrededor de un sólo punto y produce tejido más o menos cilíndrico.

2.4.3.4. Edad del explante

Según Borrero (2007), gran parte del éxito de cultivo de tejidos, está en la edad del explante que va a ser utilizado para los trabajos. La edad de la planta y el grado de diferenciación del tejido, muchas veces están interrelacionados, y pueden producir efectos interactivos cuando se cultiva *in vitro*.

Según Echenique *et al.* (2010), la edad del explante puede clasificarse en cuatro clases:

- **Edad del órgano o de la planta desde que ha sido extraída.**- Es la edad biológica de la planta, es el tiempo que ha transcurrido desde que la planta comenzó como retoño o como embrión.
- **Edad fisiológica, ontogenética o fase de crecimiento.**- Joven y adulto.
- **El grado de diferenciación.**- Las partes más jóvenes de la planta son células meristemáticas no diferenciadas. Teóricamente se dice que algunas plantas poseen las células meristemáticas siempre en estado juvenil y que podrían vivir para siempre.
- **Período de cultivo.**- Es el tiempo desde que recién se instala el cultivo.

2.4.3.5. Ciclo de crecimiento

Según Villalobos (2006) y Mroginski (1991), el crecimiento de los callos y de las células en suspensión, presenta una serie de fases de crecimiento que se caracterizan por tener naturaleza sigmoidal, cada fase se diferencia a la otra, por que presenta cambios en el peso seco, o en el número de células, en función al tiempo. Estas fases son:

- **Fase de latencia.**- Esta fase se inicia cuando la célula es transferida al medio en que se va a cultivar. Esta célula inicia los procesos metabólicos de división celular, es decir, mitosis. Hay una gran producción de NAD (P) H y ATP²⁹, es decir, el sistema energético de la célula se activa, las rutas glicolíticas y pentosas fosfatos producen poder reductor.

²⁹ Adenosin Trifosfato

- **Fase de división celular.-** Una vez que la célula ha sido inducida a la división celular, esta ocurrirá hasta que uno o más nutrientes comiencen a ser limitante. El aumento en el número de células precede generalmente al incremento del peso fresco debido al retraso del aumento del tamaño de la célula.
- **Fase estacionaria.-** Esta fase se caracteriza por una disminución en la división celular, actividad respiratoria, síntesis de RNA y proteínas y por un aumento de la proporción de células vacuoladas. Así también disminuye la actividad de enzimas claves del ciclo de las pentosas fosfatos.

En algunas especies cultivadas, en especial las Solanaceae, la diferenciación bioquímica puede estar acompañada por una diferenciación estructural limitada, especialmente si no hay un aporte de peso fresco, que favorezca a la diferenciación celular.

2.4.3.6. Pérdida de la habilidad de regeneración

Ciertos tejidos de callos mantienen la capacidad de regenerar retoños en respuesta a algún estímulo favorable, incluso por períodos largos. Stimart (1980) obtuvo regeneración de callos, luego de haber mantenido en cultivo en tres años.

Según Vidales (2002), en la actualidad aún no se conoce con exactitud la razón por la cual una célula puede terminar su capacidad de regeneración, pero existen las siguientes posibles causas:

- **Variación genética en la población celular.-** Las células con las cuales se piensa trabajar, deben tener toda la habilidad de proliferar en un medio favorable de cultivo, muchas veces dichas células no presentan la habilidad de sufrir morfogénesis.
- **Existencia de sustancias promotoras de morfogénesis.-** Sustancias presentes en el aislamiento de explantes y que poco a poco van disminuyendo a medida que la planta crezca *in vitro*.
- **Cambios epigenéticos en el cultivo de células.-** El genotipo de la célula es conservado fielmente, pero hay mecanismos reguladores de la información genética

que causan que la morfogénesis sea inactiva y se pierda por completo durante el subcultivo.

2.4.3.7. Control de la temperatura

Según Radice (2010), Castillo (2010), Olmos *et al.* (2005) y Vidales (2002), la temperatura de la cámara de crecimiento, se ve afectada por la temperatura del ambiente y la luz que generan las lámparas de luz. El control de la temperatura a la que se desarrolla el cultivo *in vitro* se efectúa mediante un sistema de refrigeración-calefacción, el cual debe estar direccionado de tal modo que la temperatura de la zona de cultivo se mantenga dentro de los límites deseados.

2.4.3.8. Luz

Según Radice (2010), Castillo (2010), Olmos *et al.* (2005) y Vidales (2002), la luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos. Existen factores relacionados con la luz que son de importancia en cultivo *in vitro* como:

- **Radiación.**- La cantidad de luz que incide sobre las superficies fotosintéticas de las plantas determinará en gran medida la capacidad fotosintética de éstas.

✓ Expresándola en lux;

✓ Las necesidades de luz de los cultivos *in vitro* son inferiores a las de la planta *in vivo*, dado que el medio de cultivo contiene cantidades importantes de sacarosa, los cultivos *in vitro* se comportan sólo parcialmente de forma autotrófica.

✓ La irradiación habitual en el campo (a plena insolación puede llegar a 450Wm^{-2}) es nociva en condiciones *in vitro*.

- **Fotoperíodo.**- El fotoperíodo (horas de luz diarias que recibe un cultivo) es otro de los factores que se deben controlar, generalmente esto se puede conseguir mediante el uso de un programador conectado al circuito de iluminación. Para especies leñosas, el cultivo debe encontrarse a 16 horas/luz.

2.4.3.9. Fenolización

La Fenolización es el pardeamiento que se presenta con mayor frecuencia en explantes de especies leñosas, se relaciona con la liberación al medio y oxidación de polifenoles, es producido por acción de enzimas oxidasas que contienen Cobre, como las polifenoloxidasas y las tirosinasas que se liberan al herirse los tejidos, dando como resultado compuestos quinónicos altamente activos y tóxicos para el explante (Radice, 2010).

2.4.3.10. Ambiente

Según Radice (2010), Vidales (2002) y Levitus (1991), la mayoría de los microorganismos contaminantes son organismos patogénicos a plantas *in vitro* pero no patogénicos a plantas crecidas en campo. Algunos son conocidos como saprófitos en la superficie de las plantas, pero una gran cantidad forma parte de la microflora normal de las partes aéreas de la superficie de las plantas, los cuales son normalmente los tejidos que más se toman como explantes. Estos organismos generalmente se convierten en patógenos en el cultivo de tejidos porque las condiciones ambientales y la fisiología de las plantas son diferentes *in vitro*. Los medios de cultivo de tejidos contienen todos los nutrientes minerales esenciales para las plantas en concentraciones que son de 3 a 20 veces superiores a las encontradas en los medios usados para cultivo en hidropónicos *in vivo*.

Estos medios también contienen altas concentraciones de azúcar y otros nutrientes orgánicos; el azúcar es adicionado para permitir un rápido crecimiento heterotrófico de las plantas ya que la generación de energía y carbohidratos por fotosíntesis, es muy baja en la mayoría de las cámaras de crecimiento. En la superficie de las plantas *in vivo* y en los hidropónicos, el crecimiento de todos los microorganismos heterotróficos es pobre, debido a la disponibilidad limitada de mono y oligosacáridos y ácidos orgánicos.

A causa de la respiración de las plantas y la evaporación del medio, la humedad relativa dentro de los frascos de cultivo es aproximadamente 95 %. Esto resulta favorable para el desarrollo de muchos hongos, levaduras y bacterias, y es muy diferente a la situación en el campo y en las casas solares, donde la humedad relativa es muy variable y sólo permite un cierto rango de microorganismos en la superficie

de las plantas. Producto de la alta humedad en la mayoría de los frascos de cultivo, los estomas permanecen abiertos y hay una constante presencia de agua en la superficie de las plantas (Levitus, 1991).

Según Mroginski (1991), la alta **humedad relativa** puede ser la causa de la falta de ciertos caracteres fisiológicos que proporcionan el crecimiento de los tejidos más viejos en el campo con resistencia pasiva u horizontal al ataque por microorganismos. En estudios realizados, la mayoría de las especies de plantas, han mostrado muy poca lignificación y muy poco o ningún desarrollo de la cera subcuticular comparada con el crecimiento de las plantas en invernaderos o en las cámaras de crecimiento.

Según Radice (2010) y Olmos *et al.* (2005), la alta humedad y la ausencia de lignificación y capa de cera muestran que el crecimiento de plantas en campo o casa de cristal es más susceptible al ataque microbiano. Y esto se extrapola en el sentido de sugerir que las plantas de cultivo de tejidos son más susceptibles a patógenos. Sin embargo, esto no es totalmente cierto, pues existen evidencias crecientes de que al menos algunas especies de plantas tienen un mecanismo *in vitro* de resistencia adicional o más activa.

2.4.3.11. Dióxido de Carbono (CO₂)

La concentración de dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera gaseosa *in vitro* varía según la respiración y la actividad fotosintética de las plantas. En condiciones de oscuridad, el CO₂ se incrementa mientras que, en condiciones de luz disminuye. En trabajos realizados con *Ficus lyrata* se han encontrado concentraciones variables que van del 0,5 al 8,5 %, según el tipo de sello o tapa empleados. Estas concentraciones superiores a 1 %, generalmente tóxicas para las condiciones *in vivo*, probablemente no son limitantes para la actividad fotosintética (Radice, 2010).

2.4.3.12. pH

El pH es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de explantes *in vitro*, de forma general se recomienda ajustar el pH entre 5.5 y 5.8 ya que un pH más bajo suele producir inestabilidad de AIA, giberelinas, vitamina B1 y ácido pantoténico. Además favorece la precipitación de sales de fosfato y sales férricas, por lo que un pH

de 5.7 a 5.8 es adecuado para mantener todas las sales en forma soluble (Murashige y Skoog, 1962).

2.4.3.13. Oxígeno (O₂)

La composición y concentración de ciertos compuestos gaseosos (oxígeno, dióxido de carbono y etileno, entre otros) en el medio de cultivo, es determinante en el crecimiento celular y la síntesis de metabolitos secundarios; estas concentraciones dependen de varios factores, como la temperatura, la presión, el flujo de aireación y la composición de los gases de alimentación. El papel de la aireación en un cultivo celular puede entonces entenderse desde tres perspectivas: en primer lugar se encarga de suplementar el oxígeno necesario, en segundo lugar incrementa la homogenización del medio de cultivo y finalmente es responsable de la desorción de metabolitos volátiles como el CO₂ y el etileno. El oxígeno favorece el crecimiento celular hasta cierto valor de concentración, después del cual tiene efectos inhibitorios debido al estrés oxidativo; sin embargo, en algunos casos este efecto ha favorecido la acumulación de metabolitos secundarios (George, 1996).

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y METÓDOS

3.1. Localización Geográfica de *Fuchsia pilaloensis* y *Fuchsia hybrida*

Las muestras de *Fuchsia hybrida* y *Fuchsia pilaloensis* fueron recolectadas en una hacienda privada ubicada en la Provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia Cutuglagua; Km 2 de la vía Panamericana al Sur de la ciudad; con una temperatura media de 12°C, humedad relativa de 79%, con precipitaciones anuales de 1500mm y a una altura de 2800msnm, cuyas coordenadas fueron 78° 33'W y 00°22'S. De acuerdo a las zonas donde se recolectaron las muestras de *F. pilaloensis* fueron etiquetadas como planta 1, planta 2 y planta 3.

Los ensayos *in vitro* y de aclimatación se desarrollaron en el laboratorio de Biotecnología Vegetal, del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana- Sede Quito, Campus Girón, en el cuarto de crecimiento e incubación cuyas condiciones fueron: temperatura promedio de 25°C y humedad relativa promedio de 60%.

3.2. Materiales, Reactivos y Equipos

3.2.1. Campo

El material de campo que se utilizó fue: GPS, fundas plásticas, papel periódico, tijeras para podar y maletín de transporte.

3.2.2. Cultivo *in vitro*

Para el cultivo *in vitro*, los materiales que se utilizaron fueron: equipo de disección (bisturí mango N° 4, pinzas), lámparas de alcohol, probetas, tubos de ensayo, servilletas estériles, papel bond estéril, tapas para tubos de ensayo, rollo pack, fósforos, rociador de alcohol, magneto, cajas petri estériles, guantes estériles. Los reactivos fueron: jabón líquido, fungicidas (Carbendazim y Benomilo), bactericidas (Ampicilina y solución Iodada), Tween 20, Agua destilada, Alcohol al 70%, Hipoclorito de Sodio (NACIO) al 3%, Carbón activado, Phitagel, Vitaminas, Sacarosa, Ácido Naftalenácetico (ANA), Hidróxido de Sodio (NaOH) 1N, Ácido

Clorhídrico (HCl) 1N. Los equipos usados fueron: plancha de calentamiento, plancha de agitación, autoclave, microondas, balanza analítica, potenciómetro, cámara de flujo laminar, cámara de crecimiento.

3.2.3. Aclimatación

Entre los materiales y reactivos que se utilizaron en la fase de aclimatación fueron: vasos plásticos de polietileno de 8 onzas (oz) previamente desinfectados con cloro 3% y alcohol 96%, cascarilla, piedra pómez, musgo, suelo.

3.3. Desinfección de brotes de *F. hybrida* y *F. pilaloensis*

3.3.1. Toma de la muestra en campo para ambas especies

La toma de las muestras de las tres plantas de *F. pilaloensis* y una muestra de planta de *F. hybrida* se realizó de la siguiente manera:

1. Se tomaron seis varetas compuestas de yemas apicales y axilares de las plantas madres, con tijeras de podar, de aproximadamente 35-40cm de largo, cada rama contó con un promedio de 10 yemas. Para realizar los cortes de las yemas se utilizó bisturí.
2. Las varetas fueron colocadas en papel periódico y rociadas con alcohol al 70%, se colocaron en fundas de polietileno sin anudar, para que no aumente la temperatura y evitar que las muestras se deshidraten. Antes de cerrar la bolsa plástica se sacó el aire, de tal modo que la solución no se evapore.
3. Las muestras fueron etiquetadas con: número de colección, colector, lugar de colección y se realizó la descripción botánica, en el cuaderno de campo.
4. Finalmente, las muestras fueron refrigeradas para evitar la deshidratación de los tejidos, durante 24 horas.

3.3.2. Microorganismos endófitos

Debido a la elevada contaminación encontrada mediante ensayos previos, se realizó análisis de microorganismos endófitos.

3.3.2.1. Aislamiento del hongo endófito

Los hongos endófitos (Abello, 2006) se aislaron en Agar Papa Dextrosa (PDA) a partir de trozos de hojas y esquejes sanos de la planta *F. pilaloensis*, previamente desinfectados por inmersión en NaOCl al 3% v/v, los cuales fueron sometidos a diferentes tiempos de exposición por 30 y 60 segundos, y enjuagados una vez con agua estéril, según lo recomendado por Agrios (1995). En la caja petri fueron sembrados tres explantes, dos de hoja y una de yema. Todo el material se incubó en una caja de espuma flex durante 72 horas en oscuridad, se realizó un repique en nueva caja petri con PDA (Papa Detroxa Agar) para inducir el crecimiento del hongo (figura 1).

Figura 1: Aislamiento del hongo endófito de *F. pilaloensis*



Foto tomada por: Nieto y Valdivieso, 2012

3.3.2.2. Aislamiento de las bacterias endófitas

Para el aislamiento de las bacterias presentes en el tejido vegetal (figura 2), se realizó una desinfección del material, con Hipoclorito de Sodio al 3% v/v durante 30 segundos, se sembró mediante la técnica de agotamiento por estrías en el medio de cultivo Trypticase Soja Agar (TSA), para purificar el cultivo, incubándose a 37°C por 24 horas. Las bacterias aisladas fueron teñidas con la técnica de tinción de Gram para determinar si son bacterias Gram positivas o negativas, descrita por Caldas (2010) y observadas al microscopio.

Figura 2: Aislamiento de bacterias endófitas de *F. pilaloensis*, a partir de segmentos.

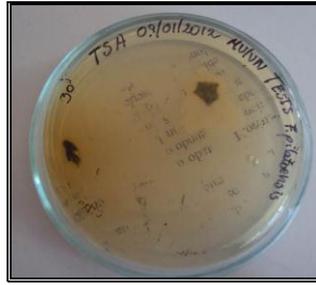


Foto tomada por: Nieto y Valdivieso, 2012

Procedimiento para tinción de Gram

Para realizar la tinción de Gram, se tomó la muestra realizando un extendido en espiral sobre el portaobjetos, dejando secar a temperatura ambiente, luego fueron fijadas con metanol durante 1 minuto flameándolas 3 veces aproximadamente. Se agregó azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) durante un 1min, lugol por 1min, alcohol-cetona por 4 segundos y safranina por 2min, cabe mencionar, que después de cada reactivo aplicado se lavó por 3 veces. Las bacterias Gram (-) se tiñeron de color rosado a rojizo y las Gram (+) de color violeta.

3.3.3. Protocolo de Desinfección

Posterior al análisis de microorganismos endófitos se evaluaron tres protocolos de desinfección (cuadro 5), para evitar la contaminación del explante, en el desarrollo del cultivo *in vitro* de *F. hybrida* y *F. pilaloensis*.

Cuadro 5: Protocolos de desinfección aplicados para ambas especies.

Protocolos de Desinfección	Descripción
1	Los explantes fueron lavados en agua corriente por 2 min, colocados en jabón líquido en agitación durante 30 min, lavados con ADE ³⁰ (3 veces), adición de fungicidas (Carbendazim y Benomil 2g.l ⁻¹) por 45 min en agitación, después lavado en ADE, se aplicaron bactericidas (Ampicilina y solución de Iodo 1ml.l ⁻¹) por 45 min en agitación constante, luego se lavaron con ADE. En cámara de flujo laminar los explantes desinfectados, se colocaron en alcohol al 96% por 1 min, posteriormente lavados con ADE, fueron colocados en Hipoclorito de Sodio al 2% durante 20 minutos, finalmente enjuagados con ADE.
2	Los explantes fueron lavados en agua corriente por 5 min, colocados en jabón líquido en agitación durante 30 min, lavados con ADE (3 veces), adición de fungicidas (Carbendazim y Benomil 2g.l ⁻¹) por 20 min en agitación, después lavado en ADE, se aplicaron bactericidas (Ampicilina y solución de Iodo 1ml.l ⁻¹) por 20 min en agitación constante, luego se lavaron con ADE. En cámara de flujo laminar los explantes desinfectados, se colocaron en alcohol al 70% por 1 min, posteriormente lavados con ADE, fueron colocados en Hipoclorito de Sodio al 3% durante 20 minutos, finalmente lavados con ADE. Antes de la siembra en el medio de cultivo, se eliminó el tejido necrosado y luego fue sumergido durante 10 segundos en una solución de ampicilina.
3	Los explantes fueron lavados en agua corriente por 10 min, colocados en jabón líquido en agitación con Tween 20 (2 gotas/100ml), durante 25 min, lavados con ADE (3 veces), se

³⁰ Agua destilada estéril

	<p>aplicaron fungicidas ((Carbendazim y Benomil 2g.l⁻¹) y bactericidas (Ampicilina y solución de Iodo 1ml.l⁻¹) por 30 min con 2 gotas de Tween 20, luego se lavaron con ADE. En cámara de flujo laminar los explantes desinfectados, se colocaron en alcohol al 70% por 1 min, posteriormente lavados con ADE, fueron colocados en Hipoclorito de Sodio al 3% durante 20 min con Tween 20, finalmente lavados con ADE (figura 3).</p>
--	---

Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

Figura 3: Desinfección de brotes de *F. pilaloensis*: a) Lavado con agua, jabón líquido (fuera de cámara), b) Agua, jabón líquido y Tween 20 al 1%, c) Lavado de los explantes con alcohol (dentro de cámara).

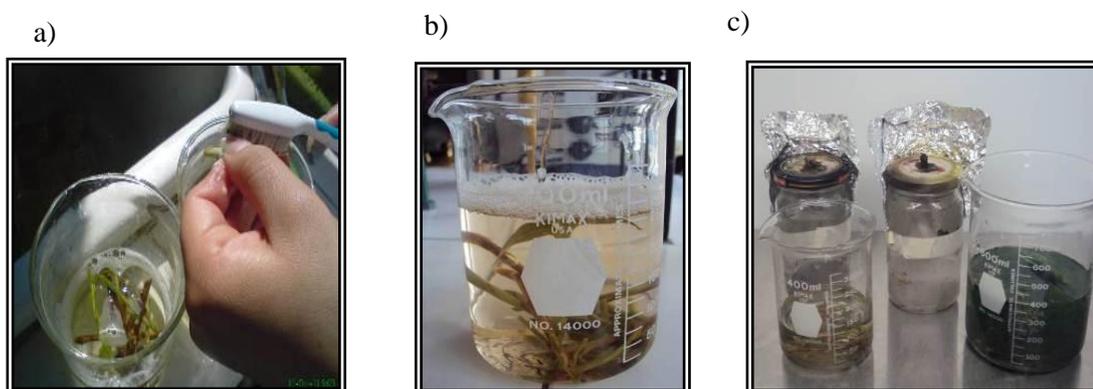


Foto tomada por: Nieto y Valdivieso, 2012

Unidad Experimental.- Cada unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo con 7cm³ de medio de cultivo, donde se colocó un brote, obteniendo un total de 389 tubos sembrados, que correspondieron al primer tratamiento de desinfección; en el segundo tratamiento de desinfección aplicado, se sembraron 214 tubos, mientras que en el último tratamiento aplicado se sembraron 331 tubos. Las repeticiones realizadas por cada tratamiento son diferentes, debido a la cantidad de material vegetal disponible, en cada etapa de corte. Se estableció un diseño completamente al azar de 85 datos por tratamiento para homogenizar los resultados.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de contaminación fúngica, porcentaje de contaminación bacteriana, porcentaje de oxidación fenólica y porcentaje de mortalidad.

Porcentajes de contaminación fúngica (%): Esta variable fue medida mediante la relación de las plantas contaminadas con hongos y el número total de plantas sembradas multiplicado por 100, durante 2 semanas de su introducción al medio de cultivo, cada 7 días.

Porcentajes de contaminación bacteriana (%): Esta variable fue medida mediante la relación de las plantas contaminadas con bacterias y el número total de plantas sembradas multiplicado por 100, durante 2 semanas de su introducción al medio de cultivo, cada 7 días.

Porcentaje de oxidación fenólica (%): Esta variable fue medida mediante la relación de las plantas fenolizadas y el número total de plantas sembradas multiplicado por 100, durante 2 semanas de su introducción al medio de cultivo, cada 7 días.

Porcentaje de mortalidad (%): Esta variable fue evaluada mediante, la relación de la mortalidad del explante y el total de explantes segmentados obtenidos de las ramas recolectadas, multiplicado por 100, durante el tiempo de desinfección.

Para la evaluación de las variables del porcentaje de contaminación fúngica, bacteriana y porcentaje de fenolización, se realizó una escala numérica de 0 a 1; en donde 0 corresponde a la ausencia y 1 a presencia.

3.4. Establecimiento de cultivo *in vitro* de *F. hybrida* y *F. pilaloensis*

3.4.1. Medios de Cultivo

En este ensayo se evaluó el medio de cultivo para la introducción *in vitro* de *Fuchsia pilaloensis* y *F. hybrida*, en donde se probaron cinco tratamientos: Knudson (T1), Knudson "C" (T2), Phytamax (T3), WPM (T4) y WPM+ Auxinas (ANA 0,5mg.l⁻¹) (T5). Los medios fueron adicionados con carbón activado (2g/l), y su pH fue determinado mediante previo análisis de suelo (anexo 5), realizados con muestras de suelo del lugar de recolección de *F. pilaloensis*, de esta forma se estableció como pH óptimo 6.7. Los explantes fueron sembrados en condiciones estériles, y puestos en una cámara de crecimiento a 16 horas/luz, y una temperatura de 24 °C, el tiempo de

incubación varió entre 1 y 7 meses, debido a la diferencia de respuesta de cada especie investigada.

3.4.2. Introducción del material vegetal *in vitro*

La desinfección del material vegetal con alcohol al 70% e hipoclorito al 3% fue realizada en cámara de flujo laminar (figura 4), posteriormente se realizaron cortes para obtener segmentos nodales que contengan de 2 a 3 yemas cada uno, cada explante fue colocado sobre una servilleta y papel estéril para cortar los extremos necrosados y la capa superficial del tejido. Las yemas fueron sembradas en el medio de cultivo estéril, para evitar la contaminación se flameó la tapa del frasco, se selló y etiquetó, para finalmente, ser incubados en la cámara de crecimiento a una temperatura promedio de 25°C, con un fotoperíodo de 16 horas/luz, evaluándose hasta 7 meses.

Figura 4: Siembra de *Fuchsia* en cámara de flujo laminar.



Fotos tomadas por: Nieto y Valdivieso, 2012.

Diseño y unidad experimental.- Cada unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo con 7ml de medio de cultivo, donde se colocó un brote de *F. hybrida* o *F. pilaloensis* por cada tubo de ensayo, para determinar el crecimiento, se realizó un diseño experimental de bloques completamente al azar. Además, para el análisis de datos se utilizó la prueba de signos al 5% con un total de 85 repeticiones por tratamiento para homogenizar los datos.

Se evaluaron variables como: formación de callos, longitud del tallo, porcentaje de enraizamiento y porcentaje de mortalidad,

Formación de callos: Esta variable fue evaluada de manera visual, se observó una acumulación de células alrededor del explante, que fueron analizadas a través del

microscopio (extrayendo el callo formado y realizando un frotis en un porta objetos), mediante la escala de presencia y ausencia, semanalmente hasta 7 meses desde la siembra (Cadavid *et al.*, 2006).

Longitud del tallo (cm): En esta variable se midió la longitud del explante en centímetros con el calibrador, una vez al final de la fase, para *F. pilaloensis* a los 7 meses, y para *F. hybrida* a los 2 meses.

Porcentaje de enraizamiento (%): Cada explante fue considerado como enraizado si presentó al menos una raíz de 0.5 cm. Se contó el número de explantes que iniciaron la fase y se estableció una relación con el total de explantes enraizados expresados en porcentaje.

Porcentaje de mortalidad (%): Esta variable fue evaluada mediante, la relación de la mortalidad del explante y el total de tubos de ensayos sembrados *in vitro*, de los explantes de *F. pilaloensis* y *F. hybrida* multiplicado por 100, semanalmente hasta 7 meses desde la siembra.

3.5. Aclimatación de *F. hybrida*

Debido a la presencia de microorganismos endófitos y mortalidad que mostró *F. pilaloensis*, no pudo llegar a la fase de aclimatación. Sin embargo, en esta fase se evaluaron los explantes sembrados de *F. hybrida* en los sustratos durante 15 días.

3.5.1. Fase de aclimatación en el laboratorio de Biotecnología Vegetal

1. Las plántulas de *F. hybrida* con un promedio de un mes en condiciones de laboratorio (cuadro 6), fueron seleccionadas a una altura aproximada de 6.5cm y con raíces bien desarrolladas para ser transferidas a sustrato (figura 5).
2. Las plántulas fueron sacadas del tubo de ensayo y previamente lavadas con ADE para eliminar el exceso de agar que se encuentra en las raíces, para en lo posterior ser plantadas en los envases plásticos con sustrato (figura 5).
3. Las plántulas fueron cubiertas con otro envase del mismo tamaño, después de dos semanas los recipientes fueron gradualmente abiertos mediante agujeros hasta

dejar la planta completamente expuesta al ambiente natural a una temperatura promedio de 25°C (figura 5).

4. Se realizó un solo riego diario por la mañana, manteniendo el sustrato húmedo durante las dos semanas.

En esta fase se evaluaron dos sustratos, en interacción con los medios usados en la fase *in vitro* (cuadro 6).

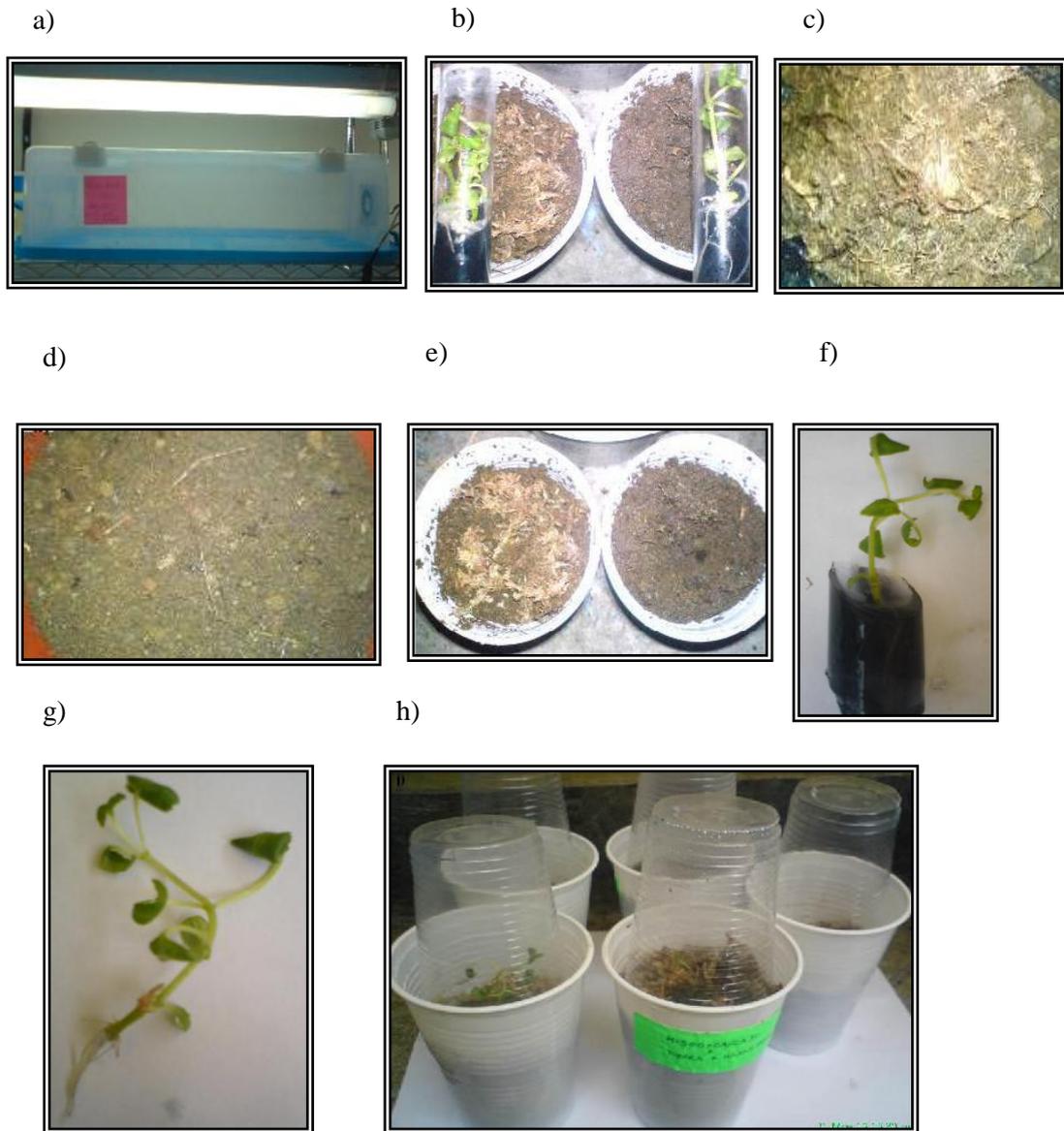
Cuadro 6: Tratamientos evaluados en la fase de aclimatación para *F. hybrida*

NUMERO DE TRATAMIENTO	NUMERO DE SUSTRATOS	MEDIO DE CULTIVO
T1	S1(Turba + cascarilla)	Knudson
T2	S1(Turba + cascarilla)	Knudson C modified
T3	S1(Turba + cascarilla)	Phytamax
T4	S1(Turba + cascarilla)	WPM+ Carbón activado
T5	S1(Turba + cascarilla)	WPM+ Carbón activado+ Auxinas (ANA)
T6	S2(Musgo+ piedra pómez+ tierra)	Knudson
T7	S2(Musgo+ piedra pómez+ tierra)	Knudson C modified
T8	S2(Musgo+ piedra pómez+ tierra)	Phytamax
T9	S2(Musgo+ piedra pómez+ tierra)	WPM+ Carbón activado
T10	S2(Musgo+ piedra pómez+ tierra)	WPM+ Carbón activado+ Auxinas (ANA)

Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

Los sustratos utilizados para la fase de aclimatación fueron dos: Turba+ cascarilla (S1) y Musgo+ piedra pómez+ tierra (S2) (cuadro 6 y figura 5).

Figura 5: Fase de aclimatación *F. hybrida*, a) Mini cámara de invernadero, b) Selección de plántulas jóvenes con una altura promedio de 6.5cm y con raíces de 5 cm, c) S1, d) S2, e) contenedores con sustratos, f) Plántula fuera del tubo de ensayo, g) Plántulas con raíces lavadas, h) fase de aclimatación.



Fotos tomadas por: Nieto y Valdivieso, 2012.

Unidad y diseño experimental: Cada unidad experimental estuvo constituida por envases plásticos con 250g de sustrato (S1 y S2) con 3 repeticiones por cada tratamiento, donde se colocó una plántula de *F. hybrida*. El diseño experimental fue bloques completamente al azar. Además, para el análisis de datos se utilizó la prueba de signos al 5% con 30 repeticiones por tratamiento para homogenizar los datos.

Las variables que se evaluaron en cada tratamiento fueron: porcentaje de sobrevivencia y longitud del explante.

Porcentaje de sobrevivencia (%): Esta variable fue medida mediante la relación de las plantas vivas y el número total de plantas aclimatadas, multiplicado por 100 después de 2 semanas en relación al tratamiento de aclimatación.

Longitud del explante (cm): Se midió la altura de la planta en centímetros desde la base hasta su extremo apical, con el calibrador en centímetros después de 2 semanas.

Las variables medidas en todas las fases de la investigación, fueron analizadas mediante la prueba de signos para datos no paramétricos.

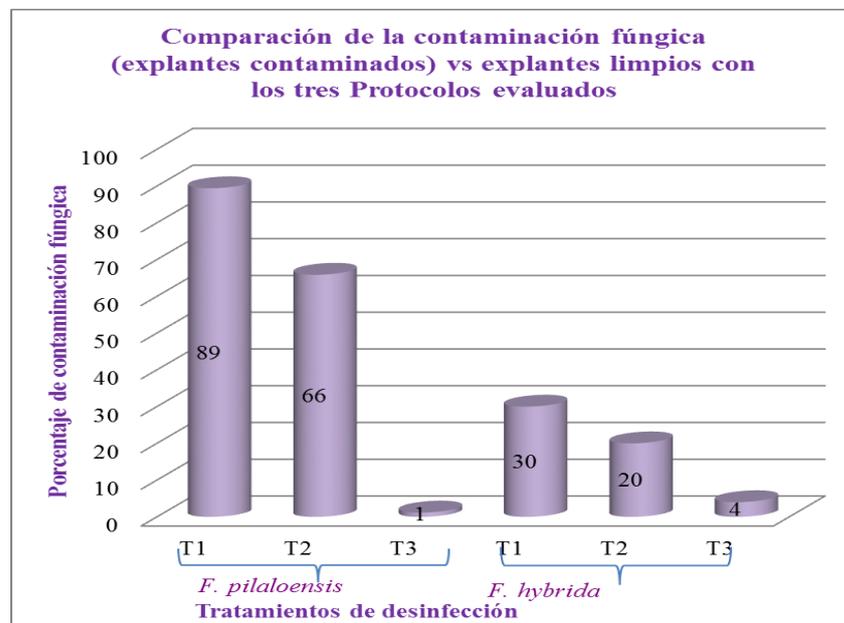
CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Desinfección para brotes de *F. pilaloensis* y *F. hybrida*

En esta fase se evaluaron tres protocolos de desinfección, en donde la **contaminación fúngica** presentó diferencias significativas para los tratamientos, se determinó como mejor tratamiento de desinfección el tratamiento tres (T3), con una contaminación fúngica de 1,18%, mientras T1 y T2 presentaron un alto porcentaje de contaminación fúngica con 89,41% y 65,88%, respectivamente (figura 6). Según Pierik (1990), para evitar la contaminación en el cultivo de tejidos (eliminar los microorganismos), se debe utilizar sustancias químicas como Alcohol (etanol) al 70% para el material vegetal, Hipoclorito de sodio; en una concentración de 5.25% de ingrediente activo, Tween 20 o 80; agente mojante que disminuye la tensión superficial para un mejor contacto superficial del explante con la solución desinfectante, lo que concuerda con los reactivos usados en el tercer tratamiento (T3).

Figura 6: Porcentajes de contaminación fúngica para ambas especies de *Fuchsia*.



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

En el primer tratamiento de desinfección (T1), se utilizó: jabón líquido (45 min)+ ADE³¹+ fungicidas (45 min)+ADE+ bactericidas (45 min)+ ADE+ alcohol 96% (1 min)+ Hipoclorito de Sodio 3% (20 min)+ADE, con este protocolo se obtuvo un porcentaje de explantes limpios de 11% en *F pilaloensis* y en *F hybrida* del 30%. Para el segundo tratamiento de desinfección (T2) se utilizó: jabón líquido (20 min)+ADE + fungicidas (20 min)+ ADE+ bactericidas (20 min)+ ADE+ alcohol 70% (1 min)+ ADE+ hipoclorito de Sodio 3% (20 min)+ ADE+ ampicilina (10seg), este protocolo (T2) presentó un porcentaje de explantes limpios de 34% en *F pilaloensis* y en *F hybrida* del 20%. Mientras para el tercer protocolo de desinfección (T3) se utilizó: Jabón líquido (30 min)+ ADE con Tween 20 (25 min) + ADE+ fungicidas (30 min)+ ADE+ bactericidas (30 min)+ Tween 20 + ADE+ alcohol 70% (1 min) + ADE+ hipoclorito de Sodio 3% (20 min)+ Tween 20+ ADE, con un porcentaje de explantes limpios de 99% en *F pilaloensis* y en *F hybrida* del 96% para el tercer protocolo de desinfección, siendo T3 seleccionado como el mejor protocolo.

Según la investigación realizada por Trujillo (2008) sobre “**Cultivo *in vitro* de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)**”, en la desinfección de los segmentos de tallos, no se encontró un protocolo que permita erradicar totalmente la contaminación de los tallos que se introdujeron *in vitro*, el protocolo consistió en cloro al 2.5% y 1.5% en tiempos de 10-12 min; obteniendo un porcentaje de contaminación de hasta el 40%, utilizando explantes de plantas mantenidas en un espacio abierto ya que los explantes de mortiño se obtuvieron de plantas silvestres creciendo en su hábitat natural, lo cual podría explicar el alto porcentaje de contaminación que se observó en mortiño (Trujillo,2008) y en el presente estudio, en los protocolos uno (T1) y dos (T2).

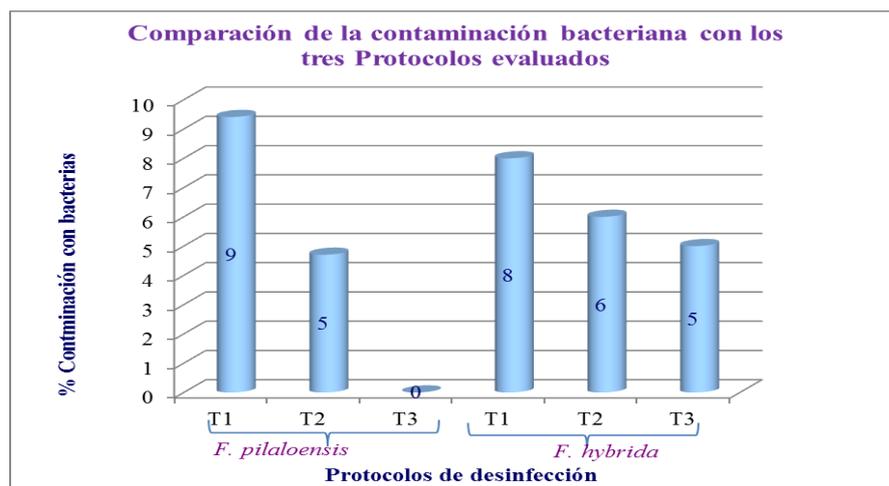
Según la investigación realizada por Sosa-Rodríguez *et al.* (2009) sobre “**Propagación *in vitro* de *Heliconia standley* Macbride en Cuba**” para la desinfección del material vegetal utilizaron Hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos más Tween 20, con lo cual se obtuvo un porcentaje de contaminación *in vitro*, por debajo del 5 %. La disminución en el porcentaje de contaminación, se le atribuye a la actividad detergente que posee el tween 20 y al poder oxidante del

³¹ Agua destilada estéril

Hipoclorito de Sodio que eliminó una gran cantidad de microorganismos presentes en el tejido (Pérez, 1998), estos resultados son similares a los encontrados en el presente estudio, ya que los porcentajes de contaminación fúngica más bajos se encontraron en el protocolo T3 con 1%, y los estudios realizados por Jácome (2011), quién utilizó detergente más Tween 20 por 20 minutos, alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 3% con Tween 20 obteniendo un porcentaje de contaminación por debajo del 3%.

La **contaminación bacteriana** no presentó diferencias significativas con la prueba de signos para datos no paramétricos. Sin embargo, en el tercer protocolo (T3) evaluado, se pudo eliminar por completo la contaminación bacteriana, obteniendo 0% de contaminación, mientras, para el primer protocolo (T1) presentó el promedio más alto con 9,41% de contaminación bacteriana (figura 7).

Figura 7: Porcentajes de contaminación bacteriana para ambas especies de *Fuchsia*.

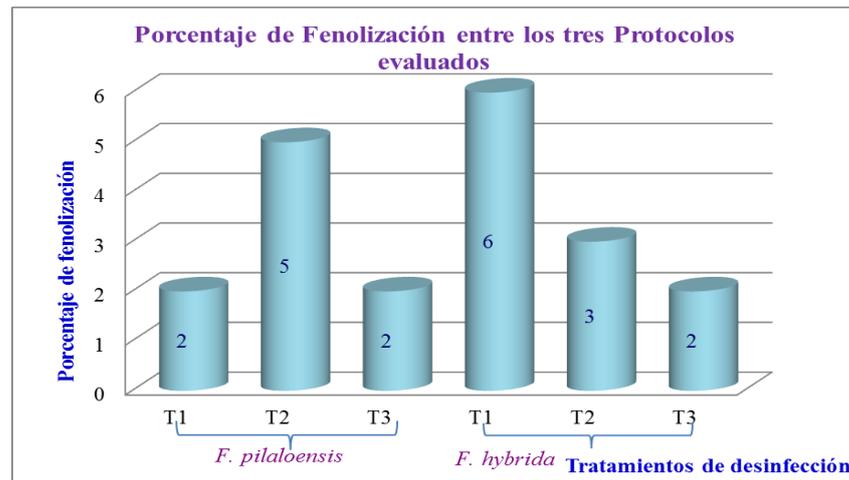


Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

Según Vidales (2012), el mejor método de desinfección donde se obtuvo una contaminación debajo del 4% se obtuvo al lavar los explantes con detergente y cepillo; cortar en segmentos de yemas axilares; tratar con fungicidas (2g/l, durante 15 a 20 minutos); enjuagar con agua destilada estéril; tratamiento con hipoclorito de sodio + tween 20 (2 gotas/l) durante 15 a 20 minutos; y por último, practicar tres enjuagues con agua destilada estéril en campana de flujo laminar, evaluando el tiempo de exposición y la concentración de acuerdo a la madurez del tejido, lo que concuerda con los tratamientos de desinfección aplicados, sin embargo, cabe mencionar que el autor utilizó bactericidas.

Los **porcentajes de fenolización** no presentaron diferencias significativas con la prueba de signos para datos no paramétricos, obteniéndose para *F. pilaloensis* en el primer protocolo (T1) 2%, el segundo protocolo 5% y para el último protocolo 2%; mientras que para *F. hybrida* fue de: 6% para T1, 3% en T2 y 2% en T3 (figura 8).

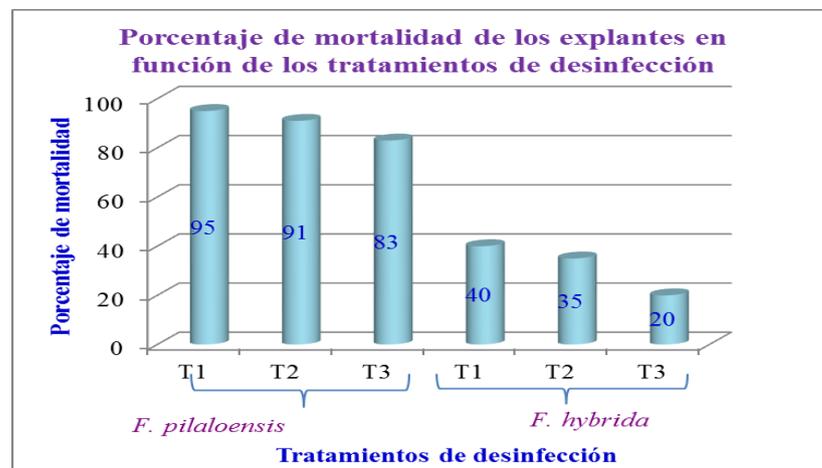
Figura 8: Porcentaje de Fenolización para *F. pilaloensis* y *F. hybrida*



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

Para el porcentaje de mortalidad, se encontró diferencias significativas, según la prueba de signos, el porcentaje más bajo encontrado fue 83% de explantes muertos en el tercer protocolo (T3) para *F. pilaloensis* (figura 9), mientras que para *F. hybrida* se obtuvo un porcentaje de mortalidad del 20% para el tercer protocolo (T3).

Figura 9: Mortalidad de los explantes en la desinfección.



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

Los altos índices de mortalidad presentados en esta fase, se deben, probablemente a las concentraciones de fungidas y bactericidas empleados en el protocolo de desinfección (T3), además del tipo de explante que se utilizó (Recalde, 2007), obteniendo porcentajes muy bajos para *F. pilaloensis* de 83% para el tercer protocolo, mientras que para *F. hybrida*, sus porcentajes fueron del 20% (figura 13), puesto que esta especie no presentó problemas de contaminación con microorganismos endófitos.

La contaminación por microorganismos y la capacidad de la especie para adaptarse al medio, son los principales obstáculos dentro del cultivo *in vitro*, provocando altos índices de mortalidad para la especie de *F. pilaloensis*. La diferencia que se encontró entre los tratamientos obedeció al incremento de las concentraciones de fungidas y bactericidas en el protocolo de desinfección, el tiempo de exposición, el incremento del pH (debido a la contaminación) y la adaptación de la especie al medio (debido a su variación genética) (Castro, 2006).

Además el etanol como agente desinfectante tiene un gran poder de penetración, lo que facilita una correcta desinfección de los explantes, se recomienda su uso en concentraciones del 70%, ya que el alcohol al 90% deshidrata al explante. Unos cuantos segundos de alcohol no son suficientes para matar a todos los microorganismos, por lo que generalmente se combina esta desinfección con el tratamiento con Hipoclorito (sodio o calcio) (Recalde, 2007). Esto explica la alta mortalidad en T1, por el uso de alcohol al 90%.

4.2. Microorganismos Endófitos

Debido a la elevada contaminación presentada en ensayos de desinfección, se realizó análisis de microorganismos endófitos, cuyos resultados se presentan a continuación:

4.2.1. Aislamiento del Hongo Endófito

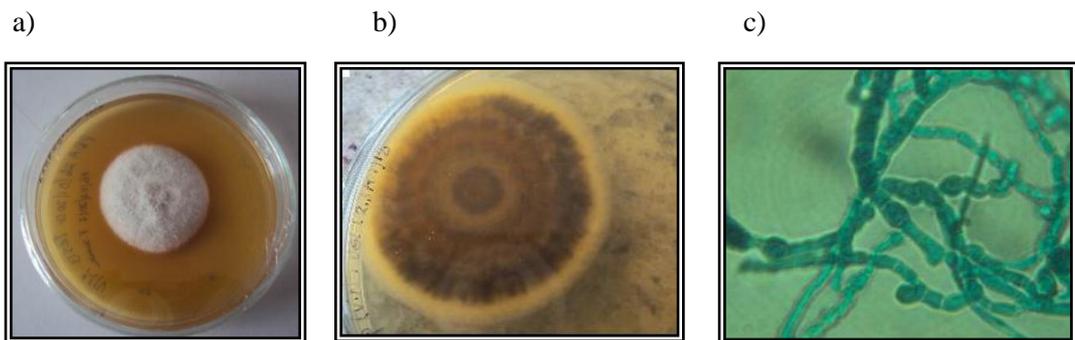
El hongo aislado a partir de brotes de *F. pilaloensis* (figura 10), se describe a continuación: la vista frontal del hongo es de color blanco y apariencia esponjosa y, la vista posterior es de color café oscuro, y presenta una estructura de forma concéntrica (figura 11).

Figura 10: Hongo en la fase *in vitro* (brote de *F. pilaloensis*).



Foto tomada por: Nieto y Valdivieso, 2012.

Figura 11: Hongo endófito de *F. pilaloensis*: a) Vista frontal, b) Vista posterior, c) Vista microscópica a 40X.



Fotos tomadas por: Nieto y Valdivieso, 2012.

Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, la superficie y la rizósfera están habitadas por microorganismos que pueden entrar al tejido a través de aberturas naturales, heridas y llegan a colonizar los tejidos vegetales, lo que causa la contaminación en el medio de cultivo. Los contaminantes fúngicos no son difíciles de detectar en el medio de cultivo pues su crecimiento es visible en forma de colonias aisladas o alrededor de los explantes, como se pudo observar en los resultados presentados (figura 11) (Debut, 2004)

Los microorganismos fúngicos más comúnmente encontrados como contaminantes en el cultivo de tejidos son los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Fusarium*. Se ha detectado la presencia de hongos contaminantes en

ápices de plantas adultas de *Annona muricata*, los cuales correspondieron a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryodiplodia*, *Curvularia* y *Helmithosporium*. Otros identificaron los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus*, durante el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava*. En el cultivo *in vitro* de yemas apicales de mango (*Mangifera indica* L.), se identificaron como géneros de hongos contaminantes a *Fusarium sp.*, *Botryodiplodia sp.*, *Alternaria sp.* y *Aspergillus sp.*; en segmentos nodales se han identificado los géneros *Alternaria sp.* y *Curvularia sp.*, siendo este último el que mayor número de explantes contaminados presentó, señalándose que las diferencias con respecto al resultado anterior puede atribuirse al procedimiento de desinfección, el explante seleccionado y la época del año, entre otras causas (Hernández, 2010).

4.2.2. Aislamiento e Identificación de Bacterias Endófitas

En el aislamiento bacteriano a partir de hojas y brotes de *F. pilaloensis* (figura 12), se aislaron tres bacterias endófitas, mediante la tinción de Gram, observación al microscopio y comparación con literatura, se determinó un Coco Gram Negativo (B3) y dos Bacilos Gram Negativos (B1 y B2) (figura 13).

Figura 12: Aislamiento de bacterias endófitas de *F. pilaloensis*, a) Vista posterior de las tres bacterias endófitas en el medio de cultivo, b) Vista frontal las tres bacterias endófitas en el medio de cultivo, c) Vista posterior B1 Bacilo largo, d) Vista frontal B1 Bacilo largo, e) Vista posterior B2 Bacilo largo, f) Vista frontal B2 Bacilo largo, g) Vista posterior B3 Coco, h) Vista frontal B3 Coco.

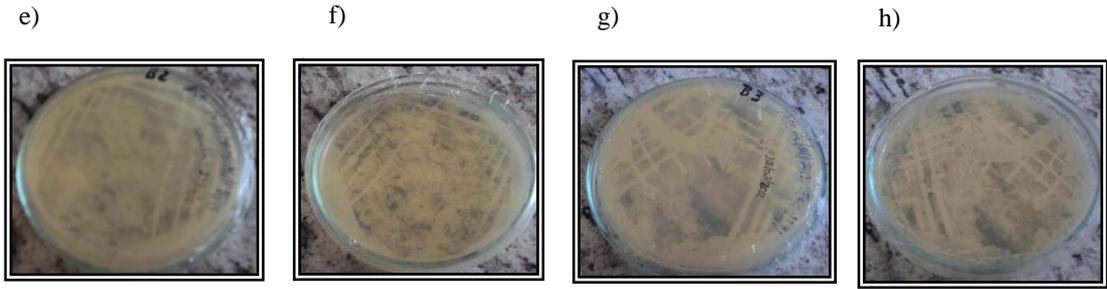
a)

b)

c)

d)





Fotos tomadas por: Nieto y Valdivieso, 2012.

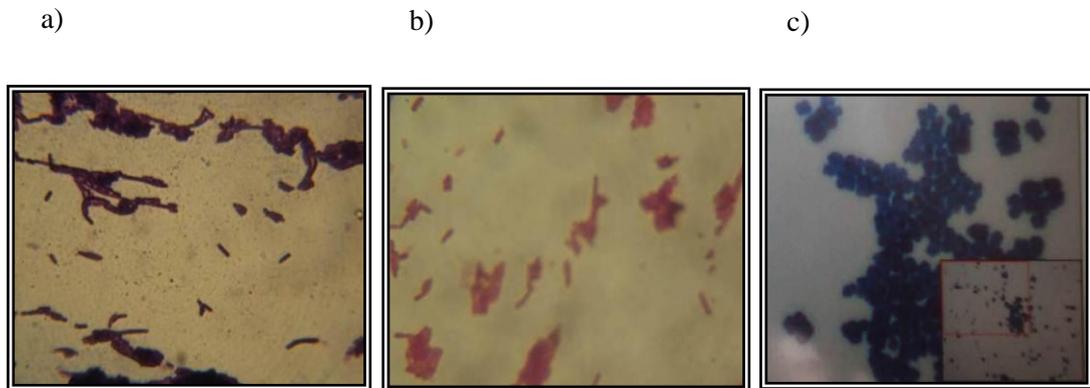
La bacteria 1 (B1) tiene un crecimiento de 4 ufc³² después de 24 horas de siembra, es de color amarillo opaco, no presenta viscosidad, posee bordes regulares (figura 12 a), es una bacteria Gram negativa (identificada por su color rosado en tinción de Gram), mediante observación microscópica y comparación con literatura, se pudo determinar que corresponde a un Bacilo largo (figura 13a).

La bacteria 2 (B2) tiene un crecimiento de 6 ufc moderado después de 24 horas de siembra, es de color blanco opaco, no posee viscosidad, tiene bordes regulares (figura 12e), mediante observación microscópica y comparación con literatura, se pudo determinar que corresponde a un Bacilo largo, y al realizar la técnica de tinción de Gram, se determinó que son bacilos Gram negativos (figura 13b). B2 posee un crecimiento mayor que B1, por presentar 6 ufc

La bacteria 3 (B3) posee un crecimiento de 5 ufc después de 24 horas de siembra, es de color naranja, no tiene viscosidad, tiene bordes irregulares (figura 12g), mediante observación microscópica y comparación con literatura, se pudo determinar que corresponde a Cocos Gram negativos (identificada mediante tinción de Gram) (figura 13c).

³² Unidades formadoras de colonia

Figura 13: Tinción de Gram de bacterias aisladas de *F. pilaloensis* (vista microscópica): a) Bacilo Gram negativo (B1), b) Bacilo Gram negativo (B2), c) Cocos Gram negativo (B3).



Fotos tomadas por: Nieto y Valdivieso, 2012.

Las bacterias endófitas son encontradas principalmente en los espacios intercelulares de los tejidos y, con menor frecuencia, intracelularmente y en tejidos vasculares, sin causar síntomas de enfermedad. La penetración en la planta puede ocurrir por estomas, heridas, áreas de emergencia de raíces laterales. Bacterias endófitas se pueden tornar patógenas en ciertas condiciones, e inclusive en función del genotipo de la planta hospedera (Pérez, 2009), razón por la cual pudieron verse afectados los explantes en la presente investigación.

La existencia de poblaciones bacterianas endógenas en las plantas es un hecho real y está considerado el factor más importante, responsable de las mayores pérdidas del cultivo *in vitro*. Las mismas pueden aparecer en cualquier fase del cultivo y su detección es difícil de realizar, pues la mayoría de estas bacterias normalmente crecen muy poco en los medios de cultivo o crecen solo después de largos períodos de incubación (Recalde, 2007).

Hernández (2010), dice: “la contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales a nivel mundial; los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, bacterias y levaduras, denominados "vitropatógenos"; siendo organismos que no son necesariamente patógenos para las plantas en el campo, pero sí son perjudiciales para células, tejidos u órganos cultivados *in vitro*, ya que compiten con el explante por los

nutrientes del medio y les producen daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o liberación al medio de metabolitos tóxicos”, esto permite explicar la razón por la cual muchos explantes no respondieron adecuadamente al cultivo *in vitro*.

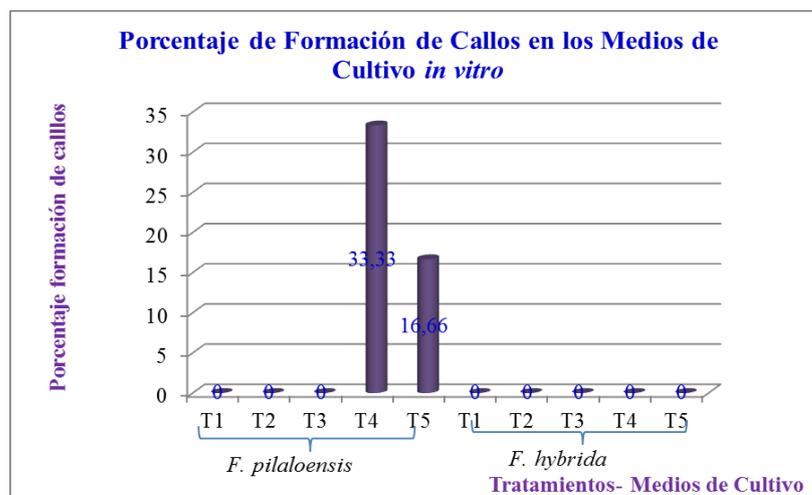
Además, en un estudio realizado se encontró que la inoculación de plantas *in vitro* de *Hemerocallis* con la bacteria no patógena *Lactobacillus platarum*, un contaminante frecuente del cultivo de tejidos, causa disminución del coeficiente de multiplicación, seguido de un rápido deterioro de los cultivos, incrementa el número de bacterias y concentración de ácido láctico en el medio de cultivo (Hernández, 2010). Como contaminantes *in vitro* de plantas, se han aislado especies de bacterias pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, entre otros (Castro, 2006).

También se demostró que la caña de azúcar puede ser colonizada endofíticamente por bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Herbaspirillum* y *Azospirillum*, que se encuentran en la parte aérea de la planta, incluido el ápice (Castro, 2006).

4.3. Establecimiento *in vitro* de *F. pilaloensis* y *F. hybrida*

Cada tratamiento contó con 85 repeticiones, donde se evaluaron cinco medios de cultivo distribuidos en los tratamientos T1 (Knudson), T2 (Knudson C), T3 (Phytamax), T4 (WPM) y T5 (WPM+ Aux). En *F. pilaloensis*, se obtuvieron los siguientes resultados: los medios T4 y T5 obtuvieron un porcentaje de formación de callos de 33,33% y 16,66%, respectivamente (figura 14). *F. hybrida*, no presentó formación de callos.

Figura 14: Porcentaje de formación de callos en el medio de cultivo para *F. pilaloensis* y *F. hybrida*.



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

La producción de callos permite obtener una variedad genética, el cultivo de callos organogénicos como fuente de variabilidad genética y la posterior regeneración de plantas se ha utilizado con fines de mejoramiento genético (Pedranzani, 2004).

Las plantas obtenidas *in vitro* presentan, según la especie, diferencias fenotípicas, morfológicas o bioquímicas en comparación con el fenotipo de las plantas donadoras de los explantes. Larkin y Scowcroft (1981), distinguieron claramente dos tipos de causas: la variación epigenética³³ transitoria, debida probablemente a las condiciones de estrés generadas por las condiciones propias del cultivo de tejidos, células *in vitro* y las variaciones genéticas, producto de mutaciones (Patiño, 2010), lo que explica la razón por la que cada especie responde de manera diferente.

Según Gómez (1995), la inducción de callos de plátano se ha realizado a partir de múltiples partes de la planta: de embriones de semillas diploides en especies silvestres; de secciones de inflorescencias (ovarios, flores femeninas y masculinas, pistilos y anteras); de secciones de fruto; de ápices florales y de la base de las hojas. Los callos empleados para el establecimiento de éstas fueron obtenidos de la base de

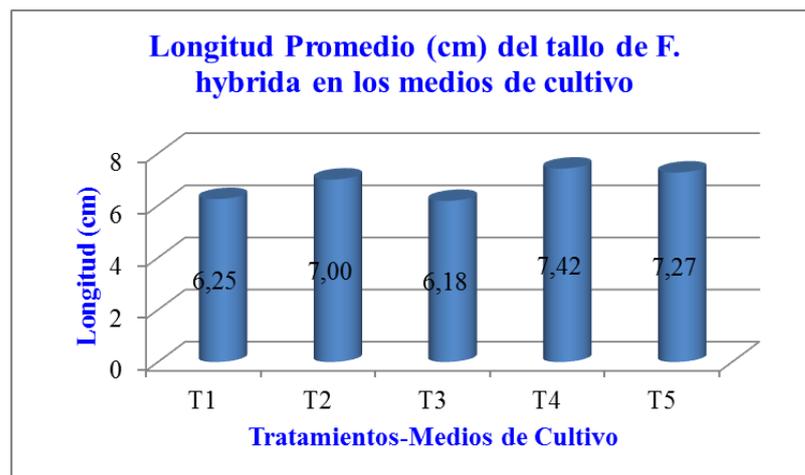
³³ Factores no genéticos que intervienen en la determinación de la ontogenia o desarrollo de un organismo

las hojas de plantas cultivadas *in vitro* y plantas de campo, utilizando el medio WPM, modificado (Ponce, 2009).

Para la variable **longitud del tallo** de *F. pilaloensis* se evaluó desde que empezó hasta los 7 meses después de ser cultivada *in vitro*, mientras que *F. hybrida*, fue evaluada durante dos meses, debido a su rápido crecimiento, razón por la cual se presentan resultados por separado.

La variable de la **longitud del tallo** de *F. hybrida* fue evaluada en centímetros, para determinar cuál es el medio más adecuado para el crecimiento *in vitro* de esta especie (figura 15). La mayor longitud del tallo se obtuvo con T4, es decir, el medio WPM con un promedio de 7,42 cm.

Figura 15: Promedio (cm) de la longitud del crecimiento del tallo desde que empezó hasta los 2 meses de siembra



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

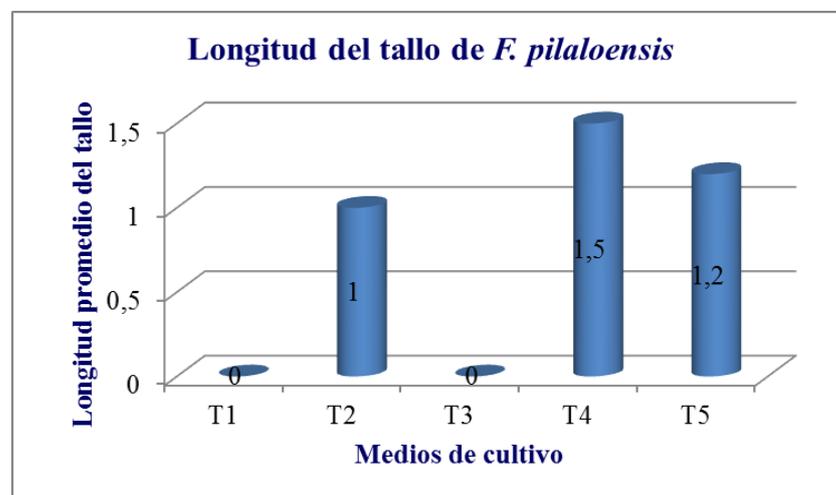
La longitud depende del medio de cultivo, concentración de sales, y la facilidad del explante para adaptarse al medio (Recalde, 2007). En el análisis estadístico realizado, no se muestran diferencias significativas por la longitud promedio del tallo, sin embargo, T4 (WPM) presenta la mayor longitud del tallo, esto se debe a la menor concentración de sales que este medio posee en comparación con los otros medios evaluados.

Según Ocampo (2007) y Pérez *et al.* (2001) el medio de cultivo WPM permite desarrollar el mayor número de brotes a los 30 días posteriores a la introducción *in*

in vitro. Esto sugiere que el tipo de sales del medio basal tiene una influencia directa en la longitud de brotes. WPM es adecuado para cultivo *in vitro* de especies leñosas.

Para *F. pilaloensis* se obtuvo una **longitud promedio de tallo** de 1 cm en T2, 1,5 cm en T4 y 1,2 en T5 a los 7 meses, debido que en los meses anteriores no presentó brotación, siendo el mejor tratamiento para el desarrollo del tallo de la mencionada especie, T4 (WPM) (figura 16). Según Ponce (2009), al probar el medio WPM para el cultivo *in vitro* del almendro, obtuvo un crecimiento de los brotes por encima del 44,1%, con una longitud de 1,4 cm al término del segundo mes.

Figura 16: Porcentaje de crecimiento del brote de *F. pilaloensis* a los 7 meses después de la siembra.



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

Según Pierik (1990) el estado fisiológico tiene efecto sobre la división celular y la regeneración *in vitro*. En general los fragmentos de plantas en estado vegetativo, regeneran *in vitro* con más facilidad que los fragmentos de plantas en estado generativo; dentro de este caso, las yemas (especialmente de árboles y arbustos), que se encuentran todavía en estado de reposo (final de verano o principio del invierno), son más difíciles de cultivar *in vitro* que las que proceden de plantas que ya no están durmientes.

El grado de inhibición del crecimiento en el explante es muy dependiente del genotipo y fenotipo de la especie. Esto es especialmente cierto en aquellos géneros de plantas leñosas (por ejemplo: *Castanea*, *Juglans*, *Quercus*, *Paeonia*, *Rhododendro*, y

muchas coníferas) que naturalmente contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles, y que presentan mayor tendencia a que los tejidos cultivados *in vitro* se oxiden. Muchas veces se encuentran diferencias entre especies del mismo género e incluso cultivares de una misma especie, en condiciones de asepsia (cultivo *in vitro*). Tal es el caso de *Anigozanthos* sp, *Aconitum napellus* y *A. noveboracense*, *Sorghum bicolor* y de variedades de uva (Azofeifa, 2009).

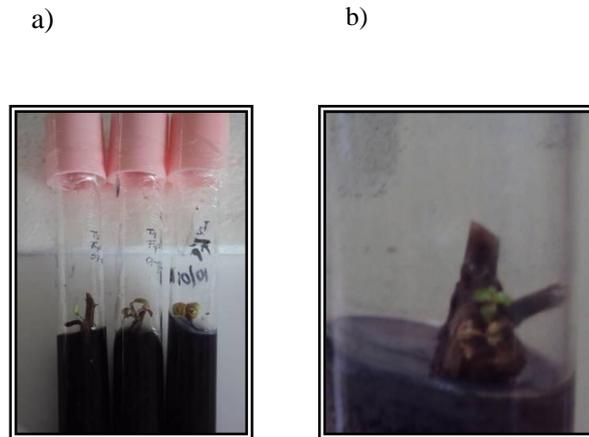
El crecimiento de *F. pilaloensis* fue lento, puesto que al ser una especie leñosa, presenta dificultad de adaptación al cultivo *in vitro* o al medio de cultivo, presentando irregularidad en la obtención de plántulas para formar una población homogénea.

En una investigación realizada sobre **“Métodos de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata*, fases de desarrollo y enraizamiento”**, expresa que las bajas concentraciones de sales del medio WPM, favorecieron la altura del brote (Pérez, 2009), lo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Además, la variación de pH se debió a la presencia de hongos y bacterias que cambian el pH del medio de cultivo determinando la disponibilidad de los compuestos osmóticos y regulando las reacciones bioquímicas que tienen lugar en las células vegetales en cultivo (Recalde, 2007). Según los análisis de suelo realizados previamente, se reguló el pH del medio de cultivo a 6.7, a pesar de esta modificación del pH los explantes pudieron verse afectados por la presencia del hongo y de las bacterias lo que explicaría el déficit de crecimiento de los brotes de *F. pilaloensis*.

Además *F. pilaloensis* presentó crecimiento de 9 brotes en medio (T5), y 18 brotes en los medios (T2) y (T4). Sin embargo, todos los brotes que crecieron, se secaron a los 15 días después de su brotación (figura 17).

Figura 17: Introducción de *F. pilaloensis*: a) Brotes a los cinco meses, b) crecimiento del brote a los 7 meses.



Fotos tomadas por: Nieto y Valdivieso, 2012.

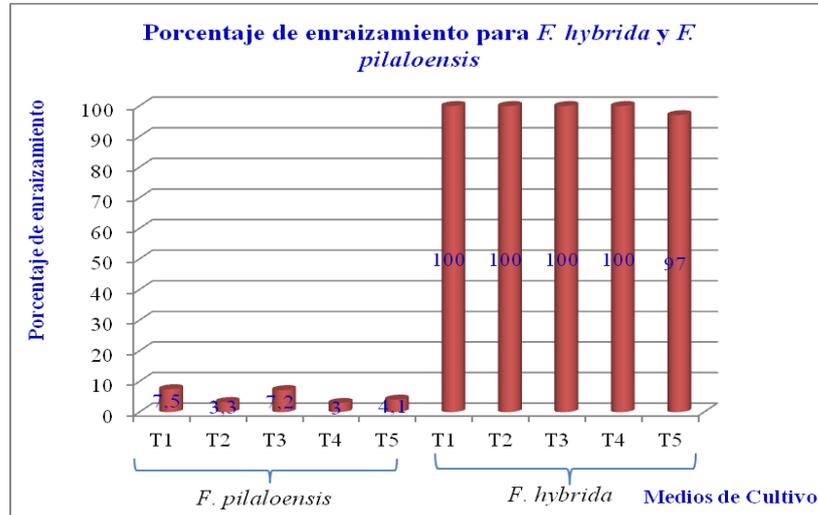
Las especies del género *Fuchsia*, muestran diferencias significativas entre sí, según los lugares donde se encuentran distribuidas, puesto que deben adaptarse a cambios climáticos bruscos; razón por la cual, existen diferencias en el desarrollo *in vitro* de ambas especies en estudio, puesto que se encuentran sometidas a cambios, donde las condiciones de crecimiento deben ser estériles (Domínguez, 2010). Según Darwin (1958), las especies del mismo género, pueden presentar diferencias genéticas, según los lugares donde se encuentran distribuidas, para poder adaptarse y crecer en un determinado lugar.

Se evaluó el **porcentaje de enraizamiento** de *F. hybrida* (figura 18) y *F. pilaloensis*, esta variable no presentó diferencias significativas entre tratamientos. *F. hybrida* en los tratamientos 1, 2, 3, 4 presentó un 100% de enraizamiento, mientras T5 presentó el 97% (figura 19). En cambio, *F. pilaloensis*, tuvo un porcentaje de enraizamiento entre 3 y 7,5%, presentando el mayor porcentaje T1.

Según el análisis estadístico de la prueba de signos, el cultivo de tejido *in vitro* presenta diferencias significativas según las especies de *Fuchsia*. *F. pilaloensis* bajos porcentajes de enraizamiento en relación a *F. hybrida*, esto debido a los altos porcentajes de contaminación y mortalidad de la especie en el medio de cultivo, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Domínguez (2010), que indica que existen diferencias en el desarrollo *in vitro* según la especie cultivada, puesto que se encuentran sometidas a cambios, donde las condiciones de crecimiento deben ser

estériles, además del lugar donde fueron recolectadas, las condiciones ambientales, físicas y químicas del suelo.

Figura 18: Porcentaje de enraizamiento de *F. hybrida* y *F. pilaloensis*



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

Figura 19: Explantes *in vitro* de *F. hybrida* dos meses después de la introducción.



Foto tomada por: Nieto y Valdivieso, 2012.

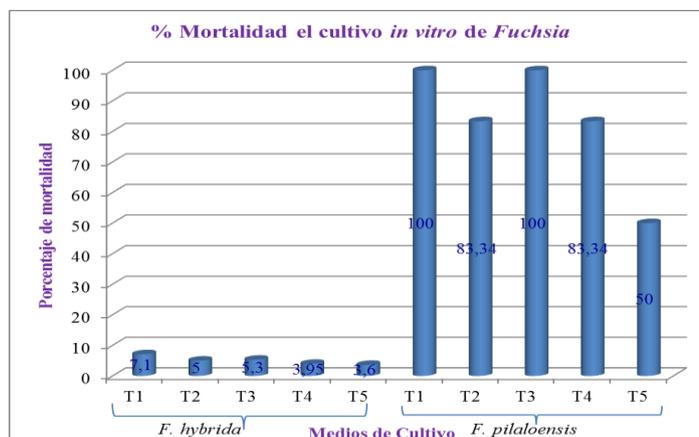
Un estudio realizado en el Campus Experimental San Bernardo en los laboratorios de cultivo de tejidos de la Universidad de Santo Tomás de Chile, evaluó medios de cultivo WPM, WPM 1/2, en *Fuchsia magellanica*, donde se observó resultados positivos con WPM, favoreciendo al enraizamiento espontáneo de los explantes (Banda, 1998).

Los resultados obtenidos en *F. hybrida*, demuestran que todos los medios de cultivo utilizados favorecieron el enraizamiento, ya que no muestran diferencias significativas. Este resultado se debe a sus bajas concentraciones de sales, son similares en su composición, en términos de nutrientes, fuerza iónica, tipo y concentración de reguladores de crecimiento, con el estado fisiológico del explante podría explicar los resultados mostrados en las diferentes condiciones de cultivo ensayadas. Además, la discordancia entre resultados para las especies podría estar influenciada por la variaciones en el genotipo incluso entre individuos de la misma especie (Pierik, 1990).

Se realizó una investigación en la Universidad Santo Tomás, con el objetivo de estandarizar un protocolo de propagación *in vitro* para especies nativas *Fuchsia magellanica* Lam. variedades *Magellanica* y *Eburnea*, en los medios de cultivo WPM. Los resultados para *F. magellanica* Lam. variedades *Magellanica* y *Eburnea* correspondieron a un alto porcentaje de enraizamiento (76% y 55% respectivamente) en el medio WPM (Chávez, 2000).

En los **porcentajes de mortalidad** en cultivo *in vitro* para *F. pilaloensis*, el valor más bajo corresponden al 50% en T5 (WPM+ Aux), mientras que, para *F. hybrida* los porcentajes son 7,1% para T1 (Knudson), 5% para T2 (Knudson “C”), 5,3% para T3 (Phytamax), 3,95% para T4 (WPM) y 3,6% para T5 (WPM+ Aux). Siendo T4 y T5 los que menor porcentaje de mortalidad presentaron, inferior al 4% (figura 20).

Figura 20: Porcentaje de mortalidad de los explantes de *F. pilaloensis* sembrados *in vitro*.



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

Según Mroginski (1998) en relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada al genotipo de las plantas. Es muy frecuente que, en idénticas condiciones de medio y ambiente, las respuestas *in vitro* de cultivo de un determinado explante de una especie, difieran con el cultivar empleado, información que concuerda con los resultados obtenidos para la mortalidad de *F. hybrida* y *F. pilaloensis*, con una mortalidad del 100% en T1 y T3 para *F. pilaloensis*, y 7, 1% T1 para *F. hybrida*.

Según Trujillo (2008), el fenotipo y genotipo de las plantas leñosas, favorece o empeora el estado fisiológico de ciertas especies, después de su cultivo *in vitro* durante el mismo; lo que concuerda con el análisis realizado por Darwin (1958), donde expresa que las especies del mismo género, pueden presentar diferencias genéticas y diferentes índices de mortalidad, ya que depende del lugar donde se encuentran distribuidas, puesto que deben adaptarse y crecer en un determinado lugar, razón por la cual se presentan anomalías como hiperhidricidad o necrosis apical, como resultado de someter a la especie a condiciones de asepsia en el cultivo *in vitro*.

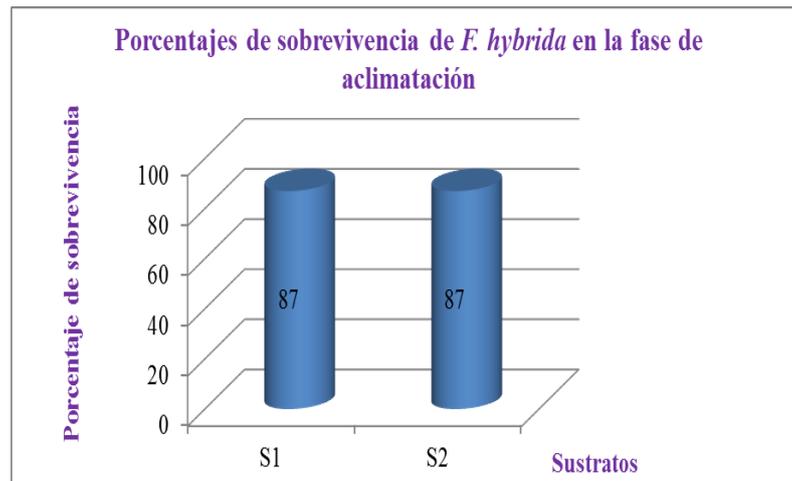
Según Azofeifa (2005), se ha encontrado que el medio de cultivo para plantas leñosas Woody Plants Medium (WPM) desarrollado por Lloyd y McCown (1981) reduce el oscurecimiento de los explantes disminuyendo de esta manera la tasa de mortalidad, comparado a otros medios; lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que WPM presentó un porcentaje de mortalidad menor al 4% para *F. hybrida* y mayor al 50% en *F. pilaloensis*.

4.4. Aclimatación de *F. hybrida*

La variable **porcentaje de sobrevivencia** de *F. hybrida*, presentó un 87% de sobrevivencia para cada sustrato (S1 y S2) (figura 21).

El proceso de aclimatación de plántulas obtenidas *in vitro* es muy complejo, sobre todo en especies leñosas, por lo que el control de las condiciones ambientales durante esta fase es determinante en un sistema de micropropagación (Martínez, 2005).

Figura 21: Supervivencia de *F. hybrida* en la fase de aclimatación



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

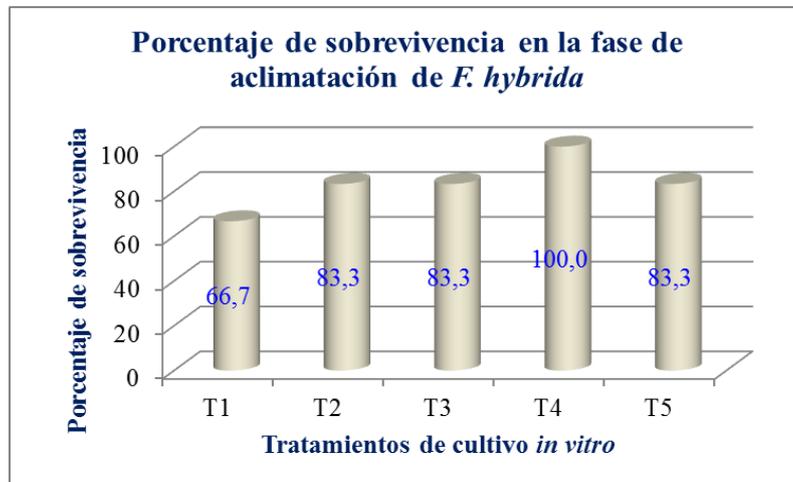
Según Eskibias (2008), el proceso de aclimatación de las plantas del género *Fuchsia* obtenidas mediante cultivo *in vitro*, usando turba rubia a un pH mayor a 6,7 y con un grado de fertilización medio, se obtuvo un porcentaje de aclimatación del 90%.

De igual manera, se realizó una investigación en la Universidad Santo Tomás, en la Escuela de Agronomía, (Chávez, 2000), se llevó a cabo la aclimatación de plantas de *F. magellanica* Lam. var. *magellanica*, en turba (38%), el porcentaje restante constituía tierra. Los resultados fueron el crecimiento de *F. magellanica* Lam. var. *magellanica* con 25 cm al término de la segunda semana.

INIAP (2009), utiliza turba, tierra arenosa y piedra pómez para la adaptación al medio de especies leñosas, obteniendo buenos resultados en el crecimiento.

Los cinco tratamientos evaluados en la fase de cultivo *in vitro*, fueron adaptados al medio (aclimatación), donde el mayor **porcentaje de supervivencia** presentó T4, con el 100%, que consiste en el medio WPM probado en la fase *in vitro* (figura 22).

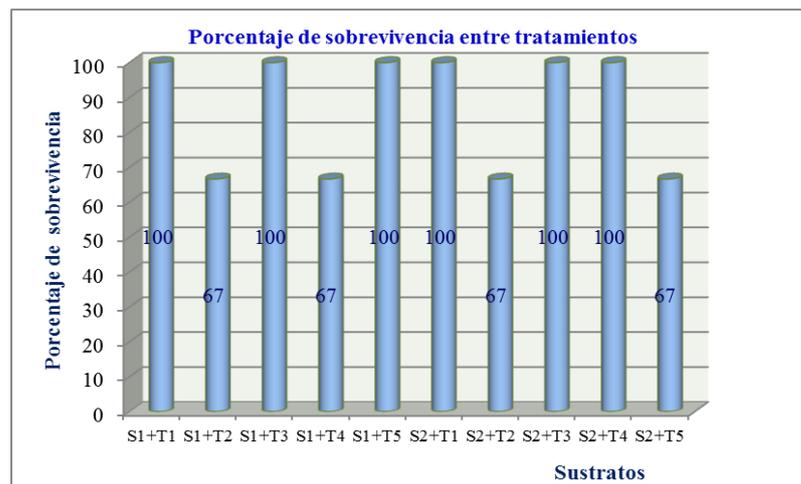
Figura 22: Porcentajes de supervivencia y mortalidad para *F. hybrida* en la fase de aclimatación.



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

Las plantas regeneradas (30 por tratamiento) fueron evaluadas por su **porcentaje de supervivencia** y mortalidad, obteniéndose un porcentaje de supervivencia del 100% en las interacciones de sustrato y medio evaluado en *in vitro*: S1+T1, S1+T3, S1+T5, S2+T1, S2+T3, S2+T4 (figura 23).

Figura 23: Supervivencia de *F. hybrida* en sustratos.



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

La transición entre el ambiente *in vitro*, con un 100% de humedad relativa, a un ambiente *ex vitro* con un porcentaje de humedad menor, es un factor crítico para la supervivencia de las plántulas. Además las plántulas *in vitro* viven en un ambiente

heterótrofo, donde el medio de cultivo suple los azúcares y otros nutrientes para su desarrollo. Las hojas de éstas plántulas, a pesar de ser verdes, probablemente no son completamente activas para fotosintetizar, no poseen capa cerosa, ni cutícula, lo que las hace más susceptibles su aclimatación a sustrato (Recalde, 2007). Después de transferir las plantas al ambiente *ex vitro*, las plantas tienen que corregir todas esas anomalías para aclimatarse al nuevo ambiente, ya sea en invernadero o campo. Por otra parte, la anatomía de la hoja es influenciada por la luz y la humedad, diferenciándose anatómicamente de las originadas *in vivo* (Brained, 1981).

Debido a esto, la aclimatación es un factor importante en la posterior supervivencia de la planta, ya que es una etapa crítica dentro del proceso, en la que se produce la mayor pérdida. En ella se debe comenzar reduciendo gradualmente la humedad relativa, para permitir con esto además del cierre estomático, una mejor formación de cutícula y disminuir la pérdida de agua. Por otra parte, para tener mejores resultados en el establecimiento *in vivo* es necesario el desarrollo radicular *in vitro* (Pierik, 1990). Lo que evidencia en la presente investigación, ya que el desarrollo *in vitro* del sistema radicular, permitió el 100% de adaptación a ambos sustratos.

En esta fase de enraizamiento de las plántulas, el porcentaje de supervivencia es mayor al 90%, lo cual indica que las condiciones asépticas fueron óptimas y también que las vitroplantas se adaptaron de forma idónea a las nuevas condiciones de sustrato (Pierik, 1990).

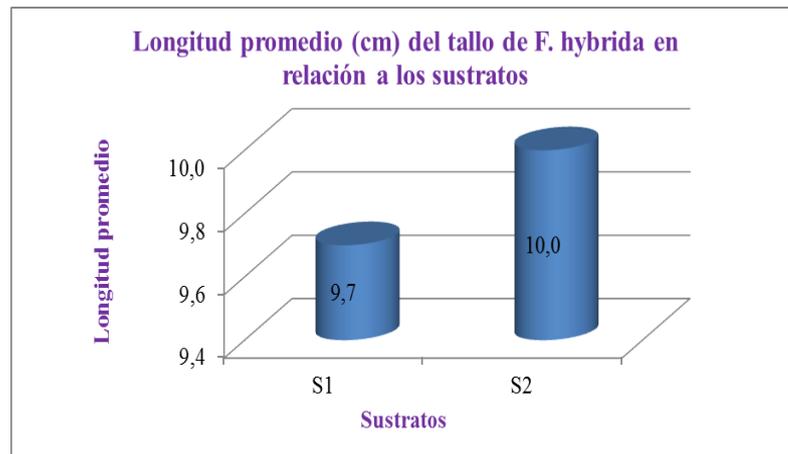
Sin embargo, el estrés asociado a la evapotranspiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento adecuadas para brindar temperatura y humedad relativa moderadas, que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva (Jácome, 2011).

Según Trujillo (2008), en la investigación de Cultivo *in vitro* del mortifloro (*Vaccinium floribundum* Kunth) la aclimatación tuvo una duración de mes y medio hasta tres meses. Durante este tiempo, muchas plantas murieron porque se secaron y otras por contaminación de la tierra al hacer huecos en el plástico, esta contaminación afectó a varias plantas que tenían buen aspecto durante el proceso de aclimatación. Las que

sobrevivieron el proceso de aclimatación, al pasarlas a fundas plásticas con tierra murieron en seguida o sobrevivieron hasta los 30 días después. Es posible que los resultados del cultivo *in vitro* no fueron los adecuados ya que las plantas obtenidas no se pudieron aclimatar, eran muy delgadas y con hojas pequeñas, estas plantas tienen una mala conductividad hídrica de las raíces ya que no hay conexiones adecuadas entre la raíz y el tallo. El mal transporte de agua, junto a una mala retención de agua de las hojas, puede llevar a que estas se sequen rápidamente.

F. hybrida, fue evaluada a la segunda semana de su aclimatación al sustrato (figura 24), presentándose una **longitud promedio** del tallo de 9,7 y 10cm para sustratos S1 (Turba + cascarilla) y S2 (Musgo+ piedra pómez+ tierra), respectivamente.

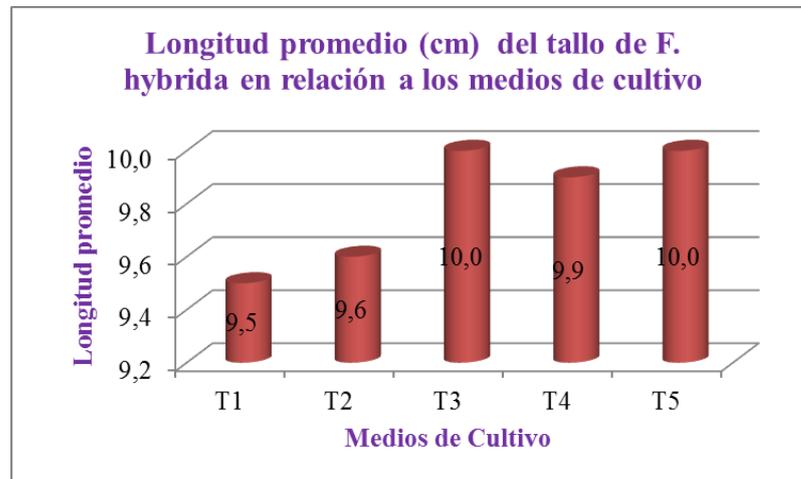
Figura 24: Longitud promedio del tallo de *F. hybrida* en relación a los sustratos



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

F. hybrida, presentó una **longitud promedio del tallo** de 10cm en los medios T3 (Phytamax) y T5 (WPM+ Aux), el medio T1 (Knudson) presentó un promedio de 9,5cm, el medio T2 (Knudson C modified) tuvo un promedio de 9,6cm y el medio T4 (WPM) presentó un promedio de 9,9cm (figura 25).

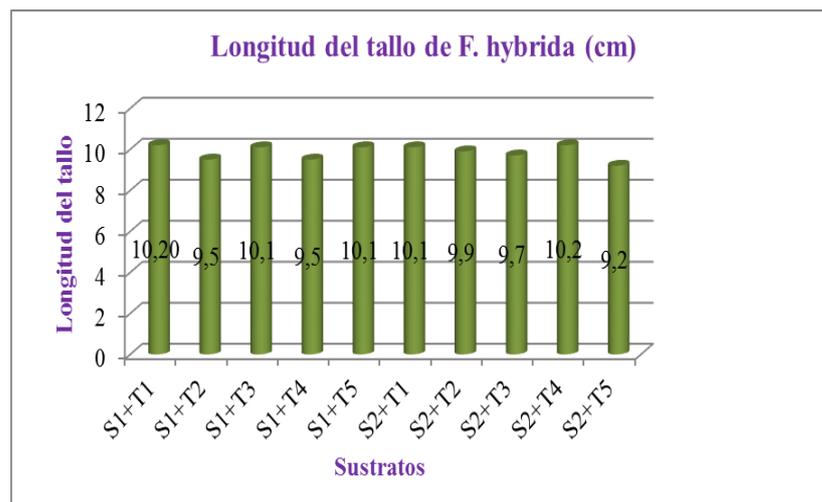
Figura 25: Longitud promedio del tallo de *F. hybrida* en relación a los medios de cultivo.



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

En la etapa de adaptación de *F. hybrida*, se evaluó la **longitud de tallo** para la interacción de sustratos y medio *in vitro*, no reportó diferencias significativas, siendo los óptimos para el desarrollo de *F. hybrida*: S1+T1 y S2+T4 con 10,2 cm y S1+T3, S1+T5 y S2+T2, con 10,1 cm (figura 26). Sin embargo los demás tratamientos presentaron un rango de longitud de tallo entre 9,2 y 9,9.

Figura 26: Longitud promedio (cm) del tallo de *F. hybrida*.



Fuente: Nieto y Valdivieso, 2012.

Se obtuvieron plantas con una altura promedio de 10,2 a 9,2cm que se caracterizaron por ser plantas compactas, con entrenudos cortos, hojas grandes y con mayor número

de brotes, para el desarrollo u crecimiento de las plántulas en la fase de aclimatación, es necesario que se obtenga un buen sistema radicular *in vitro*, y controlar gradualmente la humedad relativa, para permitir con esto además del cierre estomático, una mejor formación de cutícula y disminuir la pérdida de agua (Pierik, 1990).

F. hybrida obtuvo una buena adaptación al medio, puesto que se simularon las condiciones de pH y sales provistas por el medio en *in vitro*, favoreciendo el desarrollo de la especie.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 El tratamiento de desinfección seleccionado como óptimo para ambas especies de *Fuchsia* fue T3 que consistió en la aplicación de fungicidas (Carbendazim y Benomil a 2g.l^{-1}) y bactericidas (Ampicilina y solución Iodada 1ml.l^{-1}), combinados con Tween 20 al 1% por 30min; ya que, disminuyó significativamente los porcentajes de contaminación fúngica hasta 1% en *F. pilaloensis* y 4% para *F. hybrida*, y los porcentajes de contaminación bacteriana disminuyó hasta 0% en *F. pilaloensis* y 5% para *F. hybrida*. Además, T3 presentó el menor índice de mortalidad en los explantes de *F. pilaloensis* en la desinfección, que fue del 83% mientras que para *F. hybrida* con un porcentaje de mortalidad del 20%, respondiendo de mejor manera.

Se recomienda utilizar T3 como el tratamiento de desinfección adecuado para *Fuchsia hybrida*, para la obtención del menor porcentaje de contaminación y mortalidad.

5.2. En el establecimiento *in vitro* de *Fuchsia pilaloensis* y *F. hybrida* se pudo determinar cómo medio óptimo a T4 que es el Woody Plant Medium (WPM), con un promedio de longitud de tallo de 7,42 cm en *F. hybrida* y en *F. pilaloensis* se obtuvo una longitud promedio de 1,5 cm. Siendo T4 (WPM) el mejor tratamiento para el desarrollo del tallo de *Fuchsia hybrida*.

F. hybrida, no presentó formación de callos, sin embargo *F. pilaloensis*, presentó formación de callos en los medios T4 con 33,33% y T5 con 16,66%.

Los medios de cultivos utilizados permitieron el enraizamiento de *F. hybrida*, mostrando porcentajes altos de hasta el 100% para los tratamientos T1, T2, T3 y T4. Mientras que para *F. pilaloensis* se obtuvo el porcentaje más alto de enraizamiento de 7,5% en T1.

La variable porcentaje de mortalidad en cultivo *in vitro* para *F. pilaloensis* presentó porcentajes superiores al 50% para todos los medios de cultivo, mientras que, para *F. hybrida* se obtuvieron porcentajes menores al 4%, en T4 con 3,95% y T5 con 3,6%.

Se recomienda utilizar el medio WPM (T4) para el desarrollo *in vitro* de la especie de *Fuchsia hybrida*, mientras que para *F. pilaloensis* se recomienda realizar nuevos estudios que permitan su desarrollo *in vitro*.

5.3. En la fase de aclimatación de las plántulas de *F. hybrida* se determinó que los dos sustratos presentaron valores altos en relación a la longitud del tallo que consistió en: S1 (Turba+ cascarilla de arroz) y S2 (musgo, piedra pómez y tierra) con una longitud promedio entre 10,2 y 9,2cm respectivamente.

Se recomienda los sustratos S1 (Turba+ cascarilla de arroz) y S2 (musgo, piedra pómez y tierra) para la aclimatación de *Fuchsia hybrida*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abello, J, 2006, “**Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas**” [Consultado el 22 de Enero de 2012], Disponible en: http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/6_HongosEndfitos_RevCorpoica_V7N2_2006_CorregidoDEF.pdf, Colombia.
- Abdelnour, A y J. Vicent, 1994, “**Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales**”, Centro Interamericano de Biorremediación e Información Agrícola.
- Acosta, L, 2002, “**Desinfección de Plantas Medicinales –Principios Básicos**”, [Consultado el 22 de Enero de 2012], Disponible en: <http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-004.html>.
- Agrios, G, 1995, “**Fitopatología**”, 2da edición, Editorial Limusa, España, pags:283-284.
- Alecoconsult Internacional, ALECO, 2009, “**Turbas**”, [Con acceso el 10 Enero de 2012], Disponible en: <http://www.alecoconsult.com/index.php?id=turbas>.
- Alonso, M, 2002, “**Biotecnología Aplicada a la Mejora de *Pelargonium***”, [Consultado 11 de Noviembre de 2012] Disponible en: <http://eprints.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26001.pdf>, Madrid.
- Alvarez, S, 2011, “**Protección de Especies Vegetales y Animales**”, [Con acceso el 12 Noviembre de 2012], Disponible en: <http://alvarezestalin.blogspot.com/2011/01/plantas-en-peligro-de-extincion-en-el.html>.
- Arkive, 2010, “***Fuchsia pilaloensis***”, Images of life on eath, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://www.arkive.org/fuchsia/fuchsia-pilaloensis/#text=All>, Estados Unidos.
- Asamoah, A, 2005, “**Manual de bioseguridad en el Laboratorio**”, Organización Mundial de la Salud, [Consultado el 10 de Febrero de 2012], Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9243546503_spa.pdf.
- Azofeifa, A, 2009, “**Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro***”, [Consultado el 12 de Diciembre de 2012], Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf.
- Banda, J, 1998, “**Propagación por estacas y cultivo *in vitro* de chilco (*Fuchsia magellanica* Lam. var. *magellanica*)**”, Universidad de Santo Tomás, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2000/CL/CL00003.xml;CL1999000328>, Chile.

- Barbón, R., D. Agramonte, R. Collado, F. Jiménez-Terry, E. Quiala, M. Pérez, O. Gutiérrez, E. Jiménez, M. Feria, M. Chávez, A. Trocones, L. Delgado, A. Capote y J. Salas, 2006, “**Avances en el cultivo *in vitro* de especies leñosas y forestales en el instituto de biotecnología de las plantas**”, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba.
- Bedoya, E, 2010, “**Hidroponía**”, Universidad José Carlos Mariategui, [Consultado el 17 de Noviembre de 2012], Disponible en: http://www.ujcm.edu.pe/bv/links/cur_agronomica/Hidroponia.pdf, Perú.
- Berry, P, 1982, “**The systematics of the apetalous fuchsias of South America, *Fuchsia* sect. *Hemsleyella* (Onagraceae)**”, Ann. Missouri Bot. Gard. 72: 213-251, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/23201906>, U.S.A.
- Berry, P, 1995, “**Two New Species of Fuchsia Section Fuchsia (Onagraceae) from Southern Ecuador**”, Missouri Botanical Garden; [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://www.jstor.org/pss/3391955?searchUrl=%2Faction%2FdoBasicSearch%3FQuery%3Dau%253A%2528Paul.Berry%2529%26gw%3Djtx%26prq%3Dau%253A%2528P.Berry%2529%26Search%3DSearch%26hp%3D25%26wc%3Don&Search=yes>, U.S.A.
- Biesterfeld, 2009, “**Benlate**”, shanghai Co. Ltd. (China) [Consultado el 10 de Diciembre de 2011], Disponible en: http://www.farmex.com.pe/docs/hojas_tecnicas/Benlate.pdf, Perú.
- Borrero, E, 2007, “**Protocolo para la regeneración de plántulas a partir de explantes de hojas de cinco variedades ecuatorianas de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*)**”, [Consultado el 17 de Noviembre de 2012], Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/795/1/84516.pdf>, Ecuador.
- Cadavid, S., C. Hernández, R. Hoyos, M. Medina y L. Restrepo, 2006, “**Estudios preliminares en la estandarización de un protocolo para la obtención de callos embriogénicos en dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) de diferentes orígenes geográficos**”, Revista Colombiana de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, [Consultado el 30 de Mayo de 2012], Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/776/77680104.pdf>, México.
- Caldas, L, 2010, “**Tinción de Gram**”, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Cauca, [Consultado el 30 de Mayo de 2012], Disponible en: http://www.facultadsalud.unicauca.edu.co/Documentos2010/DptoMedInt/Tencion_de_gram.pdf, Colombia.
- Calva, G. 2005. “**Cultivo de células vegetales**”, Revista Digital Universitaria. Vol.6, No.11 ISSN: 1607 – 6079. México D.F, [Consultado 06 feb. 2011], Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a-1a.htm>.

- Caranqui, J, 2008, “**Observaciones sobre la taxonomía y propagación de especies de *Fuchsia* en el Ecuador**”, Escuela Politécnica del Chimborazo, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://www.botanica-alb.org/Publicaciones/Otros/14Taxonomia.pdf>, Ecuador.
- Cárdenas, M, 2011, “**Determinación del protocolo de establecimiento y multiplicación *in vitro* de quishuar (*buddle jaincana*), a partir de yemas axilares de plantas madre, como una herramienta para la preservación de esta especie dentro del distrito metropolitano de quito**”, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/3235/T-ESPE-031080.pdf?sequence=1>, Sangolquí- Ecuador.
- Castillo, A, 2008, “**Propagación de Plantas por Cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo**”, Investigadora, Unidad de Biotecnología, INIA las Brujas, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf, Uruguay.
- Castro, S y C. Roa, 2006, “**Bacterias Endófitas de *Cordia alliodora* Oken y *Tbabeuia rosea* Bertold D.C: Potencial como promotoras de crecimiento vegetal en la propagación de se hospedero**”, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis237.pdf>, Colombia.
- Chávez, V, 2000, “**Cultivo *in vitro* y climatización de *Fuchsia magellanica*. Lam y *Fuchsia lycioides*. Andr.**”, Universidad de Santo Tomás, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BIBACL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=025349>, Costa Rica.
- Chinchilla, I, 2008, “**Establecimiento y cultivo *in vitro* de *Pouteria sapota* (Jacquin) H. E. Moore & Stearn**”, Escuela de Biología, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: www.biologia.ucr.ac.cr/TesisLic/IvanniaChinchilla.pdf, Costa Rica.
- Contreras, P, 2001, “**Obtención y separación de giberelinas lactónicas producidas por el hongo *gibberella fujikuroi* para usarlas como estándares cromatograficos**”, [Consultado el 12 de Noviembre de 2012], Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-16442001000200014. Chile.
- Criollo, H, 2011, “**Establecimiento de un protocolo para la propagación masiva *in vitro* de Cabuya Azul (*Agave americana* L.) y Cabuya Blanca (*Furcraea andina* Trel.)**”, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4656/1/T-ESPE-032756.pdf>, Sangolquí-Ecuador.
- Dibut, B., R, Martínez, M, Ortega, Yoania, R y L, Frey, 2004, “**Presencia y uso de microorganismos endófitos en plantas como perspectiva para el**

- mejoramiento de la producción vegetal**”, [Consultado el 18 de Diciembre de 2012], Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/1932/193217832002.pdf>, México.
- Echenique, V., C. Rubinstein, L. Mroginski, 2010, **“Elección del explante en el cultivo de Tejidos Vegetales”**, [Consultado el 2 de Enero de 2013], Disponible en: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r89437.PDF>, México.
- Eskibias, 2008, **“Método europeo para preservar las Fuchsias de las Heladas”**, Asociación Española de la Fuchsia, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: http://www.aefuchsia.es/olla_de_turba.html, España.
- Estopa, M, 2005, **“El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero”**, [Consultado el 12 de Noviembre de 2012], Disponible en: http://www.horticom.com/revistasonline/extra05/M_Estopa.pdf.
- Fernández, A., J. Salager, y C. Scorzza, 2004, **“Surfactantes no iónicos”**, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S303.pdf>, Venezuela.
- Flores, D, 2009, **“Propagación por estacas y estudio preliminar del establecimiento *in vitro* de *Passiflora ligurica*”**, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: http://www.tec.cr/sitios/Vicerrectoria/vie/editorial_tecnologica/Revista_Tecnologia_Marcha/pdf/tecnologia_marcha2/propagacion%20por%20estacas.pdf.
- Gamboa, M, 2006, **“Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas”**, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDF's/v11s1/v11s1a01.pdf>, Colombia
- García, A, 1999, **“Nuevos variantes somaclonales en *Ficus lyrata*, *Ficus elástica*, *Ficus benjamina*, *Spathiphyllum* y *Syngonium*”**, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/5950/tesisUPV1040.pdf?sequence=1>, España.
- García, D., A. Pino, Y. Fernández, D. Guerra, y M. Legarreta, 2011, **“Bacteria endófitas latentes no vitropatógenas en el cultivo *in vitro* de *Xanthosoma sagittifolium* (L. Schot) Endophytic latent non vitropathogenic bacteria in the plant tissue culture of *Xanthosoma sagittifolium* (L. Schot)”**, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V38-Numero_4/cag054111816.pdf, Cuba.
- Gaviria, J, 2010, **“Evaluación de diferentes metodologías para el aislamiento de la bacteria endófitas *Gluconacetobacter* spp. a partir de cultivos de caña de azúcar provenientes del municipio de Supía (Caldas)”**, [Consultado el 12 de Mayo de 2011], Disponible

en:<http://repositorio.ucm.edu.co:8080/jspui/bitstream/10839/73/1/Jennifer%20Gaviria%20Giraldo.pdf>, Colombia.

Gentry, A, 1993, “**A Field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru)**”; University of Chicago, Estados Unidos; pags: 670- 672.

George, E, 1996, “**Problems in initiating and maintaining cultures. *En: Plant propagation by tissue culture***”, Part 2. In practice. Ed. Exegenetics Ltd., Edington, Wilts. England. pp.638-669.

Gepp, V y P. Moller, 2010, “**Apuntes sobre Fungicidas**”, Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Departamento de Protección Vegetal, Unidad de Fitopatología, [Consultado el 10 de Diciembre de 2011], Disponible en: http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/Apuntes_Fungicidas.pdf, Uruguay.

Gilsanz, J, 2007, “**Hidroponía**”, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/ad/ad_509.pdf, Uruguay.

Gómez, M, 2002, “**Bioteconología aplicada a mejora de *Pelargonium***”, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Genética, [Consultado el 18 de Noviembre de 2012], Disponible en: <http://eprints.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26001.pdf>, España.

González, O., I, Milanés, J, Silva, A, Espinosa y L, Acosta, 2003, “**Determinación de las concentraciones adecuadas de 2,4-D y 6-BAP para la inducción de callos morfogénicos de boniato**”, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: revista.ibp.co.cu/component/docman/.../80-bv0397-03-3125-29.html, Cuba.

Hernández, Y, y González, M, 2010, “**Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutes perennes**”, [Consultado el 13 de Diciembre de 2012], Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362010000400015&script=sci_arttext, Cuba.

Hidalgo, A, 2009,” **Las Plantas de Mi Jardín *Fuchsia Hybrida***” [Consultado el 22 de Octubre de 2012], Disponible en: http://www.lasplantasdemijardin.com/plantas/fuchsia_x_hybrida.php

Ibáñez, J, 2006, “**Humus y la Clasificación de los Humus en los Suelos**”, [Con acceso el 10 de Enero de 2012], Disponible en: [Con acceso el 19 de Noviembre de 2010], Disponible en: <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2006/08/18/37767>.

Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica, 2010,“**Especies Endémicas**”, [Consultado el 22 de Noviembre de 2011], Disponible en: http://www.inbio.ac.cr/estrategia/Estudio_2004/Paginas/diversidad02.html.

- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 1994, “**Fichas Internacionales de Seguridad Química Hipoclorito de Sodio**” [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/1101a1200/nspn1119.pdf>.
- Jácome, A, 2011, “**Micropropagación *in vitro* de la especie endémica: Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción**”, Escuela Politécnica del Ejercito- ESPE; [consultado el 10 de noviembre de 2011], disponible en: <http://www3.espe.edu.ec:8700/bitstream/21000/3238/1/t-espe-031075.pdf>, pág. 63, Sangolquí-Ecuador.
- Jaramillo, A, 2011, “**Conservación y Biodiversidad**”, [Consultado el 12 de Noviembre del 2012], Disponible en: http://www.cti.espol.edu.ec/maestros/Proyectos_ATEES/copol/ecuador.htm, Escuela Politécnica del Litoral, Guayaquil.
- Jaramillo, P, 2008, “**Establecimiento del cultivo *in vitro* de *Polylepis microphylla* como futura estrategia de conservación de la especie en la provincia del Chimborazo**”, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí.
- Jardín Botánico de Córdoba, 2007, “**Cultivo *in vitro***”, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: http://www.jardinbotanicodecordoba.com/inves_cons_cult_invi.php, Argentina.
- Johansen, M, 1999, “**Aislamiento de protoplastos del genero *Fuchsia***”, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BIBACL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=025167>, Chile.
- Jorge, C, 2005, “**Micropropagación y aclimatación de chile dulce (*Capsicum annuum* L. var. Najera.) y chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con miras al mejoramiento genético del cultivo**” [Consultado el 20 de Marzo de 2012], <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0715E/A0715E.PDF>.
- Jørgensen, P, 1985, “**Annals of the Missouri Botanical Garden**”, Missouri Botanical Garden, U.S.A, pags- 248-249.
- Jover, A, 2004, “**Manual del Auxiliar de Farmacia**”, Modulo II, Editorial Mad, España.
- Kevers, C., M. Coumans-Gilles, M. Coumans y Th. Gaspar, 1983, “***In vitro* vegetative multiplication of *Fuchsia hybrid***”, [Consultado el 12 de Noviembre de 2012], Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304423883901875>.
- Lagoutte, 2009, “**Efecto del tamaño de celdas y citoquininas en el crecimiento de plantas de petunia**”, Revista Internacional de Botánica Experimental, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en:

<http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol78/LAGOUTTE.pdf>.
Argentina.

León- Yáñez, S., y P, Jørgensen 1995, “**Familias nativas enumeradas en orden descendente según su número de especies, con el porcentaje de especies endémicas**”, Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador, [Consultado el 10 de Febrero de 2012], Disponible en: <http://www.mobot.org/mobot/research/ecuador/results.shtml>.

Levitus, G., V, Echenique, C, Rubinstein, E, Hopp y L. Mroginski, 2010, “**Biología y Mejoramiento Vegetal II**”, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), [Consultado el 17 de Noviembre de 2012], Disponible en: http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf, Argentina.

Lluna, R, 2006, “**Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta**”, , [Consultado el 15 de Noviembre de 2012], Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Reguladores%20general.pdf>, Argentina.

López, C, 2008, “**Enraizamiento y Aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro***”, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros31/enraizamiento.html>, España.

Lozano, Z, 2011, “**Establecimiento de un protocolo para la propagación *in vitro* de guarango *caesalpinia spinosa* (molina) kuntze, a partir de plántulas como herramienta para la preservación de esta especie**”, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3695/1/T-ESPE-031358.pdf>, Sangolquí- Ecuador.

Marín, J, 1997, “**La micropropagación y la mejora de especies frutales**”, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: <http://www.unizar.es/acz/02AcademicosNumerarios/Discursos/Marin.pdf>, Zaragoza- España.

Martínez, J y E, Núñez 2004, “**Los Briofitos**”, [Consultado 13 de Noviembre del 2012] Disponible en: <http://www.uam.es/informacion/asociaciones/SEB/divulgacion/articuloinfoambiental>.

Martínez, R., H, Azpíroz, L, Rodríguez, V, Centina y M, Gutiérrez, 2005, “**Aclimtación de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake y *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden**”, [Consultado 21 de Diciembre del 2012] Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rxm/vol01-03/RXM001000309.pdf>, México.

Matos-Escudero, A, 2007, “**Inducción de Callos en Plantas Silvestres de Zábila (*Aloe Vera*) con diferentes combinaciones de 2,4-D, BA y Kinetina**”, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad de

- Zulia, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: <http://revistas.luz.edu.ve/index.php/bcib/article/viewFile/3339/3221>, Venezuela.
- Mroginski, L, 1991, “**Establecimiento de cultivo de tejidos *in vitro* cultivo de tejidos**” [Consultado el 23 de Octubre de 2012], Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo2.pdf>
- Mroginski, L, 1998, “**Cultivo *in vitro***”, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, Argentina, pags: 26-27.
- Muñoz, J, 2009, “**Gluconacetobacter diazotrophicus, modelo de bacteria endófito**”, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México,[Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap9/>, México.
- Ocampo, F y V, Núñez, 2007, “**Propagación *in vitro* de Psidium guajaba mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales**”, [Consultado el 20 de Diciembre de 2012], Disponible en: <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/3.PropagacininvitrodePsidiumguajaba.pdf>, Colombia.
- Olmos, S., G. Luciani, y E. Galdeano, 2005, “**Métodos de Propagación y Conservación del Germoplasma**”, Biotecnología y Mejoramiento Vegetal,[Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://www.biblioteca.org.ar/libros/150415.pdf>, Argentina.
- Oscullo, B, 2011,“**Organogénesis Indirecta *in vitro* de Anturio (*Anthurium andreanum* L.), a Partir de Secciones de Hoja**”,[Consultado 13 de Noviembre del 2012] Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5138/1/T-ESPE-IASA%20I-004591.pdf>
- Pabón y Sánchez, 2010, “**Hábitos y actitudes sobre conservación ambiental de los moradores de la comunidad de San Francisco de Manzana, parroquia el Sagrario, cantón Ibarra**”, Universidad Técnica del Norte, Facultad de Educación, Ciencia y Tecnología. Ecuador.
- Palmucci, H., M, Wolcan y P. Grijalva, (2011) “**Status of the Pythiaceae (StraminiPila) in argentina**”, [Consultado 9 de Diciembre de 2012] Disponible en: http://www.botanicargentina.com.ar/boletin/46-3/01_palmucci.pdf.
- Patiño, C, 2010, “**Variación somaclonal y selección *in vitro* con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas**”, Universidad Nacional Abierta y a distancia CEAD Palmira, Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuaria y del Medio Ambiente, Revista de Investigación Agraria y Ambiental, Colombia.
- Patzelt, E, 2004, “**Flora del Ecuador**”, cuarta ed., Quito- Ecuador, pags: 73-75.

- Paucar, M, 2011, “**organogénesis directa *in vitro* a partir de explantes de hojas de mora (*Rubus glaucus* Benth)**”, [Consultado 11 de Noviembre de 2012] Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5134/1/T-ESPE-IASA%20I-004590.pdf>.
- Pedranzani, H, 2004, “**Producción de callos e inducción de plantas de *Digitaria eriantha* Avanzada INTA *in vitro***”, Revista Internacional de Botánica Experimental, [Consultado 14 de Diciembre de 2012] Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v73/v73a12.pdf>, Argentina.
- Peñañiel, M, 2003, “**Flora y Vegetacion de Cuicocha**”, [Consultado el 12 de Noviembre de 2012], Disponible en: <http://repository.unm.edu/bitstream/handle/1928/11701/Flora%20y%20vegetaci%C3%B3n%20de%20Cuicocha.pdf?sequence=1>.
- Pereira, C, 2007 **Plantas y Flores** [Consultado el 23 de Octubre de 2012], Disponible en: <http://plantayflor.blogspot.com/2009/05/fuchsia-hibrida.html>
- Pérez, A., J. Rojas y V. Helson, 2009, “**Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas**”, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: http://www.recia.edu.co/documentos-recia/recia2/revisiones/1_arc_01.pdf, Colombia.
- Pérez, F., R. Santana, Y. Alvarado, B. Díaz, y R. Gutiérrez, 2010, “**Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias endófitas en sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)**”, [Consultado el 12 de Mayo de 2012], Disponible en: http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V37-Numero_3/cag103101747, Cuba.
- Pérez, J., F. Mesén, L. Hilje, y M. Aguilar, 2001, “**Método de propagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata***”, [Consultado el 20 de Diciembre de 2012], Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A3295E/A3295E.PDF>, Costa Rica.
- Pérez, R, 2011, “**Importancia de Conservar la Biodiversidad Genética**” [Consultado el 22 de Noviembre de 2011], Disponible en: http://www.natureduca.com/conserva_biodiversid3.php, España.
- Pierik, R. 1990, “**Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**” Departamento de Horticultura, Universidad de Agricultura de Wageningen de Holanda. Madrid, España. p. 15, 35, 143, Disponible en: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r73859.PDF>.
- Ponce, D y M, Villegas, 2009, “**Propagación *in vitro* del Hybrido almendro por durazno H1**”, Sociedad Mexicana, [Consultado el 18 de Diciembre de 2012], Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/610/61011222004.pdf>, México.
- Radice, S, 2010, “**Morfogénesis *in vitro***”, [Consultado el 19 de Noviembre de 2012], Disponible en: <http://www.biblioteca.org.ar/libros/150404.pdf>, Argentina.

- Recalde, C, 2007, “**Establecimiento del cultivo *in vitro* y aclimatación en invernadero de *Nepeta hederaceae variegata*, Tabacundo- Pedro Moncayo, 2006**”, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí.
- Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (RAP-AL), 2008, “**Benomil**”, [Consultado el 10 de Diciembre de 2011], Disponible en: http://www.rap-al.org/articulos_files/Benomil_Enlace_81.pdf.
- Reuther, G, 1988, “**Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under *in vitro* and greenhouse condition**”.
- Rivero, M, 2011, “ **Agrobiotecnología Cultivo de tejidos vegetales I**” [Consultado el 23 de Octubre de 2012], Disponible en: http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/2011_2%20Cultivo%20de%20Tejidos%20I.pdf Mercedes Rivero
- Rojas, R, 2007, “**Validación *in vitro* de cuatro medios de cultivo en Aguacate (*Persea americana Mill*) de las razas; Mexicana (*var. Drymifolia*), Guatemalteca (*var. Guatemalensis*), Antillana (*var. Americana*) y *Persea tolimanensis***” Universidad Michuacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología, [Consultado el 19 de Noviembre de 2012], Disponible en: <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/5616/1/VALIDA~1.PDF>, México.
- Rojas, M y J. Betancourt, 2011, “**Rizogénesis *in vitro* a partir de yemas de *Polylepisincana Kunth.*, y *Polylepis pauta Hieron.*, con la ulterior determinación de la especie viable para el crecimiento *in situ* en la zona de Papallacta**”, Tesis Universidad Politécnica Salesiana, Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, pag 33.
- Roncancio, V. y M. Aleixo, 2009, “**El Ácido Abscísico acelera el desarrollo floral de solidago en días cortos**”, [Consultado el 23 de Octubre de 2012], Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a11v62n1.pdf>, Colombia.
- Rodríguez, M 2007, “**Características del Musgo**”, [Consultado 13 de Noviembre del 2012] Disponible en: <http://www.enzobonsai.com/es/varios/337-musgo-sphagnum-150gr.html>.
- Sánchez, L, 2005, “**Antisépticos y desinfectantes**”, Hospital Militar Central, Departamento de Dermatología, [Consultado el 10 de Diciembre de 2011], Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/dermatologia/v15_n2/pdf/a02.pdf, Perú.
- Sánchez- Cuevas, 2004, “**Desinfección de ápices de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) cv. “*Querepa rosada*” con Hipoclorito de Sodio**”, [Consultado el 2 de Enero de 2013], Disponible en: <http://udoagricola.orgfree.com/V6UDOAg/V6Layne60.pdf>.

- Salgado, M, 2007, “**Cultivo *in vitro* de *Anthurium andreanum***”, [Consultado el 10 de Diciembre de 2011], Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/831/1/5810724S164.pdf>
- Salas, E, 2010, “**Las micorrizas y su importancia para el manejo y conservación de los árboles del trópico**”, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://www.una.ac.cr/inis/docs/suelos/Eduardo%20Salas.pdf>, Costa Rica.
- Segretin, M, 2006, “**Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)**”, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://www.argenbio.org/adu/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>.
- Serrani, J, 2008, “**Interacción de Giberelinas y Auxinas en la fructificación del tomate**”, Universidad Politécnica de Valencia, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/18936/1/TesisSerrani.pdf>, España.
- Smithsonian National Museum of Natural History, 2011, “**Onagraceae- The Evening Primrose Family**”, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://botany.si.edu/onagraceae/result.cfm?myFrom=tree&genus=Fuchsia>, U.S.A.
- Sosa-Rodríguez, F., R. Ortiz, R. Hernández, P. Armas, D. Guillen, 2009, “**PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Heliconia standley* Macbride EN CUBA**”, [Consultado el 2 de Diciembre de 2012], Disponible en: http://www.redalyc.org/redalyc/pdf/609/Resumenes/60912623003_Resumen_1.pdf.
- Suárez, E, 2011, “**Micropropagación *in vitro* de Piña (*Ananas comosus* L. Merrill) Híbrido MD-2 a partir de cortes de yemas laterales y apicales**”, [Consultado el 2 de Enero de 2013], Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4952/1/T-ESPE-IASA%20I-004581.pdf>, Ecuador.
- Suárez, I, 2006, “**Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de roble (*tabebuia rosea bertol dc*)**”, [Consultado el 12 de Noviembre de 2012], Disponible en: <http://www.unicordoba.edu.co/revistas/rta/documentos/11-2/112-6.pdf>.
- Tabares, E, 1998, “**Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos**”, [Consultado el 20 de Diciembre de 2012], Disponible en: http://webapp.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo14.pdf
- The international union for conservation of nature (iucn) red list of threatened species, 1997, “**Fuchsia pilaloensis**”, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/45528/0>.
- Trujillo, L, 2009, “**Manual de Prácticas de Técnicas de Cultivos Vegetales**”, Instituto Tecnológico Superior de Misantla, [Consultado el 2 de Abril de 2011],

Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/17000375/Manual-CTV-May2009>, México.

Trujillo, D, 2008, “**Cultivo *in vitro* de mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*)**”, Consultado el 15 de Diciembre de 2012], Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5138/1/T-ESPE-IASA%20I-004591.pdf>

Ulloa, C y P. Moller, 2008, “**Flores y Arbustos del Ecuador**”, www.efloras.org, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=113050.

Union Mundial para la Naturaleza, 2000, “**Categorías y Criterios de la lista Roja de la UICN**”, [Consultado el 22 de Noviembre de 2011], Disponible en: http://www.iucnredlist.org/documents/redlist_cats_crit_sp.pdf.

Universidad Nacional del Nordeste, 2011, “**Familia Onagraceae**”, [Consultado el 10 de Noviembre del 2012], Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Rosidae/Ordenes%20y%20familias%20con%20posici%F3n%20incierta/2-Orden%20Myrtales/5-Onagraceae.pdf>, Argentina.

Universidad Politécnica de Valencia, 2003, “**Fitorreguladores**”, [Consultado el 2 de Abril de 2011], Disponible en: http://www.euita.upv.es/varios/biologia/temas/tema_14.htm#Regulaci%C3%B3n%20del%20crecimiento%20y%20desarrollo:%20las%20hormonas%20vegetales%20o%20fitorreguladores, España.

Vargas y Gonzáles, 2011, “**Biodiversidad Ecológica**”, [Consultado el 12 de Noviembre de 2012], Disponible en: http://www.wiki.espol.edu.ec/index.php/Biodiversidad_ecologica, Ecuador.

Valdés, A, 2012, “**Tipos de sustrato**”, [Consultado 13 de Noviembre del 2012] Disponible en: <http://www.jardineriaon.com/tipos-de-sustrato.html>.

Vidales, I, 2002, “**Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática del aguacate (*Persea americana Mill*)**”, Universidad de Colima, [Consultado 19 de Noviembre del 2012] Disponible en: http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Ignacio_Vidales_Fernandez.pdf, Mexico.

Zamudio, T, 2005, “**Factores de deterioro**”, Regulación jurídica de la Biotecnologías, [Consultado el 12 de Noviembre de 2012], Disponible en: <http://www.biotech.bioetica.org/clase3-13.htm>.

ANEXOS

Anexo 1: Familias nativas del Ecuador enumeradas en orden descendente según su número de especies, con el porcentaje de especies endémicas.

Familia	Número de especies	% especies	Número de especies endémicas	% especies endémicas
Orchidaceae	2999	19.6	1300	43.3
Asteraceae	863	5.6	370	42.9
Melastomataceae	553	3.6	199	36.0
Rubiaceae	493	3.2	100	20.3
Poaceae	451	2.9	65	14.4
Bromeliaceae	440	2.9	151	34.3
Piperaceae	438	2.9	134	30.6
Araceae	397	2.6	189	47.6
Solanaceae	338	2.2	78	23.1
Dryopteridaceae	309	2.0	81	26.2
Fabaceae	259	1.7	32	12.4
Gesneriaceae	239	1.6	77	32.2
Euphorbiaceae	225	1.5	45	20.0
Ericaceae	224	1.5	113	50.4
Cyperaceae	211	1.4	14	6.6
Polypodiaceae	199	1.3	25	12.6
Mimosaceae	178	1.2	19	10.7
Lauraceae	167	1.1	25	15.0
Campanulaceae	155	1.0	95	61.3
Acanthaceae	144	0.9	44	30.6
Verbenaceae	133	0.9	27	20.3
Pteridaceae	130	0.8	3	2.3
Sapindaceae	130	0.8	8	6.2
Schrophulariaceae	127	0.8	45	35.4
Clusiaceae	124	0.8	15	12.1
Arecaceae	123	0.8	15	12.2
Moraceae	120	0.8	5	4.2
Lamiaceae	119	0.8	33	27.7
Thelypteridaceae	108	0.7	17	15.7
Annonaceae	105	0.7	20	19.0
Bignoniaceae	98	0.6	0	0.0
Hymenophyllaceae	98	0.6	15	15.3
Caesalpiniaceae	97	0.6	10	10.3
Malvaceae	95	0.6	10	10.5

Marantaceae	92	0.6	31	33.7
Apocynaceae	91	0.6	9	9.9
Malpighiaceae	90	0.6	7	7.8
Passifloraceae	90	0.6	29	32.2
Convolvulaceae	86	0.6	3	3.5
Asclepiadaceae	85	0.6	41	48.2
Urticaceae	84	0.5	12	14.3
Myrtaceae	83	0.5	9	10.8
Boraginaceae	82	0.5	19	23.2
Lycopodiaceae	78	0.5	17	21.8
Aspleniaceae	70	0.5	7	10.0
Cucurbitaceae	70	0.5	3	4.3
Rosaceae	70	0.5	17	24.3
Amaranthaceae	69	0.5	21	30.4
Myrsinaceae	69	0.5	14	20.3
Gentianaceae	65	0.4	35	53.8
Cyclanthaceae	61	0.4	24	39.3
Cyatheaceae	60	0.4	7	11.7
Meliaceae	59	0.4	4	6.8
Begoniaceae	58	0.4	33	56.9
Cecropiaceae	57	0.4	8	14.0
Flacourtiaceae	57	0.4	3	5.3
Heliconiaceae	57	0.4	18	31.6
Selaginellaceae	56	0.4	3	5.4
Chrysobalanaceae	55	0.4	9	16.4
Apiaceae	54	0.4	7	13.0
Araliaceae	54	0.4	13	24.1
Onagraceae	53	0.3	13	24.5
Polygalaceae	53	0.3	16	30.2
Oxalidaceae	50	0.3	5	10.0
Sterculiaceae	49	0.3	9	18.4
Viscaceae	49	0.3	20	40.8
Sapotaceae	48	0.3	5	10.4
Bombacaceae	47	0.3	7	14.9
Cactaceae	47	0.3	19	40.4
Dennstaedtiaceae	47	0.3	2	4.3
Myristicaceae	47	0.3	1	2.1
Menispermaceae	45	0.3	3	6.7
Brassicaceae	44	0.3	18	40.9
Caryophyllaceae	44	0.3	4	9.1
Burseraceae	40	0.3	1	2.5
Violaceae	40	0.3	5	12.5
Blechnaceae	39	0.3	9	23.1

Lecythidaceae	39	0.3	2	5.1
Monimiaceae	39	0.3	8	20.5
Alstroemeriaceae	37	0.2	17	45.9
Capparaceae	35	0.2	7	20.0
Valerianaceae	35	0.2	9	25.7
Dioscoreaceae	33	0.2	4	12.1
Rutaceae	33	0.2	2	6.1
Aquifoliaceae	32	0.2	0	0.0
Loranthaceae	32	0.2	6	18.8
Polygonaceae	31	0.2	2	6.5
Amaryllidaceae	30	0.2	12	40.0
Berberidaceae	30	0.2	16	53.3
Hippocrateaceae	30	0.2	0	0.0
Commelinaceae	28	0.2	1	3.6
Nyctaginaceae	27	0.2	2	7.4
Symplocaceae	27	0.2	13	48.1
Cunoniaceae	26	0.2	2	7.7
Loasaceae	26	0.2	13	50.0
Loganiaceae	26	0.2	0	0.0
Marcgraviaceae	26	0.2	5	19.2
Zingiberaceae	25	0.2	4	16.0
Geraniaceae	24	0.2	8	33.3
Tropaeolaceae	23	0.2	9	39.1
Actinidiaceae	22	0.1	15	68.2
Juncaceae	22	0.1	1	4.5
Combretaceae	21	0.1	0	0.0
Tiliaceae	21	0.1	0	0.0
Vitaceae	21	0.1	0	0.0
Elaeocarpaceae	20	0.1	1	5.0
Ranunculaceae	20	0.1	1	5.0
Caprifoliaceae	18	0.1	1	5.6
Celastraceae	18	0.1	4	22.2
Costaceae	18	0.1	2	11.1
Sabiaceae	18	0.1	1	5.6
Vittariaceae	18	0.1	2	11.1
Phytolaccaceae	17	0.1	0	0.0
Proteaceae	17	0.1	4	23.5
Rhamnaceae	17	0.1	0	0.0
Theaceae	17	0.1	2	11.8
Aristolochiaceae	16	0.1	0	0.0
Chloranthaceae	16	0.1	1	6.3
Dichapetalaceae	16	0.1	4	25.0
Gleicheniaceae	16	0.1	0	0.0

Iridaceae	16	0.1	1	6.3
Lythraceae	16	0.1	0	0.0
Caricaceae	15	0.1	4	26.7
Schizaeaceae	15	0.1	0	0.0
Simaroubaceae	15	0.1	0	0.0
Buddlejaceae	14	0.1	5	35.7
Cypripediaceae	14	0.1	3	21.4
Dilleniaceae	14	0.1	0	0.0
Anacardiaceae	13	0.1	1	7.7
Brunelliaceae	13	0.1	5	38.5
Erythroxylaceae	13	0.1	1	7.7
Olacaceae	13	0.1	2	15.4
Theophrastaceae	13	0.1	5	38.5
Alismataceae	12	0.1	1	8.3
Burmanniaceae	12	0.1	1	8.3
Eriocaulaceae	12	0.1	2	16.7
Lemnaceae	12	0.1	1	8.3
Portulacaceae	12	0.1	2	16.7
Quinaceae	12	0.1	0	0.0
Cuscutaceae	11	0.1	4	36.4
Lentibulariaceae	11	0.1	0	0.0
Ochnaceae	11	0.1	1	9.1
Clethraceae	10	0.1	2	20.0
Grossulariaceae	10	0.1	1	10.0
Marattiaceae	10	0.1	0	0.0
Mendonciaceae	10	0.1	0	0.0
Pontederiaceae	10	0.1	0	0.0
Smilacaceae	10	0.1	0	0.0
Thymelaeaceae	10	0.1	5	50.0
Ulmaceae	10	0.1	1	10.0
Connaraceae	9	0.1	1	11.1
Icacinaceae	9	0.1	0	0.0
Vochysiaceae	9	0.1	0	0.0
Balanophoraceae	8	0.1	0	0.0
Ophioglossaceae	8	0.1	0	0.0
Polemoniaceae	8	0.1	2	25.0
Styracaceae	8	0.1	0	0.0
Basellaceae	7	0.0	0	0.0
Davalliaceae	7	0.0	0	0.0
Gunneraceae	7	0.0	1	14.3
Isoetaceae	7	0.0	1	14.3
Molluginaceae	7	0.0	4	57.1
Podocarpaceae	7	0.0	0	0.0

Plantaginaceae	7	0.0	1	14.3
Potamogetonaceae	7	0.0	0	0.0
Agavaceae	6	0.0	0	0.0
Caryocaraceae	6	0.0	0	0.0
Hydrangeaceae	6	0.0	0	0.0
Magnoliaceae	6	0.0	2	33.3
Nymphaeaceae	6	0.0	0	0.0
Primulaceae	6	0.0	0	0.0
Salviniaceae	6	0.0	0	0.0
Bixaceae	5	0.0	0	0.0
Chenopodiaceae	5	0.0	0	0.0
Cannaceae	5	0.0	0	0.0
Ebenaceae	5	0.0	0	0.0
Humiriaceae	5	0.0	0	0.0
Lacistemataceae	5	0.0	0	0.0
Turneraceae	5	0.0	1	20.0
Anthericaceae	4	0.0	1	25.0
Crassulaceae	4	0.0	0	0.0
Equisetaceae	4	0.0	0	0.0
Hydrocharitaceae	4	0.0	0	0.0
Hernandiaceae	4	0.0	1	25.0
Hydrophyllaceae	4	0.0	0	0.0
Linaceae	4	0.0	2	50.0
Najadaceae	4	0.0	0	0.0
Zamiaceae	4	0.0	1	25.0
Aizoaceae	3	0.0	0	0.0
Buxaceae	3	0.0	1	33.3
Columelliaceae	3	0.0	0	0.0
Limnocharitaceae	3	0.0	0	0.0
Marsileaceae	3	0.0	0	0.0
Oleaceae	3	0.0	1	33.3
Rhizophoraceae	3	0.0	0	0.0
Rapateaceae	3	0.0	0	0.0
Salicaceae	3	0.0	0	0.0
Santalaceae	3	0.0	1	33.3
Staphyleaceae	3	0.0	0	0.0
Xyridaceae	3	0.0	1	33.3
Achatocarpaceae	2	0.0	0	0.0
Cabombaceae	2	0.0	0	0.0
Callitrichaceae	2	0.0	0	0.0
Ceratophyllaceae	2	0.0	0	0.0
Cupressaceae	2	0.0	0	0.0
Dicksoniaceae	2	0.0	0	0.0

Elatinaceae	2	0.0	0	0.0
Ephedraceae	2	0.0	0	0.0
Eremolepidaceae	2	0.0	0	0.0
Haloragaceae	2	0.0	0	0.0
Hypoxidaceae	2	0.0	0	0.0
Hugoniaceae	2	0.0	0	0.0
Mayacaceae	2	0.0	0	0.0
Melanthiaceae	2	0.0	0	0.0
Myricaceae	2	0.0	0	0.0
Opiliaceae	2	0.0	0	0.0
Osmundaceae	2	0.0	0	0.0
Papaveraceae	2	0.0	0	0.0
Plagiogyriaceae	2	0.0	0	0.0
Plumbaginaceae	2	0.0	0	0.0
Saxifragaceae	2	0.0	1	50.0
Typhaceae	2	0.0	0	0.0
Zygophyllaceae	2	0.0	1	50.0
Alliaceae	1	0.0	0	0.0
Aspodelaceae	1	0.0	0	0.0
Bataceae	1	0.0	0	0.0
Betulaceae	1	0.0	0	0.0
Coriariaceae	1	0.0	0	0.0
Cornaceae	1	0.0	0	0.0
Cyrrillaceae	1	0.0	0	0.0
Dracaenaceae	1	0.0	0	0.0
Droseraceae	1	0.0	0	0.0
Gnetaceae	1	0.0	0	0.0
Goodeniaceae	1	0.0	0	0.0
Haemodoraceae	1	0.0	0	0.0
Hippocastanaceae	1	0.0	0	0.0
Juglandaceae	1	0.0	0	0.0
Juncaginaceae	1	0.0	0	0.0
Krameriaceae	1	0.0	0	0.0
Lophosoriaceae	1	0.0	0	0.0
Loxsomataceae	1	0.0	0	0.0
Menyanthaceae	1	0.0	0	0.0
Metaxyaceae	1	0.0	0	0.0
Nolanaceae	1	0.0	1	100.0
Podostemaceae	1	0.0	0	0.0
Pellicieraceae	1	0.0	0	0.0
Phormiaceae	1	0.0	0	0.0
Psilotaceae	1	0.0	0	0.0
Rafflesiaceae	1	0.0	0	0.0

Strelitziaceae	1	0.0	0	0.0
Tovariaceae	1	0.0	0	0.0
Triuridaceae	1	0.0	0	0.0
Taxodiaceae	1	0.0	0	0.0
Winteraceae	1	0.0	0	0.0
Grand Total	15306	100.0	4173	–

Fuente: León-Yáñez, 1995

Anexo 2: Muestras Herbario Nacional del Ecuador (referencia para la identificación de la especie *F. pilaloensis*)

1. *F. pilaloensis*

Número de Colección: 11298.

Determinado: P. Berry 1989.

Provincia: Cotopaxi (Carretera Latacunga- Zumbahua- Pilaló).

Colector: Walter Palacios y David Neill 1988.

2. *F. pilaloensis*

Número de Colección: 70444.

Determinado: D, Green, 1993.

Provincia: Cotopaxi (Km 81 vía Pujilí- Pilaló).

Colector: D, Green, y Efrain Freire 1993.

Muestras Missouri Botanical Garden (referencia para la identificación de la especie *F. pilaloensis*)

1. *F. pilaloensis*

Familia: Onagraceae.

Número de Colección: 1479.

Determinado: Linda K. Albert de Escobar & E. Escobar U.

Provincia: Cotopaxi (Km 7 cerca de Pilaló).

Colector: Linda K. Albert de Escobar & E. Escobar U.

2. *F. pilaloensis*

Familia: Onagraceae.

Número de Colección: 1547.

Determinado: P. Berry, 1981.

Coordenadas: 00°57'S 079°02'W (-0.9500000, -79.0333300).

Elevación: 2400 m.

Provincia: Cotopaxi (Pilaló).

Colector: L.B. Holm-Nielsen & S. Jeppesen.

3. *F. pilaloensis*

Familia: Onagraceae.

Número de Colección: 1479.

Elevación: 2500-3500 m.

Descripción: Flores de color rosa. Cerca de Pilaló, carretera Quevedo- Latacunga. Es una epífita, se encuentra en el bosque nublado.

Provincia: Cotopaxi (Pilaló).

Colector: Escobar.

4. *F. pilaloensis*

Familia: Onagraceae.

Número de Colección: 1021.

Elevación: 2695 m.

Descripción: Subarbusto de 0,75m de alto.

Provincia: Cotopaxi (a 81 km en la carretera Pujilì- Pilalò).

Colector: Green.

5. *F. pilaloensis*

Familia: Onagraceae.

Número de Colección: 2527.

Determinado: P. Berry, 1989.

Coordenadas: 00°58'S 078°53'W (-0.9666600, -78.8833300).

Elevación: 2800 - 3100 m.

Descripción: Planta herbácea en lugar muy húmedo. Flores rosadas con los lóbulos verdosos.

Localidad: Carretera Latacunga-Zumbahua-Pilaló. Bosque húmedo Montano. Bosque primario sobre suelos de origen volcánico

Provincia: Cotopaxi (Pilaló).

Colector: Walter A. Palacios, David A. Neill & Carlos E. Cerón.

6. *F. pilaloensis*

Familia: Onagraceae.

Número de Colección: 10144.

Determinado: P. Silverstone- Sopkin, 2003.

Coordenadas: 00°49'23"S 079°02'02"W (-0.8230500, -79.0338800).

Elevación: 2990 m.

Localidad: Reserva Ecológica Los Ilinizas, Sector Tilipulo, Cordillera Tilinche, Cordillera Occidental, vertiente occidental, bosque nublado primario y secundario perturbado dominado por Weinmannia.

Provincia: Cotopaxi (Pujilí).

Colector: Silverstone.

7. *F. pilaloensis*

Familia: Onagraceae.

Número de Colección: 2548.

Determinado: Paul E. Berry.

Elevación: 3150 m.

Descripción: Epífita con tallos leñosos. Las flores, tallos y brotes pubescentes. El tubo floral tubo de color rosa, sépalo puntas verdes. Los frutos en ángulo recto, púrpura.

Localidad: a 10km cerca de Pilalò, en la carretera Quevedo-Latacunga.

Provincia: Cotopaxi (Pujilí).

Colector: Paul E. Berry.

8. *F. pilaloensis*

Familia: Onagraceae.

Número de Colección: 24634.

Determinado: Berry, P. (MO), 1992.

Elevación: 3150 m.

Coordenadas: 00°58'S 078°58'W (-0.9666600, -78.9666600)

Descripción: Epífitas. Tubo de la flor de color rosa con venas más oscuras, de color amarillo parte libre. Flor blanca por dentro. Estambres verdosos. Las anteras amarillo. Estilo de color rosa, estigma de color verde.

Localidad: Carretera Pilalò- Zumbahua, a 10km cerca de Pilalò

Provincia: Cotopaxi.

Colector: Paul E. Berry.

Gráfico 1: *Fuchsia pilaloensis*, P. Berry (1989)



Fuente: Palacios, 1988

Anexo 3: Formulación de Medio MS para 1 litro

Solución stock	Componentes	Concentración Gramos / litro	Cantidad para preparar 1 litro	
Stock I	NH ₄ NO ₃ KNO ₃	1,650 g 1,9g	20 ml	
Stock II	Mg SO ₄ . 7H ₂ O Mn SO ₄ . H ₂ O Zn SO ₄ . 7H ₂ O Cu SO ₄ . 5H ₂ O	0,181g 0,017g 8,6g 0.0025g	10 ml	
Stock III	Ca Cl ₂ . 2H ₂ O K I Co Cl ₂ . 6H ₂ O	0,332g 0.083g 0.0025g	10 ml	
Stock IV	K H ₂ PO ₄ H ₃ BO ₃ Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	1,7g 0.62g 0.025g	10 ml	
Stock V	Fe SO ₄ . 7H ₂ O Na ₂ EDTA	2.784g 3.724g	10 ml	
Vitaminas	Ácido nicotínico	0.05	5 ml	
	Piridoxina	0.05	5 ml	
	Tiamina	0.1	1 ml	
	Glicina	0.2	20 ml	
	Mioinositol	2.5	10 ml	
Fuente de C		Sacarosa	30 g	
Gelatinizador		Agar (Phytigel)	8 g	
Ácido clorhídrico			1%	
Hidróxido de sodio			1%	

Fuente: Universidad de la República de Uruguay, 2008

Anexo 4: Formulación de Medio Woody Plants Medium (WPM) establecido como T4

Formulación de Sal Inorgánica			
Macronutrientes (g/l)		Micronutrientes (g/l)	
Nitrato de Amonio	400 mg/l	Ácido Bórico	6,2 mg/l
Cloruro de Calcio	96 mg/l	Na ₂ EDTA*2H ₂ O	37,2 mg/l
Sulfato de Magnesio	370 mg/l	Sulfato Cúprico	0,25 mg/l
Sulfato de Potasio	170 mg/l	Sulfato Ferroso	27,8 mg/l
Nitrato de Calcio	556 mg/l	Sulfato de Magnesio	8,6 mg/l
		Sulfato de Zinc	8,6 mg/l
		Molibdanato de Sodio	0,25 mg/l
Compuestos Orgánicos			
Mioinositol	100mg/l	Acido Nicotínico	0,5mg/l
Piridoxina*HCL	0,5mg/l	Tiamina*HCl	1,0 mg/l
Glicina	2,0 mg/l	Agar	6,0 g/l
Sucrosa	20 /l		

Fuente: Trujillo, 2009

Anexo 5: Formulación de Medio de Kundson, Knudson “C” y Phytamax

Componente mg/l	Knudson C modified (Medio 1) T1	Knudson C orchid medium, morel modification (Medio 2) T2	Phytamax (Medio 3) T3
Nitrato de Amonio		500,00	825,00
Sulfato de Amonio	500,00	500,00	
Ácido Bórico	0,06		3,10
Cloruro de Calcio Anhidro			166,00
Nitrato de Calcio	694,40	347,20	
Cloruro de Cobalto. 6H ₂ O			0,0125
Sulfato Cúprico. 5H ₂ O	0,0624	0,0125	
Na ₂ -EDTA			37,24
Sulfato Ferroso.7H ₂ O	25,00	25,00	27,85
Sulfato de Magnesio	122,125	122,125	90,35
Sulfato de Manganeso.H ₂ O	5,682	5,682	8,45
Trióxido de Molibdeno	0,016		
Molibdanato de Sodio			0,125
Cloruro de Potasio		250,00	
Ioduro de Potasio			0,415
Nitrato de Potasio			950,00
Fosfato de Potasio	250,00	250,00	85,00
Sulfato de Zinc. 7H ₂ O	0,331		5,30
6-Benzilaminopurina			2,00
Myo-Inositol			100,00
Ácido Naftalenacético			0,50
Acido Nicotínico			0,50
Peptona	2000,00	2000,00	2000,00
Piridoxina.HCl			0,50
Sucrosa	20,00	20,00	20,00
Tiamina.HCl			10,00

Fuente: Sigma, 2009

**Anexo 6: Análisis de Suelo de la zona de
Recolección**

INIAP
LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA"

NOMBRE DEL PROPIETARIO: MARIELA VALDIVIESO
 NOMBRE DEL REMITENTE:
 NOMBRE DE LA GRANJA:
 LOCALIZACIÓN: PIALÓ PUJILÍ COTOPAXI
 PARROQUIA CANTÓN PROVINCIA

FECHA DE MUESTREO : 15/01/2012
 FECHA INGRESO AL LABORATORIO: 05/02/2012
 FECHA DE SALIDA DE RESULTADOS:

DETERMINACIÓN DE SALINIDAD EN SUELO

No. de Lab.	IDENTIFICACIÓN	C.E. mmoh/cm	pH	CATIONES milieq./litro					ANIONES milieq./litro				
				Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Σ cation	CO ₃ ⁻²	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ⁻²	Cl ⁻	Σ anión
90445	MI FUCSIA PILALOENSES	0.15	6.67	0.56	0.30	0.67	0.15	1.68	0	3.1	0.86	1.2	5.16

C.E.: Conductividad Eléctrica

TODAS LAS DETERMINACIONES SON REALIZADAS EN EXTRACTO DE SATURACION


RESPONSABLE DE LABORATORIO


LABORATORISTA