# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
# SEDE QUITO

**CARRERA:**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**DESARROLLO DE PROTOCOLOS PARA LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE CHUNCHO (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke*) Y* QUISHUAR *(Buddleja incana* Ruíz&Pav*)* MEDIANTE LA TÉCNICA DE ORGANOGÉNESIS.**

**AUTORA:**

**JOHANA PAOLA JIMÉNEZ ENRIQUEZ**

**DIRECTORA:**

**LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN**

**Quito, marzo del 2015**

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaro que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Quito, marzo del 2015

_____

Johana Paola Jiménez Enriquez
C.I:1723177513

## DEDICATORIA

Agradezco a Dios por haberme otorgado una familia maravillosa, quienes han creído en mí siempre, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio.

A mi padre, Oscar Jiménez (+) quien a pesar de haberlo perdido, ha estado siempre cuidándome y guiándome desde el cielo.

A mi madre Nancy Enriquez quien ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores y que a pesar de todo me ha brindado su tiempo para realizarme profesionalmente.

A mi hermano Robert que siempre ha estado junto a mi brindándome su apoyo, muchas veces poniéndose en el papel de padre.

A toda mi familia ya que ustedes han fomentado en mí el deseo de superación y de triunfo en la vida, lo que ha contribuido a la consecución de este triunfo. Espero contar siempre con su valioso e incondicional apoyo.

A todos los amigos que conocí en este proceso e hicieron inolvidable cada momento: Mami Gio, Dianita, Bachita y Santi (Chiquito) sin ustedes esto no hubiera sido increíble.

Finalmente a mis amigas de toda la vida Angie, Gaby, Thaly, Yami y Katic quienes con su lealtad y apoyo estuvieron en los momentos más difíciles de mi vida, gracias por estar ahí siempre.

## AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), especialmente al Programa Nacional de Forestería por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo, Ing. Raúl Ramos gracias por todas las oportunidades de crecimiento profesional que me ha otorgado. Roy y Franklin gracias por los consejos y enseñanzas. Y en especial agradezco a Paulo Barrera quien con su amistad, sugerencias, trabajo y confianza creó un soporte constante para superar este reto personal, por haberme apoyado incondicionalmente ante todas las circunstancias que se presentaron, mil gracias.

Al Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP por haberme permitido participar en esta experiencia de trabajo e investigación.

A la Universidad Politécnica Salesiana, especialmente a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, a mi Directora, Msc. Laura Huachi por su amistad, tiempo, guía y aportes brindados durante todo el proceso de elaboración de mi trabajo de titulación. A mis profesores Dianita, Wilson, Germania, Rosita, Christian y Santiago quienes con sus consejos y apoyo han contribuido el logro de mis objetivos.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN ..... 1

CAPÍTULO 1: ..... 5

**MARCO TEÓRICO**

1.1 *Cedrelinga catenaeformis* ..... 5

1.1.1. Descripción botánica ..... 5

1.1.2 Clasificación taxonómica ..... 6

1.1.3 Distribución y hábitat ..... 6

1.1.4 Usos ..... 7

1.1.5 Propagación tradicional de *Cedrelinga catenaeformis* ..... 8

1.2 *Buddleja incana* ..... 8

1.2.1 Descripción botánica ..... 8

1.2.2 Clasificación taxonómica ..... 9

1.2.3 Distribución y hábitat ..... 9

1.2.4 Usos y propiedades ..... 10

1.2.5 Propagación tradicional de *Buddleja incana* ..... 11

1.3 Biotecnología Forestal ..... 11

1.4 Micropropagación de Tejidos Vegetales ..... 12

1.4.1 Organogénesis ..... 12

1.4.2 Embriogénesis somática ..... 21

1.4.3 Fusión de protoplastos ..... 22

1.5 Problemas en la micropropagación de tejidos vegetales ..... 22

CAPÍTULO 2: ..... 25

**MATERIALES Y MÉTODOS**

2.1 Localización del estudio ..... 25

2.2 Condiciones experimentales de laboratorio ..... 25

2.3 Material vegetal ..... 26

2.4 Materiales ..... 27

2.4.1 Materiales de laboratorio ..... 27

2.4.2 Equipos ..... 28

2.4.3 Reactivos ..... 28

2.5 Diseño experimental ..... 29

2.5.1 ETAPA I: Introducción y establecimiento *in vitro* de *C. catenaeformis* y *B. incana.* ..... 29

2.5.5 ETAPA II: Multiplicación *in vitro* de *C. catenaeformis* y *B. incana* .. 53

CAPÍTULO 3: ..... 64

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

CONCLUSIONES ..... 97

LISTA DE REFERENCIAS…..…….....99

ANEXOS……..109

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de chuncho (*Cedrelinga catenaeformis*) 6
Tabla 2. Taxonomía de quishuar (*Buddleja incana*). 9
Tabla 3. Composición y preparación de medios de cultivo. 18
Tabla 4. Condiciones del sitio experimental 25
Tabla 5. Tratamientos de desinfección e introducción de semillas de *Cedrelinga catenaeformis* en Iniap, Cutuglagua-Pichincha, 2014. 30
Tabla 6. Adeva para el establecimiento de un protocolo de *Cedrelinga catenaeformis* Iniap, Cutuglahua-Pichincha, 2014. 31
Tabla 7. Tratamientos de desinfección e introducción de brotes de *Cedrelinga catenaeformis* en Iniap, Cutuglahua-Pichincha, 2014. 36
Tabla 8. Adeva para el establecimiento de un protocolo de C*edrelinga catenaeformis* Iniap, Cutuglahua-Pichincha, 2014. 37
Tabla 9. Tratamientos de desinfección e introducción de semillas de *Buddleja incana* en Iniap, Cutuglahua-Pichincha, 2014. 42
Tabla 10. Adeva para el establecimiento de un protocolo de *Buddleja incana* Iniap, Cutuglahua-Pichincha, 2014. 43
Tabla 11. Tratamientos de desinfección e introducción de brotes de *Buddleja incana* en Iniap, Cutuglahua-Pichincha, 2014. 48
Tabla 12. Adeva para el establecimiento de un protocolo de *Buddleja incana* Iniap, Cutuglahua-Pichincha, 2014. 49
Tabla 13. Tratamientos para la multiplicación *in vitro* de vitroplantas de *C. catenaeformis* Cutuglagua-Pichincha, 2014. 54
Tabla 14. Adeva para el establecimiento de un protocolo de *C. catenaeformis* iniap, Cutuglahua-Pichincha, 2014. 55
Tabla 15. Composición medios de cultivo para multiplicación de *C. catenaeformis.* 57
Tabla 16. Tratamientos para la multiplicación *in vitro* de vitroplantas de *Buddleja incana* Cutuglahua-Pichincha, 2014. 59
Tabla 17. Adeva para el establecimiento de un protocolo de *Buddleja incana* Iniap, Cutuglahua-Pichincha, 2014. 60
Tabla 18. Composición medios de cultivo para multiplicación de *Buddleja incana.* 62
Tabla 19. Porcentaje de la variable contaminación a los 30 días. 64
Tabla 20. Porcentaje de la variable oxidación a los 30 días. 65

Tabla 21. Porcentaje de germinación de semillas de *C. catenaeformis* a los 30 días. 67
Tabla 22. Porcentaje de contaminación en *C. catenaeformis* a los 30 días. 68
Tabla 23. Porcentaje de la variable oxidación a los 30 días. 69
Tabla 24. Porcentaje de brotación en *C. catenaeformis* a los 30 días. 70
Tabla 25. Porcentaje de contaminación en *B. incana* a los 30 días. 73
Tabla 26. Porcentaje de la variable oxidación a los 30 días. 74
Tabla 27. Porcentaje de germinación semillas de *B. incana* a los 20, 30 y 45 días. 75
Tabla 28. Adeva para la variable longitud de brote evaluada a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana.* 76
Tabla 29. Promedios y pruebas de significación para la variable protocolos evaluada a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana.* 77
Tabla 30. Adeva para la variable longitud de brote evaluada a los 45 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana*. 78
Tabla 31. Promedios y pruebas de significación para el factor protocolos evaluado a los 45 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana.* 78
Tabla 32. Porcentaje de contaminación en *B. incana* a los 30 días. 79
Tabla 33. Porcentaje de la variable oxidación a los 30 días. 80
Tabla 34. Porcentaje de brotación a los 30 días. 81
Tabla 35. Adeva para la variable número de nudos a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana* 82
Tabla 36. Promedios y pruebas de significación para la variable protocolos evaluada a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana* 83
Tabla 37. Promedios y pruebas para variable número de nudos evaluada a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana* 84
Tabla 38. Adeva para la variable longitud de brotes a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana* 84
Tabla 39. Promedios y pruebas para la variable longitud de brotes evaluada a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana.* 85
Tabla 40. Adeva para la variable altura de brotes a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana* 86
Tabla 41. Promedios y pruebas para la variable altura de brotes evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.* 87
Tabla 42. Promedios y pruebas para la altura de brotes evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.* 87

Tabla 43. Promedios y pruebas para la variable altura de brotes evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana*. 88
Tabla 44. Promedios y pruebas para la variable altura de brotes evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.* 89
Tabla 45. Adeva para la variable número de nudos a los 30 días para la etapa de multiplicación de *Buddleja incana* 90
Tabla 46. Promedios y pruebas para la variable número de nudos evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.* 91
Tabla 47. Promedios y pruebas para la variable número de nudos evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.* 91
Tabla 48. Promedios y pruebas para la variable número de nudos evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.* 91
Tabla 49. Índice de multiplicación evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.* 93
Tabla 50. Adeva para la variable longitud de raíces a los 30 días en la etapa de multiplicación de *B. incana* 94
Tabla 51. Promedios y pruebas para la variable longitud de raíces evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana*. 95
Tabla 52. Promedios y pruebas para la variable longitud de raíces evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.* 95
Tabla 53. Promedios y pruebas para la variable longitud de raíces evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.* 95
Tabla 54. Promedios y pruebas para la variable longitud de raíces evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.* 96

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Probabilidad de ocurrencia de *Cedrelinga catenaeformis*. 7
Figura 2. La distribución geográfica de *Buddleja incana* en la microcuenca del río Chimborazo. 10
Figura 3.A) Plantas de *C. catenaeformis* mantenidas en invernadero del Denaref. B) plantas de *B. incana* en invernadero del programa nacional de biotecnología del Iniap. C) semillas de *C. catenaeformis*. D) semillas de *B. incana.* 26
Figura 4. A) Lavado con agua y detergente. B) semillas en povidin solución 1 %. C) semillas en solución de fungicidas. D) semillas en solución de hipoclorito de sodio. E) enjuagues con agua estéril. F) siembra en MS y Woody. 35
Figura 5. Desinfección de brotes. A) lavado con agua y detergente en campo. B) lavado con agua y detergente en laboratorio. C) brotes en povidin solución 1 % D) brotes en solución de fungicidas E) brotes en solución de hipoclorito de sodio. F) siembra en medios MS y Woody 41
Figura 6. Desinfección de semillas. A) semillas en povidin solución 1 % B) semillas en solución de fungicidas C) semillas en solución de hipoclorito de sodio. 46
Figura 7. Desinfección de brotes. A) lavado con agua y detergente B) brotes en povidin solución 1 % con ácido ascórbico C) brotes en solución de fungicidas D) brotes en solución de hipoclorito de sodio E) brotes en solución de carbón activado F) siembra en medios MS y Woody 53
Figura 8. A) Material vegetal de *Buddleja incana*. B) corte de los explantes. C y D) evaluación altura de brotes, número de nudos y longitud de raíces. 63
Figura 9. Relación precipitación, floración y fructificación de *C. catenaeformis.* 72

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los tratamientos T1 y T2 en semillas de *C. catenaeformis* 109
Anexo 2. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los tratamientos T5 y T6 en semillas de *C. catenaeformis* 110
Anexo 3. Condiciones fitosanitarias de semillas de *C. catenaeformis.* 111
Anexo 4. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los tratamientos T1 y T2 en brotes de *C. catenaeformis.* 112
Anexo 5. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los tratamientos T3 y T4 en brotes de *c. catenaeformis* 113
Anexo 6. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en el tratamiento T5 en brotes de *C. catenaeformis.* 114
Anexo 7. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en el tratamiento T2 en semillas de *B. incana.* 115
Anexo 8. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los tratamientos T5 y T6 en semillas de *B. incana.* 116
Anexo 9. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los tratamientos T1 y T2 en brotes de *B. incana*. 117
Anexo 10. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los tratamientos T3 y T4 en brotes de *B. incana.* 118
Anexo 11. Fotos de contaminación en semillas de *C. catenaeformis.* 119
Anexo 12. Fotos de contaminación en brotes de *C. catenaeformis.* 120
Anexo 13. Fotos de contaminación en semillas de *B. incana.* 121
Anexo 14. Fotos de contaminación en brotes de *B. incana.* 122
Anexo 15. Fotos de germinación de *B. incana* a los 30 días. 123
Anexo 16. Fotos de brotación de *B. incana* a los 30 días. 124
Anexo 17. Fotos de multiplicación de *B. incana* a los 30 días. 125
Anexo 18. Glosario 126

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar protocolos para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Cedrelinga catenaeformis* y *Buddleja incana*, para el efecto se realizaron cultivos *in vitro* partiendo de semillas y brotes de plantas madre.

En la etapa de desinfección y establecimiento de *C. catenaeformis* los resultados indican que las semillas sometidas a concentraciones de NaOCl 2 % (20 min) y los brotes sometidos a concentraciones de NaOCl 1 % (10 min) presentan menor porcentaje de contaminación. Para *B. incana* los resultados indican que las semillas sometidas a concentraciones de NaOCl 3 % (10 min) y los brotes sometidos a concentraciones de NaOCl 1 % (10 min) no presentan contaminación.

Para las dos especies los medios de cultivo MS y WPM evidencian un mayor índice de supervivencia.

En la fase de multiplicación de *B. incana* en el medio de cultivo MS sin adición de biorreguladores se observó una mayor longitud de brote (1,95 ± 0,05 cm) y mayor número de nudos (1,94 ± 0,04 nudos). Sin embargo, la variable número de brotes con la adición de 0,5 ppm de BAP presentó mayor número de los mismos (2,47 ± 0,04 brotes).

Basados en los resultados obtenidos, se sugiere que los protocolos de desinfección tanto para *C. catenaeformis* como para *B. incana* son efectivos para el establecimiento *in vitro* mientras que los medios de cultivo y biorreguladores evaluados son efectivos para la fase de multiplicación *in vitro* de *B. incana*.

## ABSTRACT

The aim of this study is to develop *in vitro* establishment and multiplication protocols of *Cedrelinga catenaeformis* and *Buddleja incana*, for this purpose *in vitro* seeds and axillary buds of nursery plants were cultured. In disinfection and establishment stage of *C. catenaeformis*, lower levels of contamination were found in seeds subjected to concentrations of NaOCl 2 % (20 min) and axillary buds subjected to concentrations NaOCl 1 % (10 min). In the case of *B. incana* there were no contamination for seeds subjected to concentrations of NaOCl 3 % (10 min) and axillary buds subjected to concentrations of NaOCl 1 % (10 min). Higher rates of survival were found in MS and WPM culture medium for the two species.

In *B. incana* multiplication phase the culture medium (MS) without hormones showed higher length of outbreak (1,95 ± 0.05 cm) and larger number of knots (1,94 ± 0.04 knots). However, with the addition of 0.5 ppm of BAP showed higher number of shoots/ outbreak (2.47 ± 0.04 axillary buds).

Based on the results obtained, it may suggest that disinfection protocols for *C. catenaeformis* and *B. incana* are effective to *in vitro* establishment while the culture medium and hormones evaluated are effective for *in vitro* multiplication of *B. incana.*

# INTRODUCCIÓN

## Formulación del problema

Sánchez (2012), menciona que el Ecuador es considerado un país con vocación forestal y sin embargo este sector aporta poco a la economía de la nación, existen alrededor de 7 millones de hectáreas de bosques con potencial de manejo forestal menos del 10 % reúnen condiciones económicas para ser sometidas a un manejo forestal sustentable.

> Los recursos genéticos forestales (RGF's), se están perdiendo a una velocidad alarmante debido un aprovechamiento indiscriminado y a la falta de incentivos para su conservación y uso sostenible. El conocimiento de los RGF's aún es precario e insuficiente, son escasos los estudios y las instituciones que realizan actividades para su protección, y la disponibilidad actual de información específica sobre la situación, tendencias y recuperación de los RGF's es deficiente (Ministerio del Ambiente-MAE, 2005, pág. 30).

Según Grijalva (2010), el mal aprovechamiento del recurso forestal ha puesto en peligro varias especies nativas de los bosques del país entre las que se señalan: yagual (*Polylepis incana),* quishuar (*Buddleja incana),* pumamaqui (*Oreopanax* sp.), caoba (*Swietenia macrophylla),* bálsamo (*Myroxilon balsamum),* chuncho (*Cedrelinga catenaeformis),* laurel (*Cordia alliodora),* copal (*Trattinnickia glaziovii),* entre otras.

La propagación a través de los métodos convencionales establecidos para quishuar y chuncho presenta varios problemas. "En el caso de quishuar (*Buddleja incana*) la multiplicación en vivero requiere de 5 meses, lo cual se traduce en mayores gastos de producción y menos producción de plantas por año" (Gárate, 2010, pág. 50).

Gárate (2010), menciona que por la falta de oferta de plantas de quishuar en viveros establecidos, no se puede obtener una cantidad suficiente de material vegetativo

necesario para la forestación, reforestación en áreas degradadas de los páramos y cuencas hidrográficas. Según Vallejo (1988), a nivel de laboratorio, la propagación de esta especie también presenta algunos problemas, por ejemplo, el estudio reportado señala que la longitud de brotes obtenidos fue de 8,6 mm, número de nudos por planta 1,5 y no existen datos reportados de porcentaje de contaminación. Sin embargo Cárdenas (2011), manifiesta que la contaminación es la principal limitante en el desarrollo *in vitro* de esta especie forestal, pues la tasa de supervivencia no supera el 54 %, debido principalmente a afecciones por hongos y bacterias.

> En chuncho (*Cedrelinga catenaeformis*) existe una rápida pérdida de viabilidad de las semillas, ya que a medida que aumenta el período de almacenamiento, de uno a tres meses, se incrementa el porcentaje de semillas podridas y, atacadas por insectos. Otro punto de gran importancia es la irregularidad de las fases fenológicas de floración y fructificación hacen más difícil la planificación de programas de recolección de semilla y por ende la reforestación (Aróstegui, 1992, pág. 45).

"Otro aspecto a considerar es que la intensiva y extractiva explotación ha reducido las poblaciones y agotado gran parte de las fuentes semilleras" (Herrera, 2010, pág. 5). Cabe mencionar que para esta especie no se ha reportado ningún estudio hasta la fecha respecto al cultivo *in vitro*.

Para la presente investigación la técnica de cultivo *in vitro*, seleccionada fue la micropropagación por vía organogénica, "la misma que conlleva a la producción de plantas a través de la formación de brotes que deben ser enraizados en un proceso de varias etapas" (Ortiz, 2007, pág. 3).

> La propagación vegetativa como la organogénesis asegura la conservación de un germoplasma valioso; asimismo, nos permite obtener descendencias homogéneas desde el punto de vista genético (clones), ya que permite captar y transferir al nuevo árbol todo el potencial genético del árbol donador. Además, se evita los períodos

> juveniles prolongados y se acorta la madurez reproductiva; también, es posible eliminar la dependencia del uso de semillas (Abdelnour, 2002, pág. 148).

Finalmente, González C (1998), menciona que la propagación vegetativa es importante en el mejoramiento genético, porque permite multiplicar genotipos superiores y aumentar la ganancia genética en períodos muy cortos.

## Justificación

Según Cárdenas (2011), las especies forestales nativas poseen un importante valor ambiental, científico, cultural, social y económico; tanto para la conservación de los páramos, ecosistemas y cuencas hidrográficas como para el uso de bienes; sin embargo, las malas prácticas de aprovechamiento han puesto en riesgo a este recurso de perderse en un horizonte temporal no muy lejano.

Los problemas anteriormente mencionados de *Buddleja incana* y *Cedrelinga catenaeformis* conllevan a que exista una demanda insatisfecha de plantas para las iniciativas de reforestación en el país; por lo tanto, es imprescindible generar estrategias que permitan la propagación y conservación de estas especies.

El INIAP a través del Programa Nacional de Forestería ejecuta el proyecto de investigación "Conservación y uso sostenible de Recursos Genéticos Forestales en áreas críticas de bosques húmedos y secos de los Andes y Amazonía" donde uno de sus objetivos es emplear e innovar el uso de herramientas biotecnológicas que permitan la micropropagación masiva de especies forestales nativas prioritarias para la Sierra y Amazonía del Ecuador. Con el fin de desarrollar protocolos mediante la técnica de organogénesis para la propagación *in vitro* de las dos especies forestales.

## Objetivos

### Objetivo general

Desarrollar protocolos para la propagación *in vitro* de chuncho (*Cedrelinga catenaeformis) y* quishuar *(Buddleja incana),* mediante la técnica de organogénesis.

### Objetivos Específicos

- Identificar un protocolo para la desinfección y establecimiento *in vitro* de *C. catenaeformis y B. incana.*

- Determinar un medio de cultivo eficiente para la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *C. catenaeformis* y *B. incana.*

## Hipótesis

- Hipótesis Alternativa (Ha)

*Cedrelinga catenaeformis y Buddleja incana* responden a la micropropagación bajo la técnica convencional de organogénesis.

- Hipótesis Nula (Ho)

*Cedrelinga catenaeformis y Buddleja incana* no responden a la micropropagación bajo la técnica convencional de organogénesis.

# CAPÍTULO 1

# MARCO TEÓRICO

## 1.1 *Cedrelinga catenaeformis*

### 1.1.1 Descripción botánica

Campos (2009), menciona que *Cedrelinga catenaeformis* es un árbol de 0,5-2,0 m de diámetro y 20-40 m de altura total, con fuste cilíndrico, la ramificación desde el segundo o tercer tercio, la base del fuste recta. Corteza externa agrietada a fisurada, color marrón pardo a rojizo, con placas de ritidoma de unos 3-5 x 8-13 cm. Corteza interna homogénea, color crema a rosado blanquecino, sin secreciones.

> Hojas compuestas bipinnadas, alternas y dispuestas en espiral, de unos 30-40 cm de longitud, el peciolo de unos 6-30 cm de longitud, las hojas usualmente con 4 pinas, las zonas de articulación de las pinas con una glándula de unos 2-5 mm de diámetro, las láminas foliares ovadas, asimétricas, de unos 4-15 cm de longitud y 2-9 cm de ancho, enteras, el ápice acuminado, la base aguda e inequilátera, la nervación pinnada con 5-7 pares de nervios secundarios, los nervios terciarios muy paralelos y transversales al nervio central, las hojas glabras (Ministerio del Ambiente, 2011, pág. 52).

"Inflorescencias en panículas de 12-30 cm de longitud conteniendo numerosas cabezuelas agrupadas en manojos, las cabezuelas de 2,5-3,5 cm de longitud con pedúnculos de 1-2 cm de longitud" (González G. , 2009, pág. 65).

Campos (2009), menciona que las flores son pequeñas, hermafroditas, de unos 1-1,5 cm de longitud, actinomorfas, con cáliz y corola presentes, el cáliz pequeño, de 1-2 mm de longitud, la corola blanquecina, de 4-5 mm de longitud, tubular, con 5 dientes; androceo con muy numerosos estambres de 1-1,5 mm de longitud, el pistilo único con un estilo largo y estigma obsoleto. La floración mayormente se establece a fines de la estación seca, entre Noviembre-Diciembre. Frutos legumbres muy largas y aplanadas, de 30-40 cm de longitud y 2-3 cm de ancho, con 6-15 semillas, la

legumbre estrechada entre las semillas y revirada helicoidalmente. La fructificación se da a inicios de la estación de lluvias, entre Diciembre-Febrero.

Barrera (2013), menciona en el informe técnico del Programa Nacional de Foresteria del INIAP que la producción de semilla no siempre es anual, existen años en que algunos individuos, en ciertas localidades, no producen fruto, en otros años no ha sido posible encontrar semillas. Palomino y Barra (2003), indican que un kg de semilla puede contener entre 1250 a 3000 semillas; pero la viabilidad de la semilla se mantiene por unos pocos días, debido a ello se le considera una especie recalcitrante (párr.2).

### 1.1.2 Clasificación taxonómica

Tabla 1.
Taxonomía de Chuncho (*Cedrelinga catenaeformis*).

| | |
|---|---|
| Reino | Plantae |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Fabales |
| Familia | Fabaceae |
| Género | *Cedrelinga* |
| Especie | *Cedrelinga catenaeformis* |
| Nombre Común | Seique, chuncho, tornillo |

Nota: L. Campos, (2009).

### 1.1.3 Distribución y hábitat

Aróstegui (1992), señala que *Cedrelinga catenaeformis* se distribuye naturalmente en Ecuador, Perú, Colombia y Brasil, en América del Sur. Su distribución altitudinal varía de 120 a 800 msnm, con precipitaciones de 2500 a 3800 mm y temperaturas de 23 a 38 °C. Los nombres comunes son: achapo, cedrorona, seique, chunco, tornillo, huayra caspi, aguano, cedro mayna y parica. Barrera (2014), menciona que el mapa de probabilidad de ocurrencia de *Cedrelinga catenaeformis* para Ecuador contempla las provincias de Sucumbíos, Orellana, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe y parte de la provincia de Esmeraldas (Figura 1). Se encuentra en las formaciones de

bosque húmedo tropical, bosque muy húmedo sub-tropical, bosque húmedo sub-tropical y bosque seco tropical.

Distribución geográfica de chuncho (*Cedrelinga catenaeformis).*

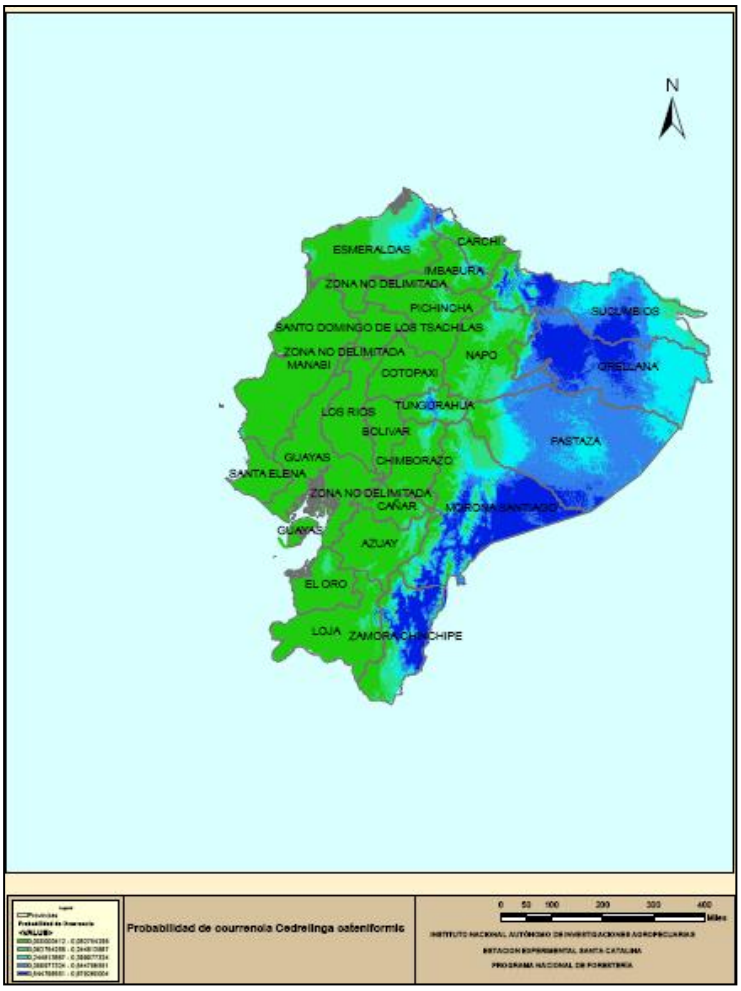



Figura 1. Probabilidad de ocurrencia de *Cedrelinga catenaeformis*.
Fuente: Barrera, (2014).

### 1.1.4 Usos

"La madera es de excelente calidad, semidura y semipesada, textura gruesa y de color blanquecino a rosado. Es muy trabajable y tiene amplio mercado para construcción, carpintería y ebanistería. Se le comercializa muchas veces bajo el nombre de Chuncho" (Trujillo, 2008, pág. 25).

### 1.1.5 Propagación tradicional de *Cedrelinga catenaeformis*

Castillo W (1983), en su estudio con estacas leñosas de *C. catenaeformis* utilizó la hormona AIB (Ácido indolbutírico) logrando un 20 % de enraizamiento bajo condiciones de sombra de 70 % y humedad relativa entre 90 a 100 %. Otros estudios realizados por Leví (1987), al usar estacas leñosas de árboles de 15 a 20 años de edad, utilizando tres estimulantes de enraizamiento (AIB, AIA y ANA) con dosis de 0, 200, 400 y 800 ppm en cada uno, no logró enraizamiento alguno (0 %). Del mismo modo, Schwyzer (1988), obtuvo 0 % de enraizamiento utilizando distintas dimensiones de estacas de raíz y sin la aplicación de hormonas.

Soudre (2010), en su estudio con estacas juveniles utilizó 4000 ppm de AIB obteniendo un 70 % de enraizamiento, con sustrato arena fina a los 40 días. La juvenilidad del material es un factor clave en el aumento considerable del enraizamiento de estacas de *Cedrelinga catenaeformis.*

## 1.2 *Buddleja incana*

### 1.2.1 Descripción botánica

Reynel y Marcelo (2009), mencionan que *Buddleja incana* es un árbol de aproximadamente 15 m de altura, raíces pivotantes engrosadas y follaje tupido. Corteza café, ramas jóvenes del mismo color. Las hojas son de subcoriáceas a coriáceas, verde oscuras encima y blanco amarillentas, oblonga. Inflorescencias de 8-15 cm de largo, paniculadas con 2-3 órdenes de ramas, flores agrupadas en cabezas de 1 cm de diámetro, cada una con 15-40 flores. “Corola amarillenta-anaranjada, campanulada 4,5-6,0 mm de largo incluida los lóbulos ovoides Los frutos son pequeños, ovoides, de unos 5-6 mm de longitud, se abren en dos partes y contienen gran cantidad de semillas diminutas” (Branbyge, 2004, pág. 15).

### 1.2.2 Clasificación taxonómica

Tabla 2.
Taxonomía de Quishuar (*Buddleja incana*).

| | |
|---|---|
| Reino | Plantae |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Lamiales |
| Familia | Buddlejaceae |
| Género | *Buddleja* |
| Especie | *Buddleja incana* |
| Nombre Común | Quishuar |

Nota: B. Llanga, (2014).

### 1.2.3 Distribución y hábitat

Costales (2005), señala que *Buddleja incana* se encuentra distribuida en la parte alta de los Andes, dentro del área de Ecuador, Perú y Bolivia. Esta especie se desarrolla entre los 2300 y 3400 msnm, requiere de una temperatura máxima de 18°C y una temperatura mínima de 2°C. "El mapa de probabilidad de ocurrencia de *Buddleja incana* para Ecuador contempla las provincias de Chimborazo (Figura 2), Pichincha, Tungurahua, Azuay, Loja e Imbabura" (Barrera, 2013, pág. 1).

> Considerada como una especie característica y constitutiva de la formación forestal de la Ceja Andina constituye la franja superior del Bosque Andino Nublado que limita con el Páramo. Éste se caracteriza por un denso bosque, con árboles de entre 5 a 15 m de alto, con arbustos densamente ramificados y árboles pequeños con hojas de tamaño reducido (Arica, 2003, pág. 30).

Distribución geográfica de Quishuar (*Buddleja incana*).

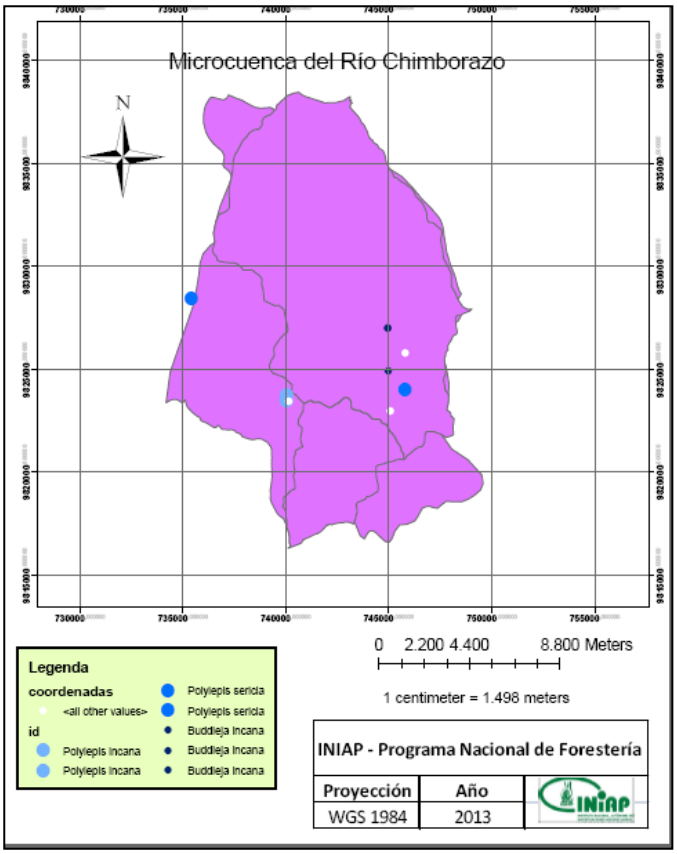



Figura 2. La distribución geográfica de *Buddleja incana* en la microcuenca del Río Chimborazo.
Fuente: Barrera, (2013).

### 1.2.4 Usos y propiedades

En la Sierra ecuatoriana, se utiliza la madera de esta especie para la elaboración de arados, timones, yugos, cabos de azadón, postes, estacas y artesanías. Se emplea en la construcción de viviendas y corrales. “En las provincias de Cotopaxi, Chimborazo y Cañar consideran al quishuar como un árbol sagrado y venerado, usado en el tallado de ídolos incas durante las fiestas de Inti Raymi” (Torre, 2008, pág. 130). Gómez (2006), señala que se utiliza la infusión de las hojas para fines medicinales como antirreumático, cicatrizante, antibacteriano y antimicótico, así para estimular la proliferación del endometrio y regenerador de la piel, en ratones se ha demostrado que inhibe la ciclooxigenasa ($COX_2$). En veterinaria es utilizada en algunas

comunidades del Perú para tratar la enfermedad del sueño en ovinos, para la curación de la queratitis, úlceras y heridas.

### 1.2.5 Propagación tradicional de *Buddleja incana*

La propagación por estacas se hace utilizando ramas leñosas de 1 cm de diámetro y 12 a 20 cm de longitud, cortadas a bisel por ambos extremos, provenientes de las partes bajas de árboles maduros. Es mejor colectar el material en la estación seca ya que así hay mayor enraizamiento. “La estaca debe tener por lo menos 3 yemas y se entierra hasta la tercera parte en sustrato que tenga un 30 % de materia orgánica” (Ansorena, 1994, pág. 30). Guairacaja (2013), en su estudio con estacas de *B. incana* utilizó la hormona AIB (RootMost) logrando un 60 % de enraizamiento a los 60 días.

## 1.3 Biotecnología Forestal

> La biotecnología se define como toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos. La tendencia mundial actual se orienta hacia el establecimiento de plantaciones forestales comerciales para obtener materia prima más homogénea, barata y reducir la presión sobre el bosque natural (Buitrago, 2008, pág. 7).

Buitrago (2008), menciona que en los países desarrollados, la investigación y las aplicaciones de la biotecnología en el sector forestal avanzan rápidamente y en especial, las técnicas de manipulación genética. De hecho, el uso de la biotecnología forestal se concentra, en un 70 %, en países desarrollados siendo los pioneros Estados Unidos, Francia y Canadá. Cabe señalar que el estudio y el uso de esta tecnología ha sido utilizada en por lo menos 140 géneros, pero la gran mayoría (62 %) se centra únicamente en seis: *Pinus*, *Eucalyptus*, *Picea*, *Populus*, *Quercus* y *Acacia*.

Según Martínez (2001), la biotecnología ofrece nuevas herramientas que se suman a las clásicas de la silvicultura, para cumplir dos objetivos básicos de la gestión forestal actual: mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales para la

conservación y la utilización de los recursos genéticos, y mejoramiento genético en las plantaciones forestales.

## 1.4 Micropropagación de Tejidos Vegetales

> Según Atares (2007), el cultivo de tejidos vegetales es el conjunto de técnicas que permiten el cultivo de las células y tejidos vegetales en condiciones axénicas para el aprovechamiento de su totipotencia (la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo ciertas condiciones, dadas en el cultivo *in vitro*), así como de su aptitud para la variación y capacidad de modificación genética.

Dentro de las técnicas utilizadas para la propagación de tejidos vegetales se mencionan la organogénesis, embriogénesis y fusión de protoplastos.

### 1.4.1 Organogénesis

> La organogénesis consiste en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema, y el desarrollo de ese primordio en brotes vegetativos que luego enraízan. Los brotes pueden formarse directamente del explanto (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (Varisai, 2003, pág. 160).

"Esta tecnología permite la producción de poblaciones de plántulas idénticas a la planta original de la que se derivan" (Sarowar, 2003, pág. 25).

> La organogénesis se desarrolla por inoculación de tejido meristemático estéril (yemas axilares o adventicias) en un medio suplementado con niveles óptimos de sales, de compuestos orgánicos y de reguladores de crecimiento. La calidad y cantidad de los componentes del medio dependerá de la especie y del explanto que se quiera cultivar *in vitro*, dado que la inducción de un tipo específico de órgano involucra señales aún poco conocidas (Radeva, 2005, pág. 55).

“Los cultivos de yemas axilares presentan menores índices de variación genética que el cultivo de yemas adventicias que se originan de *novo* a partir de tejidos somáticos con desarrollo directo o indirecto a través de la formación de callos” (Stripp, 2001, pág. 87). Las etapas que se desarrollan en la organogénesis son etapa 0, etapa 1, etapa 2 y etapa 3; mismas que se describen a continuación:

a) Etapa 0: Preparación de medios de cultivo, componentes y material vegetal

- Medio de Cultivo

Mendieta (2002), indica que el medio de cultivo está compuesto básicamente por: agua, sales minerales, azúcar, vitaminas y en algunos casos reguladores de crecimiento. Además, se utilizan elementos que den consistencia al medio que suelen ser agar o gelatina simple (ver Tabla 3).

Zelenco (2009), señala que existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos, y otros. Entre ellos está agua de coco (5 a 15 %, v/v), el jugo de frutos de tomate, el extracto de levadura, entre otros que han mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente para absorber metabolitos tóxicos. El pH suele estar entre 5,0 y 6,5 ya que pH más bajo o más alto frena el crecimiento y desarrollo *in vitro.*

- Componentes del medio de cultivo

Fuentes de carbono

Según Roca (1991) , muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono, la sacarosa en concentraciones de 2 a 5 % actúa como una fuente de energía; el azúcar es el que más se utiliza, y en algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa.

Nutrimentos minerales

“Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micro nutrimentos), que se consideran esenciales para el crecimiento de plantas enteras” (Roca, 1991, pág. 70). Mroginski (2004), señala que el nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado conjuntamente con un agente quelante ($Na_2EDTA$), lo que lo hace disponible en un amplio rango de pH.

Macroelementos

Según Arditti (1993), el prefijo macro aplica a elementos (o nutrientes), refiriéndose al hecho que éstas sustancias se necesitan relativamente en grandes cantidades. Ellos incluyen calcio (Ca), magnesio (Mg), nitrógeno (N), suplementado como nitrato de amonio o raramente urea, fósforo mayormente como ($PO_4$), potasio (K) y azufre usualmente como ($SO_4$).

Microelementos

Arditti (1993), señala que en el medio puede variar ampliamente el uso y contenido de microelementos o nutrientes (los términos no están basados en su importancia, pero si en las pequeñas cantidades que se necesitan). Los microelementos son: hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mb), cobalto (Co), boro (B), sodio (Na) y cloro (Cl).

Vitaminas

Navarro (2000), indica entre las vitaminas la niacina (ácido nicotínico), la piridoxina (vitamina $B_6$) y tiamina (vitamina $B_1$) son comúnmente usadas como parte del medio de cultivo. La biotina, el ácido fólico y el ácido pantoténico (como pantotenato de calcio) son también usados en algunos medios. Las vitaminas no son resistentes al

calor siendo estas esterilizadas por filtración, sedimentación, radiaciones ionizantes, rayos X, entre otros.

Agente gelificante

En los medios semi sólidos comúnmente se adiciona agar (0,6 a 1,0 %) u otros gelificantes como phytagel, gelrite, etc. “Se debe considerar especialmente la pureza de los gelificantes, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada. Asimismo, la marca comercial y concentraciones del agar pueden alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos” (Pérez, 2006, pág. 85).

Reguladores de crecimiento

> Los reguladores de crecimiento se definen como estructuras moleculares que modifican cualitativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas. Generalmente es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberilinas o ácido abcísico, para mejorar el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos. Por otro lado, los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo *in vitro* (Castillo J. , 2004, pág. 35).

Auxinas

Según Chávez (2012), las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas y es precisamente el ácido indol acético (AIA), la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas. La mayoría de las moléculas que integran este grupo son derivados indólicos, aunque también se encuentran algunos compuestos fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos con actividad auxínica.

Davis (2004), menciona que las auxinas se encuentran en la planta en mayores cantidades en las partes donde se presentan procesos activos de división celular, lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos

y coleóptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical.

> En cuanto a los mecanismos de transporte, se conoce un mecanismo polar (más lento) en tallos y raíces, exclusivo de auxinas, que depende de proteínas transportadoras específicas para esta hormona (la familia de transportadores PIN-FORMED), y no polar en el floema (más rápido) donde se encontraría asociado con procesos de división del cambium y ramificación de raíces. Las auxinas generalmente son transportadas en el sentido del eje longitudinal de la planta, alejándose del punto apical hacia la base (basípeto) en el tallo y, en el sentido contrario (acrópeto) desde la raíz (Amador, 2013, pág. 115).

"Es una característica de las auxinas el que a concentraciones bajas estimula el metabolismo y desarrollo, y a concentraciones altas lo depriman" (Rojas, 2000, pág. 52). Davies (2002), investigó los efectos de la interacción entre diferentes concentraciones de AIB y la duración de la inmersión sobre el crecimiento de plántulas de *Quercus robur* y *Fagus sylvatica*. Según el autor, el AIB en dosis de 250 $mg.L^{-1}$, aplicado durante cien minutos incrementó el peso seco de raíces y brotes de *Fagus sylvatica*, mientras que en plántulas de *Quercus robur* sometidas a algunas concentraciones de esta hormona, no alteraron las tasas de iniciación y elongación de raíces.

Citoquininas

Chávez (2012), considera las citoquininas como derivadas de adeninas o purinas, y dentro de este grupo se incluyen la kinetina, zeatina y benzilaminopurina. Debido a su variación estructural se ha llegado a clasificar en citoquininas isoprenoides y aromáticas.

Aguilar (2010), considerada a este grupo de fitohormonas como el responsable de los procesos de división celular, entre los que se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares, la germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la

diferenciación celular y también el control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia y la transducción de señales.

> Se cree que las citoquininas son sintetizadas en tejidos jóvenes o meristemáticos como ápices radiculares, yemas del tallo, nódulos de raíces de leguminosas, semillas en germinación, especialmente en endospermas líquidos y frutos jóvenes; desde donde se transportan vía xilema hacia la hoja donde se acumula, para luego ser exportada vía floema hacia otros órganos como los frutos (Amador, 2013, pág. 118).

Según Aguilar (2010), la biosíntesis y homeostasis de citoquininas, están finamente controladas por factores internos y externos como el nivel de otras fitohormonas y las fuentes de nitrógeno inorgánico, además su mecanismo de translocación está relacionado con el mismo sistema de transporte de purinas y nucleósidos tanto a nivel de toda la planta, como a nivel celular. En un estudio realizado por Orozco (2006), se observó que en el proceso de multiplicación de *C. montana* (Meliaceae) comúnmente los explantos poseían un promedio de cuatro a siete hojas y con la adición al medio de cultivo de BA y kinetina, vió que cuanto mayor era la concentración de citoquininas mayor era la producción de brotes pero la longitud del brote era menor. Además, observó que al adicionar 2,0 $mg.L^{-1}$ de citoquininas la respuesta de formación de los brotes fue negativa, dando lugar a la formación de callo.

Giberelinas

Según Pérez M (1994), las giberelinas son el grupo más numeroso de reguladores de crecimiento que se conoce en la actualidad. Éstas son sustancias químicamente relacionadas con el ácido giberélico ($GA_3$). Los efectos más relevantes de las giberelinas son: retraso en la maduración de los frutos, inducción del alargamiento de entrenudos en tallos, inducción de la partenocarpia en algunas especies frutales, germinación de semillas, aumento en el porcentaje de flores masculinas y juvenilidad Aguilar (2010), señala que la biosíntesis de giberelinas inicia en los plastidios y el precursor de todo el proceso es el geranilgeranil difosfato (GGDP); existen tres diferentes clases de enzimas necesarias para la síntesis de giberelinas bioactivas en

plantas, las terpenos sintasas (TPSs) presentes en los plastidios, las citocromo P450 monooxigenasas (P450Os) ubicadas en el retículo endoplasmático y las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2ODDs) que se encuentran en el citosol. Su transporte se realiza por los tejidos conductores de la planta, pero aún no se sabe cómo se realiza su movimiento en las plantas. En cuanto a estudios del uso de esta fitohormona en especies vegetales Vidales (2000), reporta los experimentos realizados en *A. thaliana* (Brassicaceae), en donde se probó la hipótesis de que las giberelinas regulan el crecimiento del hipocótilo, al alterar la extensión de la elongación de la célula del hipocótilo; en estos estudios usaron mutantes de dicha especie, las mismas que eran deficientes en giberelina y de respuesta alterada a esta hormona, demostraron que la giberelina usada reguló la elongación en hipocotilos que crecieron tanto en luz como en oscuridad, influyendo en el promedio y la extensión final de la elongación celular.

Tabla 3.
Composición y preparación de medios de cultivo.

| Componentes | | Murashige y Skoog (MS) | Woody Plant Medium (WPM) |
|---|---|---|---|
| Macroelementos | | Cantidad ($mg.L^{-1}$) | |
| $KNO_3$ | Nitrato de potasio | 1900.000 | - |
| $NH_4NO_3$ | Nitrato de amonio | 1650.000 | 400.00 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | Cloruro de calcio bihidratado | 440.000 | 96.00 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | Sulfato de magnesio heptahidratado | 370.000 | 370.00 |
| $KH_2PO_4$ | Fosfato de potasio | 170.000 | 170.000 |
| **Microelementos** | | | |
| $H_3BO_3$ | Ácido bórico | 25000 | 6200 |
| $MnSO_4.4H_2O$ | Sulfato de manganeso tetrahidratado | 8600 | 22300 |
| KI | Ioduro de potasio | 0,830 | - |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | Molibdato de sodio bihidratado | 0,250 | 0,025 |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | Sulfato de zinc heptahidratado | - | 8600 |
| $CuSO_4.5H_2O$ | Sulfato cúprico pentahidratado | 0,025 | 0,025 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | Cloruro de cobalto hexahidratado | 0,025 | |
| $FeSO_4.7H_2O$ | Sulfato ferroso heptahidratado | 27800 | 27800 |
| $Na_2$.EDTA | Sal de sodio del ácido etilendia-mino tetraacético | 37300 | 37300 |
| **Orgánicos** | | | |
| Inositol | | 100.000 | 100.00 |
| Tiamina | | 0,400 | 1000 |
| Acido Nicotínico | | 0,500 | 0,500 |
| Piridoxina | | 0,500 | 0,500 |
| Sacarosa | | 30000.000 | 20000.000 |
| Phytagel | | 1800.000 | - |
| Agar | | - | 6000.00 |
| pH | | 5800 | 5800 |

Nota: A. Abdelnour, (2002).

- Material vegetal

Según Cano (2013), la correcta elección y preparación del explanto incide directamente sobre la calidad del mismo y, su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explanto.

Martínez (2007), menciona que la constitución genética de la planta, la edad del órgano o tejido, el estado fisiológico y sanitario, 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, así como, el tipo de corte que se realice en el explante y la forma en la que se coloque el explante en el medio influyen en la respuesta favorable del cultivo *in vitro*.

b) Etapa 1: Establecimiento del cultivo

Cano (2013), indica que el objetivo principal de esta etapa es iniciar el cultivo *in vitro* de los explantos. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización. Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas.

Martínez (2007), señala que la obtención de cultivos axénicos puede lograrse trabajando tanto sobre aspectos preventivos como curativos por lo que es imprescindible la desinfección superficial en donde se incluye varios pasos: el lavado de los explantos con agua corriente, el empleo de etanol al 70 %, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0,1 a 3 % de cloro activo) con unas gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente, los explantos deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril. Sin embargo, la contaminación endógena, ya sea de origen fúngico o bacteriano, no resulta fácil de erradicar. Con frecuencia, este tipo de contaminaciones pueden ser reducidas hasta un nivel tolerable y compatible con el cultivo mediante el uso de fungicidas y antibióticos en el medio de cultivo.

Cárdenas (2011), en la etapa de establecimiento *in vitro* de *B. incana* (Scrophulariaceae) realizó una desinfección con hipoclorito de sodio al 2 % durante 15 minutos logrando un mayor índice de supervivencia; sin embargo, existió contaminación fúngica (10 - 26,7 %) y bacteriana (3,3 - 6,7 %) debido a que el material vegetal provino directamente de plantas de vivero de la EMMOP. Los valores de las medias para la variable longitud de brote fue de 13,36 mm con 0 $mg.L^{-1}$ BAP.

Cano (2013), en la etapa de establecimiento *in* vitro de *A. nitidiflorus* (Fabaceae), utilizó en la desinfección hipoclorito de sodio al 2 % , durante la etapa de establecimiento las plantas fueron cultivadas en medio con sales de MS en donde observó un mayor crecimiento en altura. En otro estudio con la especie *Lens culinaris* (Fabaceae) determinó que el medio MS fue mejor que el medio B5 para el desarrollo de plantas.

c) Etapa 2: Multiplicación

Según Végvari (2001), el objetivo principal de esta etapa es incrementar el número de unidades individualizables con las que se pueda repetir el proceso de regeneración por explanto. Cuando la finalidad principal es la conservación *in vitro* es casi obligado recurrir a la proliferación a partir de meristemos o yemas ya existentes, ya que con este tipo de explantos es altamente probable que se mantenga la fidelidad genética de la especie en cuestión a lo largo de todo el proceso de micropropagación.

En lo que se refiere a la etapa de multiplicación en especies forestales Alonso (2002), encontró que el cultivo con 0,1 $mg.L^{-1}$ de BA ofrece la mejor opción para la multiplicación de *A.nitidiflorus* (Fabaceae), tanto por el número de brotes formados como por la altura de los mismos.Asimismo, el uso de Tidiazuron (TDZ) a dosis de 0,01 $mg.L^{-1}$ en *T. boveana* (Tamaricaceae) constituyeron la combinación adecuada para la multiplicación. En otro estudio Carranza (2013), encontró que el medio de cultivo MS/2 con 2 $mg.L^{-1}$ de bencilaminopurina (BAP) y 1 $mg.L^{-1}$ de ácido indolbutírico (AIB) para la multiplicación *in vitro* de *Swietenia macrophylla*, es efectivo ya que se obtuvo un 70 % de brotes.

d) Etapa 3: Enraizamiento y aclimatización

Vargas (2003), menciona que en esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua. El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatización se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia.

Azofeifa (2009), en estudios con *A. maximus* (Fabaceae) indicó que el enraizamiento se obtuvo con el medio de cultivo MS a la mitad de su concentración, el carbón activado ha sido utilizado en numerosas ocasiones para optimizar el enraizamiento. Benson (2000), en *P. suffruticosa* (Paeoniaceae) la adición de carbón activado al medio de enraizamiento no solo supuso una mejora en el crecimiento radicular y en el número de raíces por explanto, sino que también redujo la aparición de auxinas fotosensibles en la base del explanto.

### 1.4.2 Embriogénesis somática

> Los embriones que no resultan de la fusión de gametos se definen como embriones somáticos, asexuales o adventicios. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, no poseen conexión vascular con el tejido materno y son capaces de crecer y formar plantas normales. La embriogénesis somática se puede obtener directamente a partir de células aisladas o utilizando callos (Castillo A. , 2008, pág. 10).

"Si bien implícitamente todas las células vegetales tienen la información genética para formar una planta completa y funcional, se usan comúnmente cotiledones e hipocotilos para producir embriones somáticos" (Gentry, 1993, pág. 142).

González (2003), señala que generalmente se utilizan medios con altas concentraciones de sales, de sacarosa o de manitol y se necesita la presencia de una auxina para la iniciación del callo embriogénico, habitualmente 2,4-D. Como la maduración y la germinación de los embriones no ocurren en presencia de esta auxina, se debe remover o usarla en bajas concentraciones para permitir el desarrollo. Además, tanto la inducción de la embriogénesis somática como el desarrollo de la maduración comienzan después que el embrión completa el proceso.

> El crecimiento por mitosis se detiene y la célula comienza a expandirse y a acumular sustancias de reserva. En esta etapa no es necesaria la adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, aunque en algunas especies se recomienda el uso de citoquininas y en otras la adición de ABA (Lagoutte, 2009, pág. 152).

### 1.4.3 Fusión de protoplastos

Luna (2003), menciona que la técnica de fusión de protoplastos surge como especialidad o aplicación a partir de las técnicas de aislamiento y cultivo de protoplastos, que permiten la obtención de células desprovistas de pared celular gracias a la acción de enzimas líticos (celulasas, pectinasas) obtenidos de microorganismos (*Aspergillus* sp.; *Trichoderma viride*; *Rhizopus* sp.), y su posterior crecimiento (división celular, formación de microcallos y regeneración de plántulas por vía organogénica o embriogénica).

## 1.5 Problemas en la micropropagación de tejidos vegetales

Los factores que influyen sobre la calidad del explanto son:

a) Martínez (2007), señala que 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 $O_2$ y $CO_2$. Las condiciones de luz y temperatura que se eligen para el cultivo *in vitro* generalmente son las que constituyen un óptimo crecimiento y desarrollo del material experimental *in vivo*. La

humedad relativa en el interior de los recipientes de cultivo es alta, 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 hiperhidricidad de los explantes.

b) Según Olmos (2005), 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*.

c) Según Hernández (2010), 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 que se utilice, se pueden transmitir microorganismos de la superficie del explante o de su interior. Los principales microorganismos asociados a las superficies de las plantas son hongos, levaduras, bacterias y molicutes (fitoplasmas, espiroplasmas y organismos relacionados). Muchos de estos microorganismos se pueden eliminar mediante esterilizaciones superficiales. 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. Las plantas contaminadas pueden tratarse mediante termoterapia y/o cultivo de meristemos o también aplicando productos antifúngicos, antibióticos y antivíricos a las plantas durante el estadio 0.

d) Borrero (2007), menciona que la oxidación fenólica se estimula cuando las plantas se exponen a situaciones de estrés como pueden ser los daños mecánicos que se producen al aislar los explantes de la planta madre. El ennegrecimiento de los tejidos se produce por la acción de enzimas oxidasas que son exudadas, sintetizadas o están presentes en los tejidos heridos o senescentes. Los exudados suelen ser

mezclas de complejos de sustancias fenólicas. A pesar de tener un aspecto semejante, los exudados fenólicos producidos por plantas de géneros diferentes no tienen la misma composición.

# CAPÍTULO 2

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 Localización del estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el invernadero y en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) de la Estación Experimental Santa Catalina, del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en la Provincia de Pichincha, Cantón Mejía, Parroquia Cutuglahua (Tabla 4).

Tabla 4.
Condiciones del sitio experimental

| | |
|---|---|
| Provincia | Pichincha |
| Cantón | Mejía |
| Parroquia | Cutuglagua |
| Latitud | 00°22’12” S |
| Longitud | 78° 32’20” W |
| Altitud | 3058 msnm |
| Temperatura promedio Anual | 12,04°C |
| Precipitación promedio Anual | 1400 mm |
| Humedad relativa | 79% |
| Precipitación promedio Anual | < 2000 mm |

Nota: Instituto Nacional de Metereología e Hidrología-INAMHI, (2014).

## 2.2 Condiciones experimentales de laboratorio

Para las fases de cultivo *in vitro*, el material introducido de *C. catenaeformis* se colocó en estanterías metálicas en un cuarto de crecimiento en condiciones controladas, a una temperatura de 25-28±1ºC, 40-60 % de humedad y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad con una intensidad lumínica de aproximadamente 2000 luxes. Para *B. incana* la temperatura del cuarto de crecimiento de 18°C y 21 % de humedad.

## 2.3 Material vegetal

Para esta investigación se utilizaron dos especies *Cedrelinga catenaeformis* y *Buddleja incana*. Las semillas y plantas de *C. catenaeformis* tuvieron como procedencia el vivero de la comunidad Kichwa Campococha provincia de Napo, mientras que las semillas y plantas de *B. incana* provinieron del vivero comunitario forestal de la parroquia San Juan provincia de Chimborazo (Figura 3).

Se adaptaron 30 plantas de *C. catenaeformis* en el invernadero del Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos (DENAREF) y 20 plantas de *B. incana* en el invernadero del Departamento Nacional de Biotecnología de Santa Catalina para sus respectivos cuidados (Figura 3). Las plantas fueron colocadas en fundas de siembra con una mezcla de tierra, turba y pomina previamente esterilizados con una solución de Benlate $1g.L^{-1}$ de agua.

Las plantas mantenidas en el invernadero fueron fertilizadas cada 15 días con Stimufol $1g.L^{-1}$. El control fitosanitario se realizó cada 8 días, con una aplicación de Carbendazim 1 $ml.L^{-1}$ y Skul Fe 1 $ml.L^{-1}$ para prevenir la contaminación y el riego se realizó dos veces por semana con 200 ml de agua potable por planta.

Plantas y semillas de *C. catenaeformis* y *B. incana.*

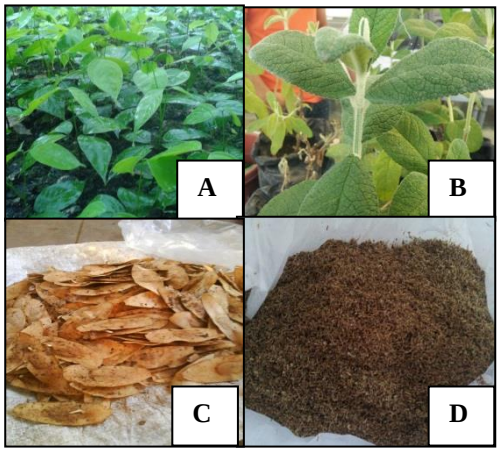



Figura 3. A) Plantas de *C. catenaeformis* mantenidas en invernadero del DENAREF. B) Plantas de *B. incana* en invernadero del Programa Nacional de Biotecnología del INIAP. C) Semillas de *C. catenaeformis*. D) Semillas de *B. incana.*
Elaborado por: Jiménez, 2014.

## 2.4 Materiales

### 2.4.1 Materiales de laboratorio

- Marcadores
- Atomizadores
- Cinta de autoclavar
- Cinta masking
- Cinta parafilm
- DigiTimer
- Mascarilla
- Cajas Petri 100 mm
- Vasos de precipitación
- Espátulas
- Materiales de disección (mango, hojas de bisturí y pinzas Nro.11)
- Mechero de alcohol
- Papel absorbente
- Papel aluminio
- Erlenmeyers 1000 ml
- Fósforos
- Frascos de vidrio con tapa rosca
- Guantes de nitrilo
- Jeringuillas 5 y 10 ml
- Mandil
- Papel bond estéril
- Piceta 200 ml
- Probeta
- Tijeras
- Servilletas estériles
- Pinzas
- Tubos

### 2.4.2 Equipos

- Autoclaves
- Balanza de precisión
- Cámaras de flujo laminar
- Dispensador de medios
- Microondas
- pH-metro

### 2.4.3 Reactivos

- 6-Bencilaminopurina (BAP)
- Ácido giberélico ($AG_3$)
- Alcohol potable
- Benomil
- Hipoclorito de sodio
- Ácido ascórbico
- Jabón líquido
- Povidyn
- Agar
- Sacarosa
- Carbón activado
- Tween 20
- Phyton
- Carbendazim

### 2.4.4 Equipos y material de oficina

- Cámara de fotos
- Computador
- Impresora
- Marcadores y lapiceros
- Resmas de papel bond

### 2.4.5 Material de campo

- Fundas de siembra medianas
- Tijeras de podar
- Fundas plásticas transparentes Ziploc
- Papel absorbente
- Guantes
- Fungicidas y bactericidas

## 2.5 Diseño experimental

El diseño experimental se aplicó en las dos etapas del experimento:

- Etapa I: Introducción y establecimiento *in vitro* de *Cedrelinga catenaeformis* y *Buddleja incana.*

- Etapa II: Multiplicación *in vitro* de *Cedrelinga catenaeformis* y *Buddleja incana.*

### 2.5.1 ETAPA I: Introducción y establecimiento *in vitro* de *C. catenaeformis* y *B. incana.*

#### 2.5.1.1 Factores en estudio para semillas de *C. catenaeformis*

a) Protocolos de desinfección (P)

p1= Lavado + Oxitetraciclina 3g. $0,15L^{-1}$ + Benomil $1g.L^{-1}$ 30´ + Ácido ascórbico 100 ppm + Ácido cítrico 100 ppm + NaOCl 2 % 20´ + agua destilada Modificado de Rodríguez V (2000).

p2= Lavado + Etanol 70 % 10´´ + NaOCl 1 % 20´ + agua destilada Modificado de Cantos, Liñán, Pérez, & Troncoso (1998).

p3= Lavado + Povidin 1 % 20´ + Fungicidas (Phyton 1 ml. $0,15L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 2 ml. $0,15L^{-1}$ agua destilada) 20´ + Oxitetraciclina 3g. $0,15L^{-1}$ + NaOCl 0,1 % 120´´ + NaOCl 1 % 10´ + Tween 20 + agua destilada Modificado de Laboratorio Cultivo de Tejidos- LCT-INIAP, (2014).

b) Medios de cultivo para la introducción (M)

m1= MS 4,4g.$L^{-1}$, agar 5,5 g.$L^{-1}$, azúcar 30 g.$L^{-1}$, carbón activado 0,5 g.$L^{-1}$ Sanz (2007).

m2= WPM 2,3 g.$L^{-1}$, agar 5,5 g.$L^{-1}$, azúcar 30 g.$L^{-1}$, carbón activado 0,5 g.$L^{-1}$ Mohan (2010).

### 3.5.1.1 Tratamientos

El número de tratamientos que se aplicaron fueron 6 y resultaron de la interacción de los dos factores en estudio mencionados anteriormente (Tabla 5).

Tabla 5.
Tratamientos de desinfección e introducción de semillas de *Cedrelinga catenaeformis in vitro* en INIAP, Cutuglagua-Pichincha, 2014.

| T | CODIFICACIÓN | DESCRIPCIÓN |
|---|---|---|
| $T_1$ | $p_1m_1$ | Lavado + Oxitetraciclina 3g. 0,15$L^{-1}$ + Benomil 1g.$L^{-1}$ 30´ + Ácido ascórbico 100 ppm + Ácido cítrico 100 ppm + NaOCl 2 % 20´ + agua destilada. Cultivada: Medio MS1X |
| $T_2$ | $p_1$ $m_2$ | Lavado + Oxitetraciclina 3g. 0,15$L^{-1}$ + Benomil 1g.$L^{-1}$ 30´ + Ácido ascórbico 100 ppm + Ácido cítrico 100 ppm + NaOCl 2 % 20´ + agua destilada. Cultivada: Medio WPM1X. |
| $T_3$ | $p_2$ $m_1$ | Lavado + Etanol 70 % 10´´ + NaOCl 1 % 20´+ agua destilada. Cultivada: Medio MS1X. |
| $T_4$ | $p_2$ $m_2$ | Lavado + Etanol 70 % 10´´ + NaOCl 1 % 20´ + agua destilada. Cultivada: Medio WPM1X. |
| $T_5$ | $p_3$ $m_1$ | Lavado + Povidin 1 % 20´+ Fungicidas (Phyton 1 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 2 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada) 20´ + Oxitetraciclina 3g. 0,15$L^{-1}$ + NaOCl 0,1 % 120´´ + NaOCl 1 % 10´ + agua destilada. Cultivada: Medio MS1X. |
| $T_6$ | $p_3$ $m_2$ | Lavado + Povidin 1 % 20´ + Fungicidas (Phyton 1 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 2 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada) 20´ + Oxitetraciclina 3g. 0,15$L^{-1}$ + NaOCl 0,1 % 120´´ + NaOCl 1 % 10´ + agua destilada. Cultivada: Medio WPM1X. |

Nota: J. Jiménez, 2014.

#### 2.5.1.2 Unidad Experimental

La unidad experimental estuvo conformada por un frasco de vidrio de 5,6 cm x 9 cm con tapa, con 15 ml de medio de cultivo. Se colocó una semilla por frasco, se selló y envolvió con plástico film para evitar contaminación. El número total de observaciones fueron 30.

#### 2.5.1.3 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3x2 (3 protocolos de desinfección por 2 medios para introducción) con 5 observaciones.

##### 2.5.1.3.1 Esquema del análisis de varianza

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un protocolo de desinfección (Tabla 6).

Tabla 6.
ADEVA para el establecimiento de un protocolo de *Cedrelinga catenaeformis* INIAP, Cutuglahua-Pichincha, 2014.

| Fuente de Variación (F de V) | Grados de libertad (GL) |
|---|---|
| Total | 29 |
| Tratamientos | 5 |
| Protocolo de desinfección (P) | 2 |
| Medio de introducción (M) | 1 |
| P x M | 2 |
| Error Experimental | 24 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

#### 2.5.1.4 Análisis funcional

Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5 % para protocolo de desinfección e interacciones y un DMS para medios de introducción. Tukey se calcula como valor crítico para la identificación de diferencias significativas, una cantidad (DMS)

basada en el cuantil correspondiente de la distribución de rangos estudentizados para las variables en estudio que presentaron diferencias estadísticas significativas.

#### 2.5.1.5 Variables evaluadas

##### 2.5.1.5.1 Porcentaje de germinación (%)

Esta variable se evaluó a los 30 días, se estimó una relación porcentual entre el número de semillas germinadas/número total de semillas y multiplicado por 100 (Vásquez, 2007, pág. 12).

##### 2.5.1.5.2 Porcentaje de contaminación (%)

La evaluación se realizó a través del registro de presencia o ausencia de micelio o de colonias bacterianas en los explantes y en el medio de cultivo a los 30 días. Se calificó con 0 la ausencia y con 1 la presencia de contaminación. Se estimó una relación porcentual entre el número de explantes contaminados/número total de explantes y multiplicado por 100 (García, 2009, pág. 10).

##### 2.5.1.5.3 Porcentaje de oxidación

La evaluación se realizó a través del registro de presencia o ausencia de oxidación en los explantes y a los 30 días. Se calificó con 0 la ausencia y con 1 la presencia. Se estimó una relación porcentual entre el número de explantes oxidados/número total de explantes y multiplicado por 100 (Miranda, 2011, pág. 16).

##### 2.5.1.5.4 Tasa total de pérdida (%)

Se determinó el porcentaje de pérdida mediante el conteo de explantes muertos a los 30 días a partir de la siembra. Se estimó una relación porcentual entre el número de

explantes perdidos/número total de explantes introducidos y multiplicado por 100 (Cárdenas, 2011, pág. 135).

2.5.1.6 Manejo específico del Experimento

a) Recolección de germoplasma de multiplicación

Las semillas fueron recolectadas en el vivero de la comunidad Kichwa Campo Cocha ubicada en la provincia de Napo. Se transportaron en sobres de manila hasta el laboratorio de Biotecnología de la EESC.

b) Desinfección del explante

Se realizó una pre- desinfección en el laboratorio las semillas fueron sumergidas en una solución de agua con detergente y posteriormente cepilladas para eliminar posibles contaminantes como polvo e insectos. Además se sumergió durante 30 min en una solución de Povidin 1 %+ Benomil 1 $g.L^{-1}$.

Para la desinfección se utilizaron los protocolos propuestos a continuación:

PROTOCOLO 1: Modificado de Rodríguez V (2000).

En el laboratorio las semillas fueron lavadas y cepilladas una a una con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente. Se colocaron las semillas en una solución de fungicidas (Oxitetraciclina 3g. $0,15L^{-1}$ + Benomil $1g.L^{-1)}$ y antioxidantes (Ácido ascórbico 100 ppm + Ácido cítrico 100 ppm) durante 30 minutos.

Las semillas fueron llevadas a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron las semillas en una solución de hipoclorito de

sodio al 2 % durante 20 minutos. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril.

PROTOCOLO 2: Modificado de Cantos, Liñán, Pérez, & Troncoso (1998).

En el laboratorio las semillas fueron lavadas y cepilladas una a una con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente.

Las semillas fueron llevadas a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron las semillas en etanol al 70 % por 10 segundos y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 20 minutos. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril.

PROTOCOLO 3: Modificado de Laboratorio Cultivo de Tejidos-LCT-INIAP (2014).

En el laboratorio las semillas fueron lavadas y cepilladas una a una con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente. Se colocaron las semillas en Povidin solución al 1 % durante 20 minutos, después de este tiempo las semillas fueron sumergidas en una solución de fungicidas (Phyton 1ml. $0,15L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 2 ml. $0,15L^{-1}$ agua destilada + Oxitetraciclina 3g. $0,15L^{-1}$) durante 20 minutos.

Las semillas fueron llevadas a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron las semillas en una primera solución de hipoclorito de sodio al 0,1 % durante 120 minutos y pasado este tiempo en una segunda solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 10 minutos. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril (Figura 4).

Desinfección de semillas de *C. catenaeformis*

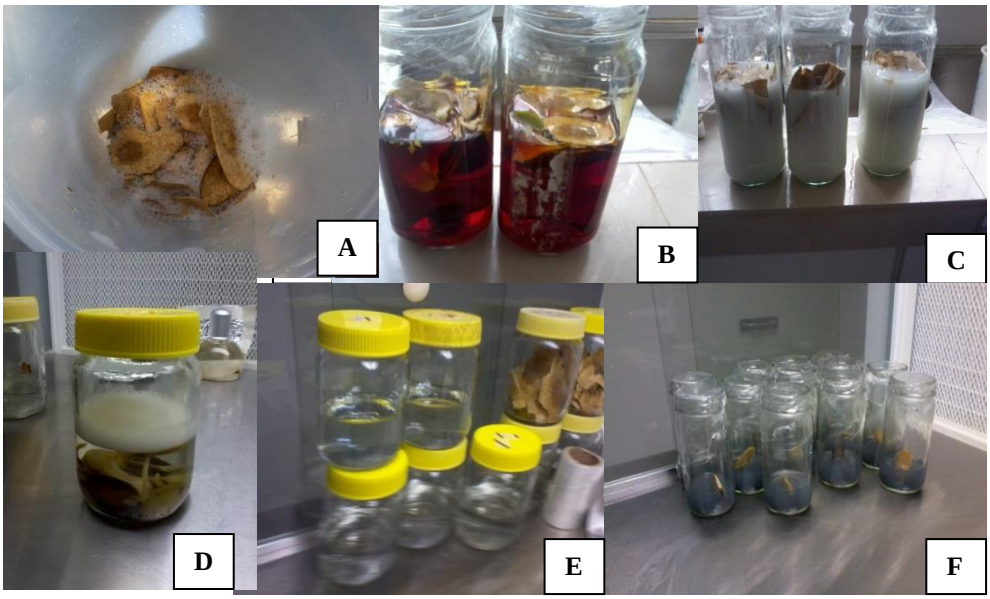



Figura 4. A) Lavado con agua y detergente. B) Semillas en Povidin solución 1 %. C) Semillas en solución de fungicidas. D) Semillas en solución de hipoclorito de sodio. E) Enjuagues con agua estéril. F) Siembra en MS y Woody.

Elaborado por: Jiménez, 2014.

### 2.5.2.1 Factores en estudio de brotes de *C. catenaeformis*

a) Protocolos de desinfección (P)

p1= Lavado + Povidin solución 1 % 30´ + Alcohol 70 % 30´´ + NaOCl 0,4 % 1´ + agua destilada Castillo M (2012).

p2= Lavado + Kilol 20 gotas. 0,10$L^{-1}$ 30´ + Benomil 1 g.$L^{-1}$ + NaOCl 10 % 10´ + agua destilada Modificado de Ortiz (2007).

p3= Lavado + Povidin 1 % 60´ + Fungicidas (Phyton 1 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 2ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada) 20´ + NaOCl 0,5 % 60´ + NaOCl 1 % 10´ + Tween 20 + agua destilada Laboratorio Cultivo de Tejidos- LCT-INIAP (2014).

b) Medios de cultivo para la introducción (M)

m1= MS 4,4g.$L^{-1}$, agar 5,5 g.$L^{-1}$, azúcar 30 g.$L^{-1}$, carbón activado 0,5 g.$L^{1}$ Sanz (2007).

m2= WPM 2,3 g.$L^{-1}$, agar 5,5 g.$L^{-1}$, azúcar 30 g.$L^{-1}$, carbón activado 0,5 g.$L^{1}$ Mohan (2010).

### 2.5.2.2 Tratamientos

El número de tratamientos que se aplicaron fueron 6 y resultaron de la interacción de los dos factores en estudio (Tabla 7).

Tabla 7.
Tratamientos de desinfección e introducción de brotes de *Cedrelinga catenaeformis in vitro* en INIAP, Cutuglahua-Pichincha, 2014.

| T | CODIFICACIÓN | DESCRIPCIÓN |
|---|---|---|
| $T_1$ | $p_1m_1$ | Lavado + Alcohol 70 % 30´´ + NaOCl 0,4 % 10´ + agua destilada. Cultivada: Medio MS1X |
| $T_2$ | $p_1$ $m_2$ | Lavado + Alcohol 70 % 30´´ + NaOCl 0,4 % 10´ + agua destilada. Cultivada: Medio WPM1X. |
| $T_3$ | $p_2$ $m_1$ | Lavado + Kilol 20 gotas. 0,10$L^{-1}$ 30´ + Benomil 1 g.$L^{-1}$ + NaOCl 10 % 10´ + agua destilada. Cultivada: Medio MS1X |
| $T_4$ | $p_2$ $m_2$ | Lavado + Kilol 20 gotas. 0,10$L^{1}$ 30´ + Benomil 1 g.$L^{-1}$ + NaOCl 10 % 10´ + agua destilada. Cultivada: Medio WPM1X. |
| $T_5$ | $p_3$ $m_1$ | Lavado + Povidin 1 % 60´+ Fungicidas (Phyton 1 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 2ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada) 20´+ NaOCl 0,5 % 60´+ NaOCl 1 % 10´ + Tween 20 + agua destilada. Cultivada: Medio MS1X |
| $T_6$ | $p_3$ $m_2$ | Lavado + Povidin 1 % 60` + Fungicidas (Phyton 1 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 2ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada) 20´ + NaOCl 0,5 % 60´ + NaOCl 1 % 10´ + Tween 20 + agua destilada. Cultivada: Medio WPM1X. |

Nota: J. Jiménez, 2014.

2.5.2.3 Unidad Experimental

La unidad experimental estará conformada por un frasco de vidrio de 5,6 cm x 9 cm con tapa, con 15 ml de medio de cultivo. Se colocó un brote por frasco, se selló y envolvió con plástico film para evitar contaminación. El número total de observaciones fueron 30.

2.5.2.4 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3x2 (3 protocolos de desinfección por 2 medios para introducción) con 5 observaciones.

2.5.2.4.1 Esquema del análisis de varianza

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un protocolo de desinfección (Tabla 8).

Tabla 8.
ADEVA para el establecimiento de un protocolo de *Cedrelinga catenaeformis* INIAP, Cutuglahua, 2014.

| Fuente de Variación (F de V) | Grados de libertad (GL) |
|---|---|
| Total | 29 |
| Tratamientos | 5 |
| Protocolo de desinfección (P) | 2 |
| Medio de introducción (M) | 1 |
| P x M | 2 |
| Error Experimental | 24 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

2.5.2.5 Análisis funcional

Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5 % para protocolo de desinfección e interacciones y un DMS para medios de introducción, se utilizó Tukey porque calcula como valor crítico para la identificación de diferencias significativas, una

cantidad (DMS) basada en el cuantil correspondiente de la distribución de rangos estudentizados para las variables en estudio que presentaron diferencias estadísticas significativas.

#### 2.5.2.6 Variables evaluadas

##### 2.5.2.6.1 Porcentaje de brotación (%)

Esta variable se evaluó a los 30 días, se estimó una relación porcentual entre el número total de yemas brotadas/número total de yemas y multiplicado por 100 (Bautista, 1997, pág. 3).

##### 2.5.2.6.2 Longitud de brote

Esta variable se evaluó con observaciones a los 30 días y se determinó el crecimiento de los brotes con la ayuda de una regla de 30 cm, se midió desde la base del brote hasta el ápice de la hoja más alta. Las mediciones se promediaron y se expresaron en cm/brote (Miranda, 2011, pág. 16).

##### 2.5.2.6.3 Porcentaje de contaminación (%)

La evaluación se realizó a través de registro de presencia o ausencia de micelio o de colonias bacterianas en los explantes y en el medio de cultivo a los 30 días. Se calificó con 0 la ausencia y con 1 la presencia de contaminación. Se estimó una relación porcentual entre el número de explantes contaminados/total de explantes y multiplicado por 100 (García, 2009, pág. 10).

##### 2.5.2.6.4 Porcentaje de oxidación (%)

La evaluación se realizó a través de registro de presencia o ausencia de oxidación en los explantes y a los 30 días. Se calificó con 0 la ausencia y con 1 la presencia. Se

estimó una relación porcentual entre el número de explantes oxidados/total de explantes y multiplicado por 100 (Miranda, 2011, pág. 16).

2.5.2.6.5 Tasa total de pérdida (%)

Se determinó el porcentaje de pérdida mediante el conteo de explantes muertos a los 30 días a partir de la siembra. Se estimó una relación porcentual entre el número de explantes perdidos/total de explantes introducidos y multiplicado por 100 (Cárdenas, 2011, pág. 135)

2.5.2.7 Manejo específico del Experimento

a) Recolección del material vegetal

Se procedió a cortar 30 yemas axilares y apicales de 2-3 cm de largo de ramas jóvenes, con una tijera desinfectada con alcohol al 70 %. Se colocaron los explantes en un recipiente con agua destilada.

b) Desinfección del explante

Se realizó una pre- desinfección en el laboratorio, los brotes fueron sumergidos en una solución de agua con detergente y posteriormente cepillados para eliminar posibles contaminantes como polvo e insectos (Figura 5).

Para la desinfección se utilizaron los métodos propuestos a continuación:

PROTOCOLO 1: Castillo M (2012).

En el laboratorio los brotes fueron lavados con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente. Se colocaron los brotes en Povidin solución 1 % por 60 minutos y se enjuagó con agua destilada.

Los brotes fueron llevados a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron los brotes en alcohol al 70 % durante 30

segundos y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 0.4 % durante 10 minutos. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril.

PROTOCOLO 2: Modificado de Ortiz (2007).

En el laboratorio los brotes fueron lavados con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente. Se colocaron los brotes en agua destilada estéril con 20 gotas de Kilol durante 30 minutos. Los brotes fueron colocados en Benomil 1 $g.L^{-1}$ durante 60 minutos.

Los brotes fueron llevados a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron los brotes en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 minutos. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril.

PROTOCOLO 3: Modificado de Laboratorio Cultivo de Tejidos-LCT-INIAP (2014).

En laboratorio los brotes fueron lavados con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente. Se colocaron los brotes en Povidin solución 1 % durante 60 minutos. Los brotes fueron colocados en fungicidas (Phyton 1 ml. $0,15L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 2ml. $0,15L^{-1}$ agua destilada) durante 20 minutos.

Los brotes fueron llevados a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron los brotes en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 60 minutos. Pasado los 60 minutos los brotes fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 10 minutos más tres gotas de Tween 20. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril (Figura 5).

Desinfección de brotes de *C. catenaeformis.*

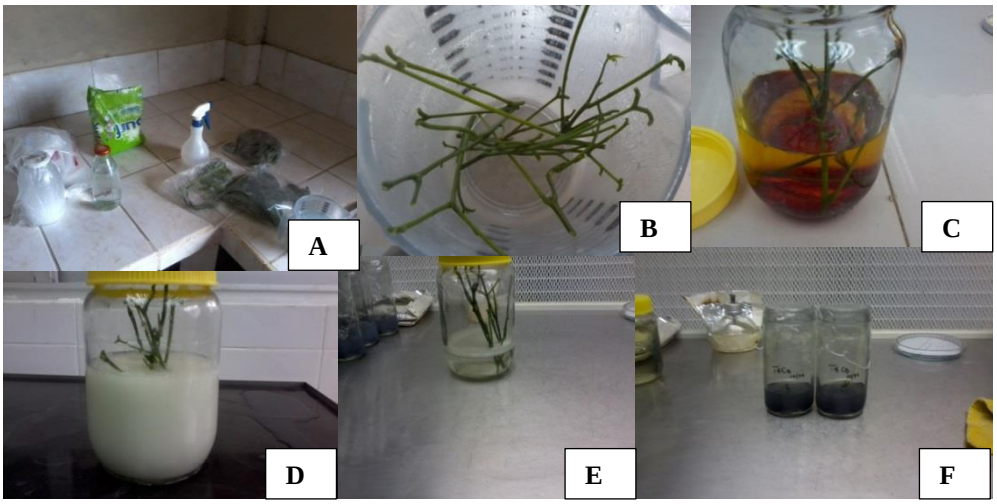



Figura 5. Desinfección de brotes. A) Lavado con agua y detergente en campo. B) Lavado con agua y detergente en laboratorio. C) Brotes en Povidin solución 1% D) Brotes en solución de fungicidas E) Brotes en solución de hipoclorito de sodio. F) Siembra en medios MS y Woody. Elaborado por: Jiménez, 2014.

2.5.3.1 Factores en estudio Semillas de *B. incana*

a) Protocolos de desinfección (P)

p1= Lavado + Povidin solución 1 % 60´ + Fungicidas (Phyton 1 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 1 ml. 0.15 $L^{-1}$ agua destilada) 60´ + NaOCl 1 % + Tween 20 10´ + enjuagues Modificado de McKendrick (2000).

p2= Lavado + Povidin solución 1 % 60´ + Kilol 30 gotas.0.10 $L^{-1}$ agua destilada 30´ + Benomil 1 $g.L^{-1}$ + NaOCl 3 % 10´ + enjuagues Modificado de Garro (2009).

p3= Lavado + Povidin jabón 1 % 30´ + Fungicidas (Benomil 1 $g.L^{-1}$ agua + Phyton 0,5 ml. 0,10$L^{-1}$ agua destilada) 30´ + NaOCl 1 % 8´ + Agua destilada + enjuagues Modificado de Vaca (2010).

b) Medios de cultivo para la introducción (M)

m1= MS 4,4g.$L^{-1}$, agar 5,5 g.$L^{-1}$, azúcar 30 g.$L^{-1}$, carbón activado 0,5 g.$L^{-1}$ Sanz (2007).

m2= WPM 2,3 g.$L^{-1}$, agar 5,5 g.$L^{-1}$, azúcar 30 g.$L^{-1}$, carbón activado 0,5 g.$L^{-1}$ Mohan (2010).

### 2.5.3.2 Tratamientos

El número de tratamientos que se aplicaron fueron 6 y resultaron de la interacción de los tres factores en estudio mencionados anteriormente (Tabla 9).

Tabla 9.
Tratamientos de desinfección e introducción de semillas de *Buddleja incana in vitro* en INIAP, Cutuglahua-Pichincha, 2014.

| T | CODIFICACIÓN | DESCRIPCIÓN |
|---|---|---|
| $T_1$ | $p_1m_1$ | Lavado+ Povidin solución 1 % 60´ + Fungicidas (Phyton 1 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 1 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada) 60´ + NaOCl al 1 % + Tween 20 10´ + enjuagues. Cultivada: Medio MS1X. |
| $T_2$ | $p_1m_2$ | Lavado + Povidin solución 1 % 60´ + Fungicidas (Phyton 1 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 1 ml. 0,15$L^{-1}$ agua destilada) 60´ + NaOCl al 1 % + Tween 20 10´ + enjuagues. Cultivada: Medio WPM1X. |
| $T_3$ | $p_2$ $m_1$ | Lavado + Povidin solución 1 % 60´ + Kilol 30 gotas. 0,10$L^{-1}$ agua destilada 30` + Benomil 1 g.$L^{-1}$ + NaOCl 3 % 10´+ enjuagues. Cultivada: Medio MS1X |
| $T_4$ | $p_2$ $m_2$ | Lavado + Povidin solución 1 % 60´ + Kilol 30 gotas. 0,10$L^{-1}$ agua destilada 30´ + Benomil 1 g.$L^{-1}$ + NaOCl 3 % 10´+ enjuagues. Cultivada: Medio WPM1X. |
| $T_5$ | $p_3$ $m_1$ | Lavado + Povidin jabón 1 % 30´ + Fungicidas (Benomil 1 g.$L^{-1}$ agua + Phyton 0,5 ml. 0,10$L^{-1}$ agua destilada) 30´ + NaOCl 1 % 8´ + Agua destilada + enjuagues. Cultivada: Medio MS1X. |
| $T_6$ | $p_3$ $m_2$ | Lavado + Povidin jabón 1 % 30´ + Fungicidas (Benomil 1 g.$L^{-1}$ agua + Phyton 0,5 ml. 0,10$L^{-1}$ agua destilada) 30´ + NaOCl 1 % 8´ + Agua destilada + enjuagues. Cultivada: Medio WPM1X. |

Nota: J. Jiménez, 2014.

### 2.5.3.3 Unidad Experimental

La unidad experimental estará conformada por un frasco de vidrio de 5,6 cm x 9 cm con tapa, con 15 ml de medio de cultivo. Se colocó diez semillas por frasco, se selló y envolvió con plástico film para evitar contaminación. El número total de observaciones fueron 60.

### 2.5.3.4 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3x2 (3 protocolos de desinfección por 2 medios para introducción) con 10 observaciones.

#### 2.5.3.4.1 Esquema del análisis de varianza

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un protocolo de desinfección (Tabla 10).

Tabla 10.
ADEVA para el establecimiento de un protocolo de *Buddleja incana* INIAP, Cutuglahua-Pichincha, 2014.

| Fuente de Variación (F de V) | Grados de libertad (GL) |
|---|---|
| Total | 59 |
| Tratamientos | 5 |
| Protocolo de desinfección (P) | 2 |
| Medio de introducción (M) | 1 |
| P x M | 2 |
| Error Experimental | 54 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

### 2.5.3.5 Análisis funcional

Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5 % para protocolo de desinfección e interacciones y un DMS para medios de introducción. Tukey el cual calcula como valor crítico para la identificación de diferencias significativas, una cantidad (DMS)

basada en el cuantil correspondiente de la distribución de rangos estudentizados para las variables en estudio que presentaron diferencias estadísticas significativas.

#### 2.5.3.6 Variables evaluadas

##### 2.5.3.6.1 Porcentaje de germinación (%)

Esta variable se evaluó a los 30 días, se estimó una relación porcentual entre el número de semillas germinadas/número total de semillas y multiplicado por 100 (Vásquez, 2007, pág. 12).

##### 2.5.3.6.2 Longitud de brote

Esta variable se evaluó con observaciones a los 30 y 45 días y se determinó el crecimiento de los brotes con la ayuda de una regla de 30 cm se midió desde la base del brote hasta el ápice de la hoja más alta. Las mediciones se promediaron y se expresaron en cm/brote (Miranda, 2011, pág. 16).

##### 2.5.3.6.3 Porcentaje de contaminación (%)

La evaluación se realizó a través de registro de presencia o ausencia de micelio o de colonias bacterianas en los explantes y en el medio de cultivo a los 30 días. Se calificó con 0 la ausencia y con 1 la presencia de contaminación. Se estimó una relación porcentual entre el número de explantes contaminados/número total de explantes y multiplicado por 100 (García, 2009, pág. 10)

##### 2.5.3.6.4 Tasa total de pérdida (%)

Se determinó el porcentaje de pérdida mediante el conteo de explantes muertos a los 30 días a partir de la siembra. Se estimó una relación porcentual entre el número de explantes perdidos/número total de explantes introducidos y multiplicado por 100 (Cárdenas, 2011, pág. 135).

2.5.3.7 Manejo específico del Experimento

a) Recolección del material vegetal

Las semillas se recolectaron en el vivero forestal de la localidad de San Juan ubicada en Chimborazo. Se transportaron las semillas en sobres de manila hasta el laboratorio de Biotecnología de la EESC.

b) Desinfección del explante

Se realizó una pre- desinfección en el laboratorio, las semillas fueron sumergidas en una solución de agua con detergente para eliminar posibles contaminantes como polvo e insectos. Además se sumergieron en una solución de Povidin jabón 1 % + Benomil 1 $g.L^{-1}$ (Figura 6).
Para la desinfección se utilizaron los métodos propuestos a continuación:

PROTOCOLO 1: Modificado de McKendrick (2000).

En el laboratorio las semillas fueron lavadas con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente. Se colocaron las semillas en Povidin solución 1 % durante 60 minutos y en una solución de fungicidas (Phyton 1 ml. $0,15L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 1 ml. $0,15L^{-1}$ agua destilada) durante 60 minutos.

Las semillas fueron llevadas a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % más tres gotas de Tween 20 durante 10 minutos. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril.

PROTOCOLO 2: Modificado de Garro (2009).

En el laboratorio las semillas fueron lavadas con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente. Las semillas fueron colocadas en una solución de Povidin 1 % más 30 gotas de Kilol

durante 30 minutos. Pasado este tiempo se sumergen las semillas en Benomil 1 $g.L^{-1}$ durante 30 minutos. Se colocan las semillas en servilletas y se llevan a refrigeración durante toda la noche.

Las semillas fueron llevadas a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 10 minutos. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril.

PROTOCOLO 3: Modificado de Vaca (2010).

En el laboratorio las semillas fueron lavadas con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente. Las semillas fueron colocadas en Povidin jabón 1 % durante 30 minutos. Pasado este tiempo se sumergen las semillas en fungicidas (Benomil 1 $g.L^{-1}$ + Phyton 0,5 ml. $0,10L^{-1}$ agua destilada) durante 30 minutos.

Las semillas fueron llevadas a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 8 minutos. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril (Figura 6).

Desinfección de semillas de *B. incana.*

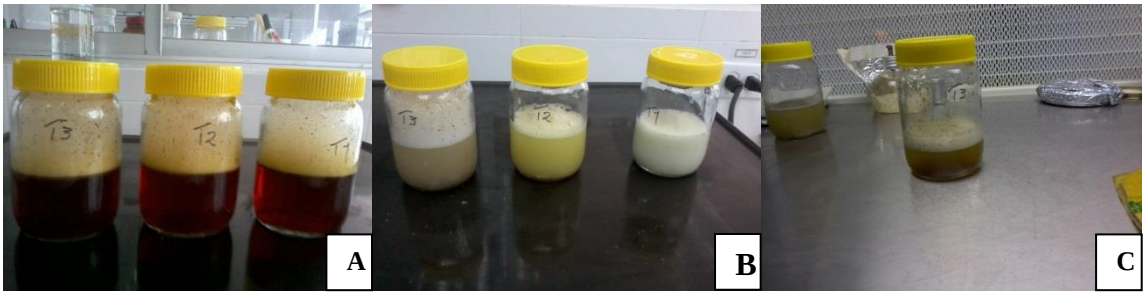



Figura 6. Desinfección de semillas. A) Semillas en Povidin solución 1 % B) Semillas en solución de fungicidas C) Semillas en solución de hipoclorito de sodio.
Elaborado por: Jiménez, 2014.

2.5.4.1 Factores en estudio brotes de *B. incana*

a) Protocolos de desinfección (P)

p1= Lavado + Povidin solución 1 % 20´ + Fungicidas (Benomil 1 $g.L^{-1}$ + Phyton 1 ml. $0,10L^{-1}$ + Rinfapicina 0,5 ml. $0,10L^{-1}$) 60´ + Alcohol 70 % 1´ + NaOCl 2 % 15´+ agua destilada Modificado de Cárdenas (2011).

p2= Lavado + Povidin solución 1 % + Kilol 20 gotas. $0,10L^{-1}$ agua destilada 30´ + Benomil 1 $g.L^{-1}$ 90´+ Alcohol 70 % 30´´ + NaOCl 1 % 15´+ Carbón activado (0,5 $g.L^{-1}$) Modificado de Vallejo (1988).

p3= Lavado + Povidin solución 1 % 60´ + Carbón activado 0,5 $g.L^{-1}$ + Fungicidas (Phyton 0,5 ml. $0,10L^{-1}$ + Carbendazim 0,5 ml. $0,10L^{-1}$) + Kilol 30 gotas. $0,10L^{-1}$ + Ácido ascórbico 100 ppm 20´ + NaOCl 0,5 % 60´+ NaOCl 1 % 10´ + Tween 20 + agua destilada Modificado de Laboratorio Cultivo de Tejidos-LCT-INIAP (2014).

b) Medios de cultivo para la introducción (M)

m1= MS $4,4g.L^{-1}$, agar 5,5 $g.L^{-1}$, azúcar 30 $g.L^{-1}$, carbón activado 0,5 $g.L^{-1}$ Sanz (2007).

m2= WPM 2,3 $g.L^{-1}$, agar 5,5 $g.L^{-1}$, azúcar 30 $g.L^{-1}$, carbón activado 0,5 $g.L^{-1}$ Mohan (2010).

2.5.4.2 Tratamientos

El número de tratamientos que se aplicaron fueron 6 y resultaron de la interacción de los tres factores en estudio mencionados anteriormente (Tabla 11).

Tabla 11.
Tratamientos de desinfección e introducción de brotes de *Buddleja incana* en INIAP, Cutuglahua-Pichincha, 2014.

| T | CODIFICACIÓN | DESCRIPCIÓN |
|---|---|---|
| $T_1$ | $p_1m_1$ | Lavado + Povidin solución 1 % 20´ + Fungicidas (Benomil 1 $g.L^{-1}$ + Phyton 1 ml. 0,10$L^{-1}$ + Rinfapicina 0,5 ml. 0,10$L^{-1}$) 60´+ Alcohol 70 % 1´+ NaOCl 2 % 15´+ agua destilada. Cultivada: Medio MS1X. |
| $T_2$ | $p_1m_2$ | Lavado + Povidin solución 1 % 20´ + Fungicidas (Benomil 1 $g.L^{-1}$ + Phyton 1 ml. 0,10$L^{-1}$+ Rinfapicina 0,5 ml. 0,10$L^{-1}$) 60´+ Alcohol 70 % 1´+ NaOCl 2 % 1´+ agua destilada. Cultivada: Medio WPM1X. |
| $T_3$ | $p_2m_1$ | Lavado + Povidin solución 1 % + Kilol 20 gotas. 0,10$L^{-1}$ agua destilada 30´ + Benomil 1 $g.L^{-1}$ 90´ + Alcohol 70 % 30´´ + NaOCl 1 % 15´ + Carbón activado (0,5 $g.L^{-1}$). Cultivada: Medio MS1X. |
| $T_4$ | $p_2 m_2$ | Lavado + Povidin solución 1 % + Kilol 20 gotas. 0,10$L^{-1}$ agua destilada 30´ + Benomil 1 $g.L^{-1}$ 90´ + Alcohol 70 % 30´´ + NaOCl 1 % 15´ + Carbón activado (0,5 $g.L^{-1}$). Cultivada: Medio WPM1X. |
| $T_5$ | $p_3m_1$ | Lavado + Povidin solución 1 % 60´ + Carbón activado 0,5 $g.L^{-1}$+ Fungicidas (Phyton 0,5 ml. 0,10$L^{-1}$ + Carbendazim 0,5 ml. 0,10$L^{-1}$) + Kilol 30 gotas. 0,10$L^{-1}$ + Ácido ascórbico 100 ppm 20´ + NaOCl 0,5 % 60´ + NaOCl 1 % 10´ + Tween 20 + agua destilada. Cultivada: Medio MS1X. |
| $T_6$ | $p_3m_2$ | Lavado + Povidin solución 1 % 60´ + Carbón activado 0,5 $g.L^{-1}$+ Fungicidas (Phyton 0,5 ml. 0,10$L^{-1}$ + Carbendazim 0,5 ml. 0,10$L^{-1}$) + Kilol 30 gotas. 0,10$L^{-1}$ + Ácido ascórbico 100 ppm 20´ + NaOCl 0,5 % 60´ + NaOCl 1 % 10´ + Tween 20 + agua destilada. Cultivada: Medio WPM1X. |

Nota: J. Jiménez, 2014.

#### 2.5.4.3 Unidad Experimental

La unidad experimental estará conformada por un tubo de ensayo de 1,5 cm x 15 cm con tapa, con 5 ml de medio de cultivo. Se colocó 1 brote por tubo, se selló y envolvió con plástico film para evitar contaminación. El número total de observaciones fueron 60.

#### 2.5.4.4 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 3x2 (3 protocolos de desinfección por 2 medios para introducción) con 10 observaciones.

##### 2.5.4.4.1 Esquema del análisis de varianza

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un protocolo de desinfección (Tabla 12).

Tabla 12.
ADEVA para el establecimiento de un protocolo de *Buddleja incana* INIAP, Cutuglahua-Pichincha, 2014.

| Fuente de Variación (F de V) | Grados de libertad (GL) |
|---|---|
| Total | 59 |
| Tratamientos | 5 |
| Protocolo de desinfección (P) | 2 |
| Medio de introducción (M) | 1 |
| P x M | 2 |
| Error Experimental | 54 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

#### 2.5.4.5 Análisis funcional

Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5 % para protocolo de desinfección e interacciones y un DMS para medios de introducción. Tukey se utilizó porque calcula como valor crítico para la identificación de diferencias significativas, una cantidad (DMS) basada en el cuantil correspondiente de la distribución de rangos estudentizados para las variables en estudio que presentaron diferencias estadísticas significativas.

#### 2.5.4.6 Variables evaluadas

##### 2.5.4.6.1 Porcentaje de brotación (%)

Esta variable se evaluó a los 30 días, se estimó una relación porcentual entre el número total de yemas brotadas/número total de yemas y multiplicado por 100 (Bautista, 1997, pág. 3)

##### 2.5.4.6.2 Longitud de brote

Esta variable se evaluó con observaciones a los 30 días y se determinó el crecimiento de los brotes con la ayuda de una regla de 30 cm se midió desde la base del brote hasta el ápice de la hoja más alta. Las mediciones se promediaron y se expresaron en cm/brote (Miranda, 2011, pág. 16).

##### 2.5.4.6.3 Porcentaje de contaminación (%)

La evaluación se realizó a través de registro de presencia o ausencia de micelio o de colonias bacterianas en los explantes y en el medio de cultivo a los 30 días. Se calificó con 0 la ausencia y con 1 la presencia de contaminación. Se estimó una relación porcentual entre el número total de explantes contaminadas/número total de explantes y multiplicado por 100 (García, 2009, pág. 10)

##### 2.5.4.6.4 Porcentaje de oxidación (%)

La evaluación se realizó a través de registro de presencia o ausencia de oxidación en los explantes y a los 30 días. Se calificó con 0 la ausencia y con 1 la presencia. Se estimó una relación porcentual entre el número total de explantes oxidados/número total de explantes y multiplicado por 100 (Miranda, 2011, pág. 16).

2.5.4.6.5 Tasa total de pérdida (%)

Se determinó el porcentaje de pérdida mediante el conteo de explantes muertos a los 30 días a partir de la siembra. Se estimó una relación porcentual entre el número total de explantes perdidos/número total de explantes introducidos y multiplicado por 100 (Cárdenas, 2011, pág. 135).

2.5.4.7 Manejo específico del Experimento

a) Recolección del material vegetal

Se procedió a cortar 60 yemas axilares y apicales de 2-3 cm de largo de ramas jóvenes, con una tijera desinfectada con alcohol al 70 %. Se colocaron los explantes en un recipiente con agua destilada.

b) Desinfección del explante

Se realizó una pre- desinfección en el laboratorio los brotes fueron sumergidos en una solución de agua con detergente y posteriormente cepillados para eliminar posibles contaminantes como polvo e insectos (Figura 7).

Para la desinfección se utilizaron los métodos propuestos a continuación:

PROTOCOLO 1: Modificado de Cárdenas (2011).

En el laboratorio los brotes fueron lavados con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente. Se colocaron los brotes en Povidin solución 1 % por 20 minutos y se enjuagó con agua destilada. Posteriormente se colocó los brotes en fungicidas (Benomil 1 $g.L^{-1}$ + Phyton 1 ml. $0,10L^{-1}$+ Rinfapicina 0,5 ml. $0,10L^{-1}$) durante 60 minutos.

Los brotes fueron llevados a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron los brotes en alcohol al 70 % durante 1 minuto y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 15 minutos. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril.

PROTOCOLO 2: Modificado de Vallejo (1988).

En el laboratorio los brotes fueron lavados con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente. Se colocaron los brotes en Povidin solución 1 % con 20 gotas de Kilol durante 30 minutos. Los brotes fueron sumergidos en Benomil 1 $g.L^{-1}$ durante 90 minutos.

Los brotes fueron llevados a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron los brotes en alcohol al 70 % durante 30 segundos y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 15 minutos. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril. Se colocó los brotes en carbón activo 0,5 $g.L^{-1}$ para evitar la oxidación de los mismos.

PROTOCOLO 3: Modificado de Laboratorio Cultivo Tejidos-LCT-INIAP (2014).

En el laboratorio los brotes fueron lavados con agua de la llave y detergente; posteriormente se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar todo el detergente. Se colocaron los brotes en Povidin solución 1 % durante 60 minutos. Los brotes fueron colocados en fungicidas (Phyton 0,5 ml. $0,10L^{-1}$ agua destilada + Carbendazim 0,5 ml. $0,10L^{-1}$ agua destilada + 30 gotas de Kilol + ácido ascórbico 100 ppm) durante 20 minutos. Durante la desinfección se añadió carbón activado 0,5 $g.L^{-1}$.

Los brotes fueron llevados a cámara de flujo laminar en donde se realizó una segunda desinfección. Se colocaron los brotes en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 60 minutos. Pasado los 60 minutos los brotes fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 10 minutos más tres gotas de Tween 20. Se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril (Figura 7).

Desinfección de brotes de *B. incana*.

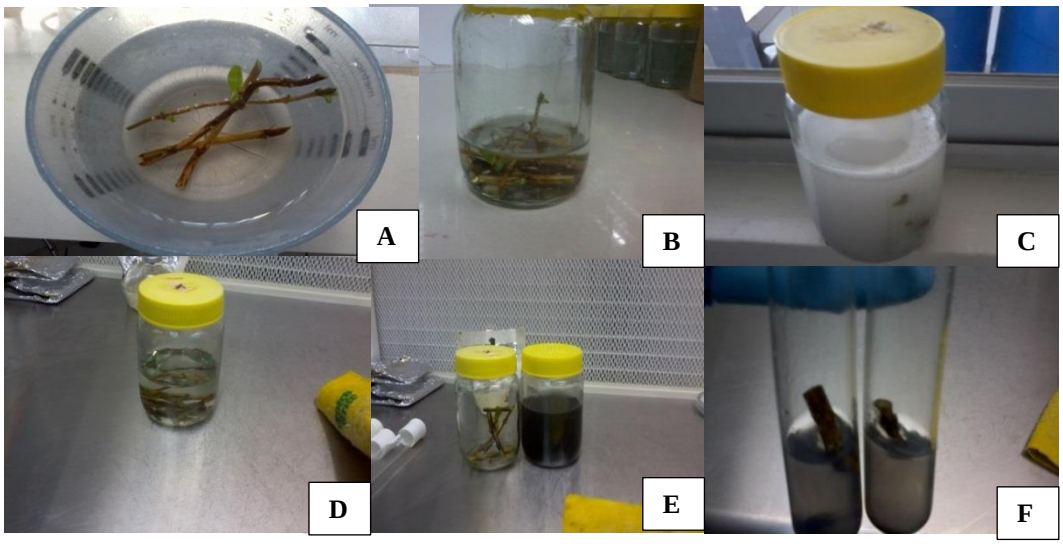



Figura 7. Desinfección de brotes. A) Lavado con agua y detergente B) Brotes en Povidin solución 1% con ácido ascórbico C) Brotes en solución de fungicidas D) Brotes en solución de hipoclorito de sodio E) Brotes en solución de carbón activado F) Siembra en medios MS y Woody.
Elaborado por: Jiménez, 2014

### 2.5.5 ETAPA II: Multiplicación *in vitro* de *C. catenaeformis* y *B. incana*

#### 2.5.5.1 Factores en estudio vitroplantas de *C. catenaeformis*

a) Medios de multiplicación (M)

m1= MS 4,4 $g.L^{-1}$+ Agar 6 $g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$ Sanz (2007).
m2= Woody 2,3 $g.L^{-1}$ + Agar 6 $g.L^{-1}$ + Sacarosa 30 $g.L^{-1}$ Victoriano (2010).

b) Hormonas (H)

h1= Benziladenina (BAP)
h2= Tidiazuron (TDZ)

c) Dosis de las hormonas (D)

d0= Dosis baja (sin hormonas)

d1= Dosis media (0,5 ppm)

d2= Dosis alta (1,0 ppm)

### 2.5.5.2 Tratamientos

El número de tratamientos que se aplicaron fueron 12 y resultaron de la interacción de los factores antes mencionados (Tabla 13).

Tabla 13.
Tratamientos para la multiplicación *in vitro* de vitroplantas de *C. catenaeformis* Cutuglagua-Pichincha, 2014.

| T | CODIFICACIÓN | DESCRIPCIÓN |
|---|---|---|
| $T_1$ | $m_1h_1d_0$ | MS1X + Agar 6 $g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: BAP. Dosis: sin hormonas. |
| $T_2$ | $m_1h_1d_1$ | MS1X + Agar 6$g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: BAP Dosis: 0,5 ppm |
| $T_3$ | $m_1h_1d_2$ | MS1X + Agar 6 $g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: BAP. Dosis: 1,0 ppm |
| $T_4$ | $m_1h_2d_0$ | MS1X + Agar 6$g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: TDZ. Dosis: sin hormonas. |
| $T_5$ | $m_1h_2d_1$ | MS1X + Agar 6 $g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: TDZ. Dosis: 0,5 ppm |
| $T_6$ | $m_1h_2d_2$ | MS1X + Agar 6 $g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: TDZ. Dosis: 1,0 ppm |
| $T_7$ | $m_2h_1d_0$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: BAP. Dosis: sin hormonas. |
| $T_8$ | $m_2h_1d_1$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona : BAP Dosis: 0,5 ppm |
| $T_9$ | $m_2h_1d_2$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: BAP. Dosis: 1,0 ppm |
| $T_{10}$ | $m_2h_2d_0$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: TDZ. Dosis: sin hormonas. |
| $T_{11}$ | $m_2h_2d_1$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: TDZ. Dosis: 0,5 ppm |
| $T_{12}$ | $m_2h_2d_2$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: TDZ Dosis: 1,0 ppm |

Nota: J. Jiménez, 2014.

2.5.5.3 Unidad Experimental

La unidad experimental estuvo conformada por un frasco de 5,6 cm x 9 cm con 15 ml de medio de cultivo. Se colocaron 5 brotes por frasco, libres de agentes contaminantes, provenientes de la etapa de introducción. Se selló y envolvió con plástico film para evitar contaminación. El número total de observaciones fueron 120.

2.5.5.4 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 2x2x3 (2 medios para multiplicación, 2 tipos de hormonas por 3 dosis diferentes) con 10 observaciones.

2.5.5.4.1 Esquema del análisis de varianza

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un medio de multiplicación (Tabla 14).

Tabla 14.
ADEVA para el establecimiento de un protocolo de *C. catenaeformis* INIAP, Cutuglahua-Pichincha, 2014.

| Fuente de Variación (F de V) | Grados de libertad (GL) |
|---|---|
| Total | 119 |
| Tratamientos | 11 |
| Medios de multiplicación (M) | 1 |
| Hormonas (H) | 1 |
| Dosis (D) | 2 |
| MxH | 1 |
| MxD | 2 |
| DxH | 2 |
| MxHxD | 2 |
| Error Experimental | 108 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

#### 2.5.5.5 Análisis funcional

Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5 % para dosis e interacciones y un DMS para medios de multiplicación, hormonas e interacción de las mismas. Tukey se utilizó porque calcula como valor crítico para la identificación de diferencias significativas, una cantidad (DMS) basada en el cuantil correspondiente de la distribución de rangos estudentizados para las variables en estudio que presentaron diferencias estadísticas significativas.

#### 2.5.5.6 Variables evaluadas

##### 2.5.5.6.1 Altura de brotes

Esta variable se evaluó a los 30 y 45 días a partir de la siembra, se midió desde la base del tallo hasta la yema terminal (punta), se registraron los datos en cm con la ayuda de una regla de 30 cm (Miranda, 2011, pág. 16)

##### 2.5.5.6.2 Número de nudos

Se contabilizó el número de nudos que presentó cada uno de los explantes a los 30 días después de la siembra, por medio del conteo por observación (Borges, 2009, pág. 4).

##### 2.5.5.6.3 Índice de multiplicación

El índice de multiplicación se evaluó a los 30 días, posteriores a la siembra, se calculó tomando en cuenta el número de nudos/ número de plantas (Borges, 2009, pág. 5).

#### 2.5.5.6.4 Longitud de raíces (cm)

Se determinó la longitud de la raíz principal a los 30 días de haber sido sembrados los brotes. Se utilizó una regla, se midió desde la base del tallo hasta la terminación de la raíz, la medida se expresó en cm (Guevara, 2013, pág. 8).

#### 2.5.5.6.5 Tasa total de pérdida (%)

Se determinó el porcentaje de pérdida mediante el conteo de explantes muertos a los 30 días a partir de la siembra. Se estimó una relación entre el número de explantes perdidos/ número de explantes introducidos y multiplicado por 100 (Cárdenas, 2011, pág. 135).

### 2.5.5.7 Manejo específico del Experimento

#### 2.5.5.7.1 Medios de cultivo

Tabla 15.
Composición medios de cultivo para multiplicación de *C. catenaeformis.*

| Medios de cultivo | Composición del medio |
|---|---|
| Murashige y Skoog (MS) | MS completo suplementado con: 5,5 $g.L^{-1}$ agar, 30 $g.L^{-1}$ azúcar comercial con pH=5,7. |
| | MS completo suplementado con: 5,5 $g.L^{-1}$ agar, 30 $g.L^{-1}$ azúcar comercial, 0,5 ppm BAP con pH=5,7. |
| | MS completo suplementado con: 5,5 $g.L^{-1}$ agar, 30 $g.L^{-1}$ azúcar comercial, 1 ppm BAP con pH=5,7. |
| Woody Plant Medium (WPM) | WPM completo suplementado con: 5,5 $g.L^{-1}$ agar, 20 $g.L^{-1}$ azúcar comercial con pH=5,7. |
| | WPM completo suplementado con: 5,5 $g.L^{-1}$ agar, 20 $g.L^{-1}$ azúcar comercial, 0,5 ppm BAP con pH=5,7. |
| | WPM completo suplementado con: 5,5 $g.L^{-1}$ agar, 20 $g.L^{-1}$ azúcar comercial, 1 ppm BAP con pH=5,7. |

Nota: J. Jiménez, 2014.

2.5.6.1 Factores en estudio vitroplantas de *B.incana*

a) Medios de multiplicación (M)

m1= MS 4,4 $g.L^{-1}$+ Agar 6 $g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$ Sanz (2007).
m2= Woody 2,3 $g.L^{-1}$ + Agar 6 $g.L^{-1}$ + Sacarosa 30 $g.L^{-1}$ Victoriano (2010).

b) Hormonas (H)

h1= Benziladenina (BAP)
h2= Ácido giberélico ($AG_3$)

c) Dosis de las hormonas (D)

d0= Dosis baja (sin hormonas)
d1= Dosis media (0,5 ppm)
d2= Dosis alta (1,0 ppm)

2.5.6.2 Tratamientos

El número de tratamientos que se aplicaron fueron 12 y resultaron de la interacción de los factores antes mencionados (Tabla 16).

Tabla 16.
Tratamientos para la multiplicación *in vitro* de vitroplantas de *Buddleja incana* Cutuglahua-Pichincha, 2014.

| T | CODIFICACIÓN | DESCRIPCIÓN |
|---|---|---|
| $T_1$ | $m_1h_1d_0$ | MS1X + Agar 6 $g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: BAP. Dosis: sin hormonas. |
| $T_2$ | $m_1h_1d_1$ | MS1X + Agar 6$g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: BAP Dosis: 0,5 ppm |
| $T_3$ | $m_1h_1d_2$ | MS1X + Agar 6 $g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: BAP. Dosis: 1,0 ppm |
| $T_4$ | $m_1h_2d_0$ | MS1X + Agar 6$g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: $AG_3$. Dosis: sin hormonas. |
| $T_5$ | $m_1h_2d_1$ | MS1X + Agar 6 $g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: $AG_3$. Dosis: 0,5 ppm |
| $T_6$ | $m_1h_2d_2$ | MS1X + Agar 6 $g.L^{-1}$+ Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: $AG_3$. Dosis: 1,0 ppm |
| $T_7$ | $m_2h_1d_0$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: BAP. Dosis: sin hormonas. |
| $T_8$ | $m_2h_1d_1$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona : BAP Dosis: 0,5 ppm |
| $T_9$ | $m_2h_1d_2$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: BAP. Dosis: 1,0 ppm |
| $T_{10}$ | $m_2h_2d_0$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: $AG_3$. Dosis: sin hormonas. |
| $T_{11}$ | $m_2h_2d_1$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: $AG_3$. Dosis: 0,5 ppm |
| $T_{12}$ | $m_2h_2d_2$ | WPM1X + Agar 6 $g.L^{-1}$ +Sacarosa 30 $g.L^{-1}$. Hormona: $AG_3$. Dosis: 1,0 ppm |

Nota: J. Jiménez, 2014.

### 2.5.6.3 Unidad Experimental

La unidad experimental estuvo conformada un frasco de 5,6 cm x 9 cm con tapa, con 15 ml de medio de cultivo. Se colocaron 5 brotes por frasco, libres de agentes contaminantes, provenientes de la etapa de introducción. Se selló y envolvió con plástico film para evitar contaminación. El número total de observaciones fueron 120.

#### 2.5.6.4 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) dispuesto en arreglo factorial 2x2x3 (2 medios para multiplicación, 2 tipos de hormonas por 3 dosis diferentes) con 10 observaciones.

##### 2.5.6.4.1 Esquema del análisis de varianza

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un medio de multiplicación (Tabla 17).

Tabla 17.
ADEVA para el establecimiento de un protocolo de *Buddleja incana* INIAP, Cutuglahua-Pichincha, 2014.

| Fuente de Variación (F de V) | Grados de libertad (GL) |
|---|---|
| Total | 119 |
| Tratamientos | 11 |
| Medios de multiplicación (M) | 1 |
| Hormonas (H) | 1 |
| Dosis (D) | 2 |
| MxH | 1 |
| MxD | 2 |
| DxH | 2 |
| MxHxD | 2 |
| Error Experimental | 108 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

#### 2.5.6.5 Análisis funcional

Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5 % para dosis e interacciones y un DMS para medios de multiplicación, hormonas e interacción de la misma. Tukey se utilizó porque calcula como valor crítico para la identificación de diferencias significativas, una cantidad (DMS) basada en el cuantil correspondiente de la

distribución de rangos estudentizados para las variables en estudio que presentaron diferencias estadísticas significativas.

#### 2.5.6.6 Variables evaluadas

##### 2.5.6.6.1 Altura de brotes

Esta variable se evaluó a los 45 días a partir de la siembra, se midió desde la base del tallo hasta la yema terminal (punta), se registraron los datos en cm con la ayuda de una regla de 30 cm (Miranda, 2011, pág. 16).

##### 2.5.6.6.2 Número de nudos

Se contabilizó el número de nudos que presentó cada uno de los explantes a los 30 días después de la siembra, por medio del conteo por observación (Borges, 2009, pág. 4).

##### 2.5.6.6.3 Índice de multiplicación

El índice de multiplicación se evaluó a los 30 días, posteriores a la siembra, se calculó tomando en cuenta el número de nudos/ número de plantas (Borges, 2009, pág. 5).

##### 2.5.6.6.4 Longitud de raíces (cm)

Se determinó la longitud de la raíz principal a los 30 días de haber sido sembrados los brotes. Se utilizó una regla, se midió desde la base del tallo hasta la terminación de la raíz, la medida se expresó en cm (Guevara, 2013, pág. 8).

#### 2.5.6.6.5 Tasa total de pérdida (%)

Se determinó el porcentaje de pérdida mediante el conteo de explantes muertos a los 30 días a partir de la siembra. Se estimó una relación entre el número de explantes perdidos/ número de explantes introducidos multiplicado por 100 (Cárdenas, 2011, pág. 135).

### 2.5.6.7 Manejo específico del Experimento

#### 2.5.6.7.1 Medios de cultivo

Tabla 18.
Composición medios de cultivo para multiplicación de *Buddleja incana.*

| Medios de cultivo | Composición del medio |
|---|---|
| Murashige y Skoog (MS) | MS completo suplementado con: 5,5 g.$L^{-1}$ agar, 30 g.$L^{-1}$ azúcar comercial con pH=5,7. |
| | MS completo suplementado con: 5,5 g.$L^{-1}$ agar, 30 g.$L^{-1}$ azúcar comercial, 0,5 ppm BAP con pH=5,7. |
| | MS completo suplementado con: 5,5 g.$L^{-1}$ agar, 30 g.$L^{-1}$ azúcar comercial, 1 ppm BAP con pH=5,7. |
| Woody Plant Medium (WPM) | WPM completo suplementado con: 5,5 g.$L^{-1}$ agar, 20 g.$L^{-1}$ azúcar comercial con pH=5,7. |
| | WPM completo suplementado con: 5,5 g.$L^{-1}$ agar, 20 g.$L^{-1}$ azúcar comercial, 0,5 ppm BAP con pH=5,7. |
| | WPM completo suplementado con: 5,5 g.$L^{-1}$ agar, 20 g.$L^{-1}$ azúcar comercial, 1 ppm BAP con pH=5,7. |

Nota: J. Jiménez, 2014

#### 2.5.6.7.2 Multiplicación de explantes

En la cámara de flujo laminar se eliminaron hojas y raíces presentes hasta obtener un brote de 1-2 cm de longitud. Los explantes se sembraron en frascos de vidrio con

medio de cultivo para multiplicación, se incubaron durante 45 días, bajo condiciones controladas (Figura 8).

Multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana*

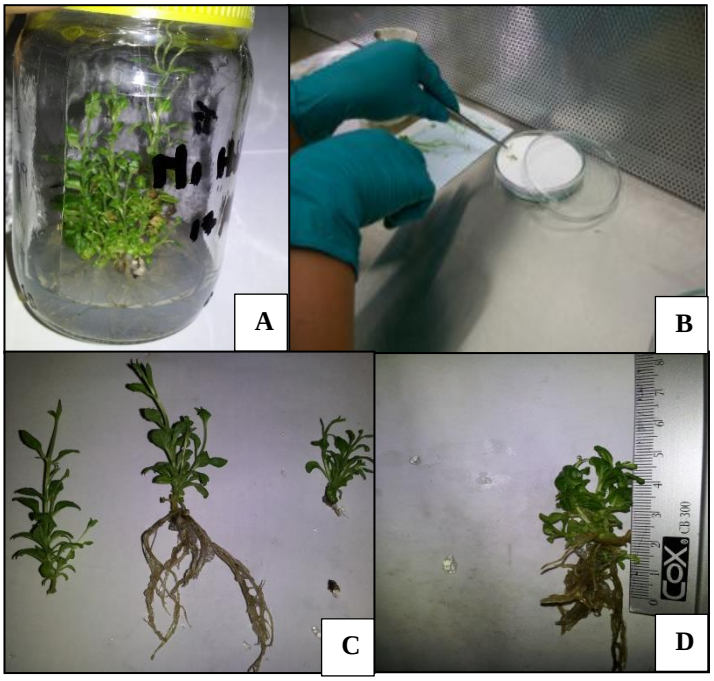



Figura 8. A) Material vegetal de *Buddleja incana*. B) Corte de los explantes. C y D) Evaluación altura de brotes, número de nudos y longitud de raíces.
Elaborado por: Jiménez, 2014.

# CAPÍTULO 3

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 3.1 Fase I: Introducción y establecimiento *in vitro* de *Cedrelinga catenaeformis* y *Buddleja incana*

### 3.1.1 Análisis de las variables para la etapa de introducción y establecimiento de semillas de *C. catenaeformis.*

#### 3.1.1.1 Porcentaje de contaminación

En la tabla 19, se observa la presencia de contaminación por hongos y/o bacterias para los tratamientos T1 y T2 (Protocolo N°1); T5 y T6 (Protocolo N°3), ver (Anexo 1 y 2). Los tratamientos T3 y T4 (Protocolo N°2) no fueron evaluados, ya que las semillas presentaron oxidación, obteniendo una tasa de pérdida del 100 %, el tratamiento T1 presentó menor porcentaje de contaminación siendo este el tratamiento que mejor respuesta dio al establecimiento *in vitro* de semillas de *C. catenaeformis.*

Tabla 19.
Porcentaje de contaminación a los 30 días.

| Contaminación | |
|---|---|
| Tratamientos/ Protocolos | Porcentaje (%) |
| T1 (P1) | 40 |
| T2 (P1) | 60 |
| T3 (P2) | No evaluado |
| T4 (P2) | No evaluado |
| T5 (P3) | 60 |
| T6 (P3) | 60 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En la tabla 19, el tratamiento con mejor actividad de desinfección sobre los explantes fue el tratamiento T1, que corresponde al protocolo Nº 1 en el que se utilizó NaOCl 2 % por 20 min, obteniendo como resultado un 40 % de contaminación, hay que tomar en cuenta que las semillas no cumplían con las condiciones fitosanitarias adecuadas

(Anexo 3). Los resultados mostraron altos índices de contaminación y bajos porcentajes de supervivencia. Los resultados no corroboran con Rodríguez A (2010), ya que el porcentaje de contaminación reportado en su estudio es del 10 %. Rodríguez R (2005), reportó en su investigación con semillas de *Pinus radiata* que la aplicación de NaClO al 2 % por 15 min no resultó efectiva para el control de microorganismos contaminantes. En otro estudio, Cantos, Liñán, Pérez, & Troncoso (1998), mostraron que el proceso de desinfección de semillas de *Gleditsia amorphoides* tuvo un porcentaje de 10 % de contaminación por hongos y bacterias haciendo efectivo el uso de etanol 70 % (1 min) seguido de solución comercial de NaOCl al 1 % (20 min). Borges (2009), menciona en su estudio con *Dioscorea alata* que a medida que se aumenta la concentración de NaOCl y el tiempo de exposición, se disminuye el porcentaje de contaminación y se incrementa la necrosis de los tejidos.

### 3.1.1.2 Porcentaje de oxidación

En la tabla 20, se observa la presencia de oxidación para los tratamientos T3 y T4 con el 100 %, mientras que para los tratamientos T1, T2, T5 y T6 del 0 %, siendo estos los tratamientos que mejor respuesta dieron al establecimiento *in vitro* de semillas de *C. catenaeformis.*

Tabla 20.
Porcentaje de oxidación a los 30 días.

| Oxidación | |
|---|---|
| Tratamientos/ Protocolos | Porcentaje (%) |
| T1 (P1) | 0 |
| T2 (P1) | 0 |
| T3 (P2) | 100 |
| T4 (P2) | 100 |
| T5 (P3) | 0 |
| T6 (P3) | 0 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En esta primera fase de desinfección para los tratamientos T3 y T4 pertenecientes al protocolo N°2 se utilizó etanol al 70 % por 10 segundos con la combinación de NaOCl 1 % por 20 min, dando como resultado un 100 % de oxidación. Las causas de

la oxidación pudieron deberse al tiempo de exposición de NaOCl, esto indicaría que el tiempo de exposición y la concentración de NaOCl tendrían una relación directamente proporcional con el porcentaje de supervivencia entre los tratamientos como lo afirman George y Sherrington (1984), en su disertación sobre la desinfección de estacas de cerezo. Cantos, Liñán, Pérez, & Troncoso (1998), no reporta resultados con respecto a oxidación.

En los tratamientos T1 y T2 pertenecientes al protocolo N°1 se utilizó antioxidantes y NaOCl 2 % por 20 min, la alta concentración de NaOCl no afectó a los explantes, debido a que el uso de antioxidantes controla la fenolización de los tejidos. Concepción (2005), menciona en su estudio con *Psidium guajava* que las características como polímero de los antioxidantes confieren funciones adsortivas específicas para determinadas moléculas de compuestos orgánicos como son los fenoles. En los tratamientos T5 y T6 pertenecientes a protocolo N°3 se utilizó NaOCl 1 % por 10 min corroborando con otros estudios que la concentración y tiempo de exposición influyen en el desarrollo de los explantes. Bejarano (2008), menciona que en su estudio con *Puya santossi* la utilización de NaOCl 1 % por 10 min hace efectiva la eliminación de microorganismos endógenos sin causar necrosamiento en los tejidos vegetales.

En otro estudio, Laynez (2006), mostró que el proceso de desinfección de *Manihot esculenta* se vió afectado por la concentración y el tiempo de inmersión, apreciándose que la solución de NaOCl 1 % por 20 min pasó de un 100 % de ápices vivos y no contaminados, a un 50 %, corroborándose de esta manera que la concentración y tiempo de exposición de NaOCl propuesto causó necrosamiento en los explantes. Además Laynez (2006), menciona que un tratamiento de desinfección aceptable desde el punto de vista práctico, es en donde se escoge el menor porcentaje de concentración de NaOCl por menor tiempo, con la intención de que el tejido sufra el menor daño posible dado por la fitoxicidad del cloro.

### 3.1.1.3 Porcentaje de germinación

En la tabla 21, se observa que para los tratamientos T1, T2 y T5, el porcentaje de germinación varía entre el 60 y 40 % respectivamente; para el tratamiento T1 con el

medio Murashige y Skoog (MS) el porcentaje de germinación es del 60 % siendo este el tratamiento que mejor respuesta dio en el establecimiento *in vitro* de semillas de *C. catenaeformis.*

Tabla 21.
Porcentaje de germinación de semillas de *C. catenaeformis* a los 30 días.

| Tratamientos/ Protocolos | Observaciones | Protocolos | Medios | % Germinación |
|---|---|---|---|---|
| T1 (P1) | 5 | P1 | M1 | 60 |
| T2 (P1) | 5 | P1 | M2 | 40 |
| T3 (P2) | 5 | P2 | M1 | 0 |
| T4 (P2) | 5 | P2 | M2 | 0 |
| T5 (P3) | 5 | P3 | M1 | 40 |
| T6 (P3) | 5 | P3 | M2 | 0 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En la Tabla 21 se observa que el tratamiento T1 con el medio de cultivo MS tuvo la mejor respuesta de germinación con un 60 %, lo cual corrobora con lo descrito por Rodríguez V (2000), en donde los valores de germinación para *Gleditsia amorphoides* utilizando MS fue del 80 %. En otro estudio, Malgren (2006), reportó que el medio de cultivo MS ha sido probado en la germinación y crecimiento con resultados óptimos gracias a su contenido de sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, lo que brinda un alto grado de nitrógeno y potasio, necesarios para la nutrición. Alzugaray (2013), reportó un 69 % de germinación en *Schinopsis balansae* concluyendo que el medio de cultivo MS es óptimo para el desarrollo de explantes.

### 3.1.2 Análisis de las variables para la etapa de introducción y establecimiento de brotes de *C. catenaeformis.*

#### 3.1.2.1 Porcentaje de contaminación

En la tabla 22, se observa la presencia de contaminación ya sea por hongos y/o bacterias para los tratamientos T1 y T2 (Protocolo N°1); T3 y T4 (Protocolo N°2) y

T5 (Protocolo N°3) ver (Anexo 4, 5 y 6), el tratamiento más efectivo es el T6 con el 0 %, lo cual indica que es el tratamiento que mejor respuesta da al establecimiento de brotes de *C. catenaeformis*.

Tabla 22.
Porcentaje de contaminación en *C. catenaeformis* a los 30 días.

| Contaminación | |
|---|---|
| Tratamientos/ Protocolos | Porcentaje (%) |
| T1 (P1) | 20 |
| T2 (P1) | 20 |
| T3 (P2) | 20 |
| T4 (P2) | 60 |
| T5 (P3) | 60 |
| T6 (P3) | 0 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En la Tabla 22, se observa que en esta etapa de desinfección el tratamiento con mejor actividad de desinfección sobre los explantes fue el tratamiento T6 que corresponde al protocolo Nº 3 en el que se utilizó fungicidas, NaOCl 0,5 % por 60 min, NaOCl 1 % por 10 min y Tween 20, dando como resultado un 0 % de contaminación. Trujillo (2008), en su investigación con *Vaccinium floribundum* utilizó dos concentraciones de NaOCl al 0,5 % por 30 min y NaOCl 2,5 % por 10-12 min reportando que el porcentaje de contaminación fue del 40 %. En otro estudio, Sosa (2009), menciona que en la etapa de desinfección de *Heliconia standley* obtuvo un porcentaje de contaminación 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 NaOCl que eliminó una gran cantidad de microorganismos presentes en el tejido, estos resultados son similares a los encontrados en el presente estudio.

### 3.1.2.2 Porcentaje de oxidación

En la Tabla 23, se observa la presencia de oxidación para los tratamientos T4, T5 y T6 con valores de 20 %, 20 % y 40 % respectivamente, siendo efectivos los

tratamientos T1, T2 y T3 con el 0 %, lo cual indica que son los tratamientos que mejor respuesta dieron al establecimiento *in vitro* de brotes de *C. catenaeformis*.

Tabla 23.
Porcentaje de la variable oxidación a los 30 días.

| Oxidación | |
|---|---|
| Tratamientos/ Protocolos | Porcentaje (%) |
| T1 (P1) | 0 |
| T2 (P1) | 0 |
| T3 (P2) | 0 |
| T4 (P2) | 20 |
| T5 (P3) | 20 |
| T6 (P3) | 40 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En los tratamientos T5 y T6 pertenecientes al protocolo N°3 se utilizó fungicidas, NaOCl 0,5 % por 60 min, NaOCl 1 % por 10 min y Tween 20, se observó un 20 % y 40 % de oxidación respectivamente, esto pudo deberse al tiempo de exposición de NaOCl. En los tratamientos T3 y T4 pertenecientes al Protocolo N°2 se utilizó NaOCl 1 % por 10 min observando de esta manera un 0 y 20 % de oxidación respectivamente. Rebolledo (2006), en su estudio con brotes de *Pinus pseudostrobus* reportó que la concentración de NaOCl 1 % por 10 min provocó oxidación de los explantes los cuales no mostraron respuesta alguna de desarrollo. En otro estudio, Patiño (2011), reportó que la exposición a NaOCl 1 % por 10 min provocó 100 % de oxidación en los tejidos de *Caesalpinia spinosa.* En los tratamientos T1 y T2 pertenecientes al protocolo N°1 se utilizó etanol 70 % por 30 seg y NaOCl 0,4 % por 1 min corrobando con otros autores que la baja concentración y exposición de NaOCl evitan en necrosamiento de los tejidos.

### 3.1.2.3 Porcentaje de brotación

En la tabla 24 el porcentaje de brotación de los tratamientos T1, T2, T4 y T6 fue de 20 % siendo estos los tratamientos que mejor respuesta dieron al establecimiento *in vitro* de brotes de *C. catenaeformis*.

Tabla 24.
Porcentaje de brotación en *C. catenaeformis* a los 30 días.

| Tratamientos/ Protocolos | Observaciones | Protocolos | Medios | % Brotación |
|---|---|---|---|---|
| T1 (P1) | 5 | P1 | M1 | 20 |
| T2 (P1) | 5 | P1 | M2 | 20 |
| T3 (P2) | 5 | P2 | M1 | 0 |
| T4 (P2) | 5 | P2 | M2 | 20 |
| T5 (P3) | 5 | P3 | M1 | 0 |
| T6 (P3) | 5 | P3 | M2 | 20 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En la tabla 24 se puede observar que la respuesta a brotación fue del 20 %, el bajo porcentaje de brotación pudo estar relacionado a la exposición de NaOCl y medio de cultivo. Patiño (2011), menciona que en su estudio con *Caesalpinia spinosa* la exposición a NaOCl por tiempos prolongados causó daños a los tejidos del explante retardando así la brotación.

Rojas F (2012), en su estudio con *Tectona grandis* reportó que después de permanecer las yemas 33 días en cultivo solo se observó que el 24 % de yemas brotó en ausencia de reguladores de crecimiento, sin embargo utilizando AIA a concentración de 0,005 $mg.L^{-1}$ se indujo la brotación al 56 %. Gamboa (1999), reporta que en *Gmelina arborea* la adición de 0,5 $mg.L^{-1}$ de BA indujo el mayor número de brotes, similares resultados fueron observados en *Dalbergia retusa* y *Terminalia arjuna.* En el tratamiento T1 se utilizó el medio de cultivo MS y en los tratamientos T2, T4 y T6 se utilizó el medio de cultivo WPM, siendo este el que mejor respuesta tuvo en porcentaje de brotación.

Parada (2009), en su estudio con *Prunus persica* reportó que utilizando medio de cultivo WPM se produjo un gran número de brotes (3-4) y su longitud fue de 13,7 mm. En otro estudio, Mora (2010), reportó que la alta concentración de sales en los medios de cultivo pueden ocasionar un retardo en la brotación y puede ser tóxicos para los tejidos como es el caso de *Vaccinium corymbosum*, esta especie respondió

en el medio de cultivo WPM ya que contiene reducción de la cantidad total de sales minerales.

### 3.1.3 Multiplicación de *Cedrelinga catenaeformis*

En esta fase de multiplicación para *C. catenaeformis* no se pudo desarrollar la investigación ya que presentó varios problemas en la obtención de explantes como se detalla a continuación: las semillas son recalcitrantes es decir que no soportan condiciones de sequedad y frío por lo que no pueden ser conservadas por largos períodos.

Manta (1990), menciona que las semillas son susceptibles a ataques por hongos (*Fusarium* sp. 92 %, *Amblyosporium* sp. 90 % y *Pestalotia* sp. 30 %) y a ataques de insectos *Merobruchus paquetae* (Coleóptora: *Bruchidae*) disminuyendo de esta manera el número de semillas. Además, la disponibilidad de éstas no siempre es anual ya que se han reportado años en los que no ha existido la presencia de floración y fructificación en los árboles.

La fenología está relacionada a los factores climáticos principalmente temperatura y precipitación, con el ritmo periódico de los fenómenos biológicos acomodados en el tiempo como la brotación, florescencia y maduración de frutos, el desarrollo y maduración de estos es un proceso que tarda aproximadamente 2 meses.

Durante el tiempo de observaciones no se alcanzaron a registrar gran cantidad de frutos en pleno estado de madurez ya que cuando éstos la inician, son visitados por numerosas aves que los consumen ávidamente, la excesiva precipitación en la zona de estudio hace que los frutos verdes caigan y no lleguen a la maduración (Figura 9).

“La cosecha de los frutos debe hacerse en fines de mayo, cuando toman una coloración café” (Manta, 1990, pág. 30).

Dendrofenograma Flor- Fruto de *C. catenaeformis*.

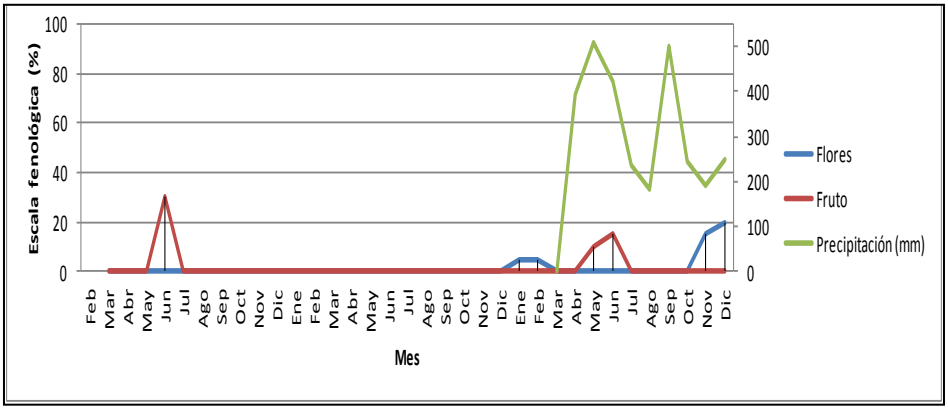



Figura 9. Relación entre precipitación, floración y fructificación de *C. catenaeformis*. Fuente: Barrera, 2014.

Las plantas madre en invernadero no se adaptaron a los cambios de temperatura, altitud, luminosidad, riego y por la presencia de bacterias endógenas, fue difícil la obtención de brotes. Estudios que se han desarrollado reportan que para especies de la misma familia u orden la propagación *in vitro* de estas especies tiene un alto grado de dificultad. Rodríguez V (2000), en su tema de investigación "Organogénesis *in vitro* de *Gleditsia amorphoides* (Leguminosae)", reportó que los problemas evidentes son la contaminación por hongos o bacterias, ennegrecimiento tisular, no hay respuesta a la germinación, brotes sin enlogar y explantes con vástagos de hasta 5 mm. En otro estudio Lozano (2011), reporta la especie *Caesalpinia spinosa* (Fabales) tiene muy bajos porcentajes de brotación y el tamaño de los explantes es muy pequeño. La tasa de supervivencia es del 50 %.

### 3.1.4 Análisis de las variables para la etapa de introducción y establecimiento de semillas de *Buddleja incana.*

#### 3.1.4.1 Porcentaje de contaminación

En la tabla 25, se observa la presencia de contaminación ya sea por hongos y/o bacterias para los tratamientos T2 (Protocolo N°1); T5 y T6 (Protocolo N°3) ver (Anexo 7 y 8), en los tratamientos T1, T3 y T4 el porcentaje de contaminación se presentó con un valor de 0 %, lo cual indica que son tratamientos eficientes para el establecimiento de semillas de *B. incana.*

Tabla 25.
Porcentaje de contaminación en *B. incana* a los 30 días.

| Contaminación | |
|---|---|
| Tratamientos/ Protocolos | Porcentaje (%) |
| T1 (P1) | 0 |
| T2 (P1) | 10 |
| T3 (P2) | 0 |
| T4 (P2) | 0 |
| T5 (P3) | 10 |
| T6 (P3) | 10 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En la Tabla 25, se observa que el tratamiento T1 perteneciente al Protocolo N° 1 utilizando fungicidas y NaOCl 1 % por 10 min no presentó porcentajes de contaminación. Billard (2014), en su investigación utilizó el protocolo descrito por McKendrick (2000), que consintió en la utilización de NaOCl 1 % por 10 min, obteniendo un 0 % de contaminación en *Oncidium bifolum,* de esta manera se corrobra el trabajo ya que en la metodología utilizada los resultados fueron los mismos. En los tratamientos T3 y T4 pertenecientes al Protocolo N°2 se utilizó Benomil por 60 min y NaOCl 3 % por 10 min, el porcentaje de contaminación reportado fue del 0 %. Soto (2010), en su estudio con semillas de *Cedrela salvadorensis* utilizó el protocolo descrito por Garro (2009), en donde reportó que al utilizar NaOCl 3 % por 10 min el porcentaje de contaminación fue de 0 % y los

porcentajes de germinación del 65 al 100 %. Además, Sosa (2009), menciona que el poder oxidante del NaOCl eliminó una gran cantidad de microorganismos presentes en el tejido, estos resultados son similares a los encontrados en el presente estudio, ya que los porcentajes de contaminación fueron de 0 %.

### 3.1.4.2 Porcentaje de oxidación

En la tabla 26, el porcentaje de oxidación fue del 0 % para los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5 y T6 respectivamente, siendo estos tratamientos eficientes para el establecimiento de semillas de *B. incana.*

Tabla 26.
Porcentaje de la variable oxidación a los 30 días.

| Oxidación | |
|---|---|
| Tratamientos/ Protocolos | Porcentaje (%) |
| T1 (P1) | 0 |
| T2 (P1) | 0 |
| T3 (P2) | 100 |
| T4 (P2) | 100 |
| T5 (P3) | 0 |
| T6 (P3) | 0 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En la Tabla 26, se observa que el tratamiento T1y T2 perteneciente al Protocolo N° 1 utilizando Fungicidas y NaOCl 1 % por 10 min; los tratamientos T3 y T4 pertenecientes al protocolo N°2 utilizó Benomil por 60 min y NaOCl 3 % por 10 min y en los tratamientos T5 y T6 pertenecientes al protocolo N°3 se utilizó fungicidas y NaOCl 3 % por 10 min. En ninguno de los tratamientos se evidenció oxidación. Las diferentes concentraciones de NaOCl permitieron erradicar contaminación y a su vez evitó el necrosamiento de los explantes.

### 3.1.4.3 Porcentaje de germinación

Tabla 27.
Rangos, frecuencias y variable porcentaje de germinación de semillas de *B. incana* a los 20, 30 y 45 días

| Germinación | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Frecuencia | | | Porcentaje (%) | | |
| Tratamientos | Rango | 20 días | 30 días | 45 días | 20 días | 30 días | 45 días |
| | 1= Germinó | 8 | 10 | 10 | 80 | 100 | 100 |
| | 0= No Germinó | 2 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| T1 (P1) | Total | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 100 |
| | 1= Germinó | 8 | 8 | 8 | 80 | 80 | 80 |
| | 0= No Germinó | 2 | 2 | 2 | 20 | 20 | 20 |
| T2 (P1) | Total | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 100 |
| | 1= Germinó | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 100 |
| | 0= No Germinó | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T3 (P2) | Total | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 100 |
| | 1= Germinó | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 100 |
| | 0= No Germinó | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T4 (P2) | Total | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 100 |
| | 1= Germinó | 1 | 7 | 7 | 10 | 70 | 70 |
| | 0= No Germinó | 9 | 3 | 3 | 90 | 30 | 30 |
| T5 (P3) | Total | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 100 |
| | 1= Germinó | 5 | 9 | 9 | 50 | 90 | 90 |
| | 0= No Germinó | 5 | 1 | 1 | 50 | 10 | 10 |
| T6 (P3) | Total | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 100 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En la tabla 27, los tratamientos T1, T3 y T4 reportaron un 100 % de germinación de semillas a los 30 días y dicho porcentaje se mantuvo hasta los 45 días. En los tratamientos T1 y T3 se utilizó el medio de cultivo MS y para el tratamiento T4 se utilizó el medio de cultivo WPM. Billard (2014), menciona en su investigación que la germinación de semillas de *Oncidium bifolum* en MS fue del 100 %. En otro estudio, Soto (2010), reportó que los porcentajes de germinación de semillas de *Cedrela salvadorensis*, fueron del 65 % para el medio de cultivo WPM y 100 % para el medio de cultivo MS, de esta manera se corrobra el trabajo ya que en las metodologías mencionadas los resultados fueron los mismos.

3.1.4.4 Longitud de brotes 30 días.

Una vez que se obtuvieron los datos se efectuó una transformación √x+1, con el objetivo de disminuir el coeficiente de variación del ensayo y ajustar los datos a la distribución normal (Vinueza, 2013, pág. 125), luego se realizaron los ADEVA correspondientes a los 30 días. El ADEVA (Tabla 28) para esta variable, detectó que el factor protocolos de desinfección (P) presenta diferencias altamente significativas y el factor medio de introducción (M) con la interacción MXP no muestra significancia estadística. El coeficiente de variación fue de 8,04 % y el promedio de longitud de brote fue de 1,21 cm.

Tabla 28.
ADEVA para la variable longitud de brote evaluada a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana.*

| Longitud de brote | | | |
|---|---|---|---|
| 30 días | | | |
| Fuentes de variación | GL | Cuadrados medios | p-valor |
| Total | 59 | | |
| Tratamientos | 5 | 0,08 | <0,0001 |
| Protocolos de desinfección | 2 | 0,19 | <0,0001** |
| Medios de introducción | 1 | 6,70E-04 | 0,7916 NS |
| MXP | 2 | 0,02 | 0,0841NS |
| Error Experimental | 54 | 0,01 | |
| CV | 8,04 | | |
| Promedio | 1,21 cm | | |

** altamente significativo 1%
NS no significativo
Nota: J. Jiménez, 2014.

Debido a que existieron diferencias significativas en los factores de estudio protocolos de desinfección se aplicaron las pruebas de Tukey y DMS al 5 % para establecer cuál fue el mejor protocolo (Tabla 29), se establecieron tres rangos de significación a los 30 días, el primer rango fue ocupado por el Protocolo N°2 (Benomil por 60 min y NaOCl 3 % por 10 min) en donde se evidenció mayor crecimiento en la interacción M1XP2 obteniendo una media de 1,33 ± 0,03 cm. En segundo rango de significación se mostró el Protocolo N°1 (Fungicidas y NaOCl 1 % por 10 min) con la interacción M2XP1 con una media de 1,22 ± 0,03 cm. Por último en el tercer rango de significación se mostró el Protocolo N°3 (Phyton 1 ml,

Carbendazim 1 ml y NaOCl 1 % por 10 min) con la interacción M1XP3 con una media de 1,07 ± 0,03 cm. González H (2010), en su estudio con *Musa paradisiaca* menciona que el uso de fungidas/bactericidas (Phyton) a dosis mayores de 0,5 ml. $L^{-1}$ podría retardar el crecimiento de los explantes. En otro estudio, Álvarez (2006), menciona que es importante tomar en cuenta el tiempo de exposición y concentración de desinfectantes, ya que estos provocan la inducción de síntesis de enzimas antioxidantes como catalasa, peroxidasa y superoxido dismutasa causada por estrés salino durante la germinación lo que puede conllevar a que exista un retraso en el crecimiento del explanto. Los medios de cultivo no influyen la longitud de brotes ya que no muestran significancia estadística.

Tabla 29.
Promedios y pruebas de significación para la variable protocolos evaluada a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana*

| Protocolo | Medio | Medias | Rangos | | |
|---|---|---|---|---|---|
| P2 | M1 | 1,33 | A | | |
| P2 | M2 | 1,27 | A | B | |
| P1 | M1 | 1,22 | A | B | |
| P1 | M2 | 1,22 | A | B | |
| P3 | M2 | 1,15 | | B | C |
| P3 | M1 | 1,07 | | | C |

Nota: J. Jiménez, 2014.

### 3.1.4.5 Longitud de brotes a los 45 días

Una vez que se obtuvieron los datos se efectuó una transformación $\sqrt{x+1}$, con el objetivo de disminuir el coeficiente de variación del ensayo y ajustar los datos a la distribución normal (Vinueza, 2013, pág. 125), luego se realizaron los ADEVA correspondientes a los 45 días. El ADEVA (Tabla 30) para esta variable, detectó que el factor protocolos de desinfección (P) presenta diferencias altamente significativas y el factor medio de introducción (M) con la interacción MXP no muestran significancias estadísticas. El coeficiente de variación fue de 11,08 % y el promedio de longitud de brote fue de 1,36 cm.

Tabla 30.
ADEVA para la variable longitud de brote evaluada a los 45 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana*.

| Longitud de brotes | | | |
|---|---|---|---|
| 45 días | | | |
| F de V | GL | Cuadrados medios | p-valor |
| Total | 59 | | |
| Tratamientos | 5 | 0,13 | 0,0002 ** |
| Protocolos de desinfección | 2 | 0,2 | 0,0005 ** |
| Medios de introducción | 1 | 0,07 | 0,0792 NS |
| PXM | 2 | 0,1 | 0,0183 ** |
| Error Experimental | 54 | 0,02 | |
| CV | 11, 08 | | |
| Promedio | 1,36 cm | | |

** altamente significativo 5%

NS no significativo

Nota: J. Jiménez, 2014.

A los 45 días siguió existiendo diferencias significativas en el factor de estudio protocolo de desinfección, se aplicaron las pruebas de Tukey y DMS al 5 % para establecer cuál fue el mejor protocolo (Tabla 31), se establecieron dos rangos de significación, el primer rango fue ocupado por el Protocolo N°2 (Benomil 60 min y NaOCl 3 % por 10 min) con la interacción P2XM1 en donde se evidenció mayor crecimiento obteniendo una media de 1,47 ± 0,05 cm, P2XM2 con una media de 1,40 ± 0,05 cm. En segundo rango de significación se mostró el Protocolo N°3 (Phyton 1 ml, Carbendazim 1 ml y NaOCl 1 % por 10 min) con la interacción P3XM1 con una media de 1,14 ± 0,05 cm. González H (2010), en su estudio con *Musa paradisiaca* menciona que el uso de fungidas/bactericidas (Phyton) a dosis mayores de 0,5 ml. $L^{-1}$ podría retardar el crecimiento de los explantes.

Tabla 31.
Promedios y pruebas de significación para el factor protocolos evaluado a los 45 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana*

| Protocolos | Medios | Medias | Rangos | |
|---|---|---|---|---|
| P2 | M1 | 1,47 | A | |
| P1 | M2 | 1,44 | A | |
| P2 | M2 | 1,4 | A | |
| P1 | M1 | 1,37 | A | |
| P3 | M2 | 1,35 | A | |
| P3 | M1 | 1,14 | | B |

Nota: J. Jiménez, 2014.

### 3.1.5 Análisis de las variables para la etapa de introducción y establecimiento de brotes de *Buddleja incana*

#### 3.1.5.1 Porcentaje de contaminación

En la tabla 32, se observa la presencia de contaminación ya sea por hongos y/o bacterias para los tratamientos T1 y T2 (Protocolo N°1); T3 y T4 (Protocolo N° 2) (ver Anexo 9 y 10), siendo efectivos los tratamientos T5 y T6 con un 0 % de contaminación, lo cual indica que son los tratamientos más eficientes para el establecimiento *in vitro* de brotes de *B. incana.*

Tabla 32.
Porcentaje de contaminación en *B. incana* a los 30 días.

| Contaminación | |
|---|---|
| Tratamientos/ Protocolos | Porcentaje (%) |
| T1 (P1) | 70 |
| T2 (P1) | 50 |
| T3 (P2) | 40 |
| T4 (P2) | 80 |
| T5 (P3) | 0 |
| T6 (P3) | 0 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En la Tabla 32, los tratamientos T5 y T6 presentaron mejor actividad de desinfección sobre los explantes, dichos tratamientos corresponden al protocolo N° 3 que consistió en la aplicación de fungicidas, NaClO al 0,5 % durante 60 min y NaOCl 1 % durante 10 min, el porcentaje de contaminación fue del 0 %. Cárdenas (2011), en su investigación utilizó alcohol al 70 % durante 1 min y 2 % de NaOCl durante 15 min reportando una contaminación fúngica de 10-26,7 % y bacteriana de 3,3-6,7 %, corroborando con la investigación ya que los en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 se evidenció la presencia de contaminación. En otro estudio, Vallejo (1988), reportó que utilizando alcohol al 70 % durante 30 segundos y NaOCl 1 % durante 15 minutos obtuvo un porcentaje de supervivencia total. Sánchez (2012), en su investigación menciona que el NaOCl contribuye a la desinfección de los explantes

ya que su mecanismo de acción permite el daño de la membrana celular de las bacterias, originando la lisis del microorganismo, por otro lado el alcohol posee una rápida acción y amplio espectro actuando sobre bacterias gramnegativas y grampositivas, incluyendo micobacterias, hongos y virus pero no posee actividad esporicida, el mecanismo de acción consiste en destruir la membrana celular y desnaturalizar las proteínas.

### 3.1.5.2 Porcentaje de oxidación

En la tabla 33, se observa la presencia de oxidación para el tratamiento T5 con 20 %, siendo efectivos los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T6 con un valor de 0 %, lo cual indica que son los tratamientos con menor porcentaje de oxidación para el establecimiento *in vitro* de brotes de *B. incana.*

Tabla 33.
Porcentaje de oxidación a los 30 días.

| Oxidación | |
|---|---|
| Tratamientos/ Protocolos | Porcentaje (%) |
| T1 (P1) | 0 |
| T2 (P1) | 0 |
| T3 (P2) | 0 |
| T4 (P2) | 0 |
| T5 (P3) | 20 |
| T6 (P3) | 0 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

El tratamiento T5 consistió en la aplicación de fungicidas, NaClO al 0,5 % durante 60 minutos y NaOCl 1 % durante 10 minutos, se observó un 20 % de oxidación en los explantes. George y Sherrington (1984), afirma que el tiempo de exposición y la concentración de NaOCl tienen una relación directamente proporcional con el porcentaje de supervivencia. En otro estudio, Bray (2000), menciona que los factores ambientales como la intensidad de luz, cortes, herbicidas, senescencia, patógenos, metales pesados, lesiones, sustancias abrasivas pueden desencadenan el estrés oxidativo y nitrosativo. En el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los

procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia y los cortes que sufre el explante.

### 3.1.5.3 Porcentaje de brotación

En la tabla 34 el porcentaje de brotación para los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 fue de 30 %, 50 %, 60 %, 20 % y 80 % respectivamente, mientras que para el tratamiento T6 fue de 100 % siendo este el tratamiento de mayor porcentaje de brotación en la etapa de establecimiento.

Tabla 34.
Porcentaje de brotación a los 30 días.

| Tratamientos/ Protocolos | Observaciones | Protocolos | Medios | % Brotación |
|---|---|---|---|---|
| T1 (P1) | 10 | P1 | M1 | 30 |
| T2 (P1) | 10 | P1 | M2 | 50 |
| T3 (P2) | 10 | P2 | M1 | 60 |
| T4 (P2) | 10 | P2 | M2 | 20 |
| T5 (P3) | 10 | P3 | M1 | 80 |
| T6 (P3) | 10 | P3 | M2 | 100 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En la Tabla 34 se puede observar que el tratamiento T6 reportó un 100 % de brotación, el tratamiento T6 pertenece al Protocolo N°3 que consistió en el uso de fungicidas, NaClO 0,5 % durante 60 min y NaOCl 1 % durante 10 min. En el tratamiento T3 perteneciente al protocolo N°2 se utilizó Alcohol al 70 % durante 30 seg y NaOCl 1 % durante 15 min reportando un 20 % de brotación, el bajo porcentaje de brotación pudo deberse a diversos factores como la exposición de NaOCl y medio de cultivo. Jiménez (2006), en su estudio con *Hibiscus elatus* utilizó en la etapa de desinfección NaOCl 1 % durante 15 min obteniendo un 35 % de oxidación en los explantes y un 65 % de brotación. En el tratamiento T6 se utilizó el medio de cultivo WPM, siendo este último el que más tuvo respuesta en porcentaje de brotación. Parada (2009), menciona en su estudio con *Prunus persica* que

utilizando medio de cultivo WPM se obtuvo un gran número de brotes (3-4) y su longitud fue de 13,7 mm.

### 3.1.5.4 Número de nudos

Una vez que se obtuvieron los datos se efectuó una transformación √x+1, con el objetivo de disminuir el coeficiente de variación del ensayo y ajustar los datos a la distribución normal (Vinueza, 2013, pág. 125), luego se realizaron los ADEVA correspondientes a los 30 días. El ADEVA (Tabla 35) para esta variable, detectó que el factor protocolos de desinfección (P) presenta diferencias altamente significativas y el factor medio de introducción (M) con la interacción MXP no muestran significancia estadística. El coeficiente de variación fue de 21,93 % y el promedio de número de nudos fue de 1,38.

Tabla 35.
ADEVA para la variable número de nudos a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana*

| Número de nudos | | | |
|---|---|---|---|
| 30 días | | | |
| F de V | GL | Cuadrado de medios | p-valor |
| Total | 59 | | |
| Tratamientos | 5 | 0,43 | 0,0012** |
| Protocolos de desinfección | 2 | 0,81 | 0,0005** |
| Medios de introducción | 1 | 0,02 | 0,6829NS |
| PXM | 2 | 0,25 | 0,0698NS |
| Error | 54 | 0,09 | |
| CV | 21,93 | | |
| Promedio | 1,38 | | |

** altamente significativo 1%

NS no significativo

Nota: J. Jiménez, 2014.

Debido a que existieron diferencias significativas en los factores de estudio protocolos de desinfección se aplicaron las pruebas de Tukey y DMS al 5 % para establecer cuál fue el mejor protocolo (Tabla 36), se establecieron dos rangos de significación a los 30 días, el primer rango fue ocupado por el Protocolo N°3 que consistió en el uso de fungicidas, NaClO 0,5 % durante 60 min y NaOCl 1 % durante 10 min en donde se evidenció mayor crecimiento obteniendo una media de 1,61 ±

0,07. En segundo rango de significación se encontraron los Protocolo N°1 alcohol al 70 % durante 1 min y NaOCl 2 % durante 15 min con una media de 1,26 ± 0,07 y el Protocolo N°2 en donde se utilizó Alcohol al 70 % durante 30 seg y NaOCl 1 % durante 15 min con una media de 1,26 ± 0,07. Los protocolos P1 y P2 no influyen en el número de nudos ya que no muestran significancia estadística entre ellos.

Tabla 36.
Promedios y pruebas de significación para la variable protocolos evaluada a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana*

| Protocolos | Medias | Rangos | |
|---|---|---|---|
| P3 | 1,61 | A | |
| P2 | 1,26 | | B |
| P1 | 1,26 | | B |

Nota: J. Jiménez, 2014.

En la Tabla 37, se establecieron tres rangos de significación, el primer rango fue ocupado por el Protocolo N°3 que consistió en el uso de fungicidas, NaClO 0,5 % durante 60 minutos y NaOCl 1 % durante 10 minutos con la interacción P3XM2 en donde se evidenció mayor crecimiento obteniendo una media de 1,67 ± 0,1 nudos y con la interacción P3XM1 en donde se evidenció una media de 1,55 ± 0,1 nudos. Cárdenas (2011), en su estudio menciona que el número de nudos obtenidos para *Buddleja incana* es de 1,25.

En segundo rango de significación se encontraron los Protocolo N°1 y N°2 en los que se utilizó alcohol 70 % durante 1 min y NaOCl 2 % durante 15 minutos con sus respectivas interacciones y con una media de 1,41 ± 0,1 y 1,3 ± 0,1 nudos respectivamente. En el tercer rango de significación se encontró el Protocolo N°2 con la interacción P2XM2 con una media de 1,11 ± 0,1 nudos. Los medios de cultivo no influyen el número de brotes ya que no muestran significancia estadística.

Tabla 37.
Promedios y pruebas para variable número de nudos evaluada a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana*.

| Protocolos | Medios | Medias | Rangos | | |
|---|---|---|---|---|---|
| P3 | M2 | 1,67 | A | | |
| P3 | M1 | 1,55 | A | B | |
| P2 | M1 | 1,41 | A | B | C |
| P1 | M2 | 1,3 | A | B | C |
| P1 | M1 | 1,22 | | B | C |
| P2 | M2 | 1,11 | | | C |

Nota: J. Jiménez, 2014.

### 3.1.5.5 Longitud de brotes 30 días

Una vez que se obtuvieron los datos se efectuó una transformación $\sqrt{x+1}$, con el objetivo de disminuir el coeficiente de variación del ensayo y ajustar los datos a la distribución normal (Vinueza, 2013, pág. 125), luego se realizaron los ADEVA correspondientes a los 30 días. El ADEVA (Tabla 38) para esta variable, detectó que el factor protocolos de desinfección (P) presenta diferencias altamente significativas y el factor medio de introducción (M) con la interacción MXP no muestran significancias estadísticas. El coeficiente de variación fue de 18,64 % y el promedio de longitud de brote fue de 1,31 cm.

Tabla 38.
ADEVA para la variable longitud de brotes a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana*

| Longitud de brotes | | | |
|---|---|---|---|
| 30 días | | | |
| F de V | GL | Cuadrados medios | p-valor |
| Total | 59 | | |
| Tratamientos | 5 | 0,28 | 0,0014** |
| Protocolos de desinfección | 2 | 0,52 | 0,0006** |
| Medios de introducción | 1 | 1,80E-03 | 0,8627NS |
| PXM | 2 | 0,17 | 0,0645NS |
| Error | 54 | 0,06 | |
| CV | 18,64 | | |
| Promedio | 1,31 cm | | |

** altamente significativo 1%

NS no significativo

Nota: J. Jiménez, 2014.

Debido a que existieron diferencias significativas en los factores de estudio protocolos de desinfección se aplicaron las pruebas de Tukey y DMS al 5 % para establecer cuál fue el mejor protocolo (Tabla 39), se establecieron tres rangos de significación a los 30 días, el primer rango fue ocupado por el Protocolo N°3 que consistió en el uso de fungicidas, NaClO 0,5 % durante 60 min y NaOCl 1 % durante 10 min con la interacción P3XM2 en donde se evidenció mayor crecimiento obteniendo una media de 1,55 ± 0,08 cm siendo el mejor protocolo para la variable longitud de brotes. En segundo rango de significación se encontraron los Protocolos N°1 y N°2 alcohol al 70 % durante 1 min y NaOCl 2 % durante 15 minutos con sus respectivas interacciones y con una media de 1,33 ± 0,08 y 1,17 ± 0,08 cm respectivamente. En el tercer rango de significación se encontró el Protocolo N°2 con la interacción P2XM2 con una media de 1,11 ± 0,08 cm. Álvarez (2006), menciona que es importante tomar en cuenta el tiempo de exposición y concentración de desinfectantes ya que estos provocan la inducción de síntesis de enzimas antioxidantes como catalasa, peroxidasa y superoxido dismutasa causada por estrés salino durante la germinación lo que puede conllevar a que exista un retraso en el crecimiento del explanto. Los medios de cultivo no influyen la longitud de brotes ya que no muestran significancia estadística.

Tabla 39.
Promedios y pruebas para la variable longitud de brotes evaluada a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana.*

| Protocolos | Medios | Medias | Rangos | | |
|---|---|---|---|---|---|
| P3 | M2 | 1,55 | A | | |
| P3 | M1 | 1,45 | A | B | |
| P2 | M1 | 1,33 | A | B | C |
| P1 | M2 | 1,27 | A | B | C |
| P1 | M1 | 1,17 | | B | C |
| P2 | M2 | 1,11 | | | C |

Nota: J. Jiménez, 2014.

### 3.1.6 Análisis de las variables para la etapa de multiplicación de vitroplantas de *Buddleja incana.*

#### 3.1.6.1 Altura de los brotes

Una vez que se obtuvieron los datos se efectuó una transformación √x+1, con el objetivo de disminuir el coeficiente de variación del ensayo y ajustar los datos a la distribución normal (Vinueza, 2013, pág. 125), luego se realizaron los ADEVA correspondientes a los 30 días. El ADEVA (Tabla 40) para esta variable, detectó que los factores medios de multiplicación (M), hormonas (H), dosis (D) y sus interacciones presentan diferencias altamente significativas. El coeficiente de variación fue de 9,03 % y el promedio de longitud de brote fue de 1,60 cm.

Tabla 40.
ADEVA para la variable altura de brotes a los 30 días para el establecimiento *in vitro* de *Buddleja incana*

| Altura de brotes | | | |
|---|---|---|---|
| 30 días | | | |
| F de V | GL | Cuadrados medios | p-valor |
| Total | 119 | | |
| Tratamientos | 11 | 0,29 | <0,0001** |
| Medio | 1 | 0,51 | <0,0001** |
| Hormonas | 1 | 0,39 | <0,0001** |
| Dosis | 2 | 0,53 | <0,0001** |
| MXH | 1 | 0,23 | 0,0011** |
| MXD | 2 | 0,18 | 0,0003 ** |
| HXD | 2 | 0,23 | <0,0001** |
| MXHXD | 2 | 0,07 | 0,0376 ** |
| Error experimental | 108 | 0,02 | |
| CV | 9,03 | | |
| Promedio | 1,60 cm | | |

** altamente significativo 1%

NS no significativo

Nota: J. Jiménez, 2014.

Debido a que existieron diferencias significativas en los factores de estudio medios para la multiplicación (M), dosis (D) y hormonas (H) se aplicaron las pruebas de Tukey y DMS al 5 % para establecer cuál fue el mejor medio de multiplicación, hormonas y dosis correspondiente, para medios de multiplicación (Tabla 41) se

estableció dos rangos de significación a los 30 días, el promedio más alto fue para M1 (MS) con una media de 1,67 ± 0,02 cm, mientras que M2 (WPM) obtuvo el promedio más bajo con una media de 1,54 ± 0,02 cm. Estos resultados concuerdan con Meneses (2011), quien menciona que el medio de cultivo MS con la combinación nutricional y hormonal específica incrementó el número de nudos de *novo*, longitud de brotes, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces. Este incremento es un aspecto esencial en la optimización de la fase de micropropagación de las plantas, pues redunda favorablemente a las fases subsiguientes de transferencia de las mismas a condiciones naturales, aclimatización y establecimiento en campo. En la tabla 42, para el factor dosis (D) se estableció dos rangos de significación, el promedio más alto fue con la D0 (sin hormonas) con una media de 1,73 ± 0,02 cm y el promedio más bajo para D1 (0,5 ppm) con una media de 1,53 ± 0,02 cm. Sin embargo en estos resultados no se observó el mismo efecto que describe Cárdenas (2011), en donde menciona que a D1 (sin hormonas), *Buddleja incana* presentó una longitud de brotes de 0,4 cm. En la tabla 43, para el factor hormona (H) el promedio más alto fue sin la adición de la hormona BAP con una media de 1,75 ± 0,03 cm y el promedio más bajo para la hormona BAP a D2 (1 ppm) con una media de 1,33 ± 0,03 cm. Cárdenas (2011), menciona que el tratamiento que no contenía adición de BAP presentó el índice más alto de brotación, lo cual corrobora con el presente estudio.

Tabla 41.
Promedios y pruebas para la variable altura de brotes evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana*.

| Medio | Medias | Rangos | |
|---|---|---|---|
| M1 | 1,67 | A | |
| M2 | 1,54 | | B |

Nota: J. Jiménez, 2014.

Tabla 42. Promedios y pruebas para la altura de brotes evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.*

| Dosis | Medias | Rangos | |
|---|---|---|---|
| D0 | 1,73 | A | |
| D2 | 1,54 | | B |
| D1 | 1,53 | | B |

Nota: J. Jiménez, 2014.

Tabla 43.
Promedios y pruebas para la variable altura de brotes evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana*.

| Hormonas | Dosis | Medias | Rangos | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| BAP | D0 | 1,75 | A | | | |
| AG3 | D0 | 1,71 | A | B | | |
| AG3 | D2 | 1,67 | A | B | | |
| AG3 | D1 | 1,59 | | B | C | |
| BAP | D1 | 1,47 | | | C | D |
| BAP | D2 | 1,41 | | | | D |

Nota: J. Jiménez, 2014.

Para establecer cuál fue el mejor medio de multiplicación (M), hormonas (H) y dosis (D) (Tabla 44), se establecieron cinco rangos de significación a los 30 días, el promedio más alto fue para la interacción con el medio M1 (MS) sin adición de la hormona BAP con una media de 1,95 ± 0,05 cm, seguido de M1 (MS) sin adición de la hormona $AG_3$ con una media de 1,78 ± 0,05 cm. El promedio más bajo fue para la interacción con el medio de cultivo M2 (WPM) con la adición de la hormona BAP a una dosis de 0,5 ppm con una media de 1,33 ± 0,05 cm.

Al analizar la respuesta *in vitro* de la Teca (*Tectona grandis*) a diferentes citoquininas González O (2003), observó en los explantes analizados (ápices) un número mayor de brotes emitidos en los tratamientos donde se combinaron 6-BAP y kinetina. Agramonte (2001), al evaluar el efecto de diferentes las dosis de 6-BAP (0; 0,35; 0,50 y 1,0 $mg.L^{-1}$) en la multiplicación *in vitro* de *Eucaliptus grandis*, observaron tendencia al aumento de los valores de la variable número de brotes por explantes y disminución de la longitud de los mismos con el aumento de la concentración, demostrando con esto que dosis relativamente altas inducen a un alto ahijamiento axilar y reducen el tamaño del brote, lo que produce una afectación del coeficiente de multiplicación, pues en el momento del subcultivo, muchos de estos brotes no pueden ser individualizados. El mejor medio de cultivo es el M1 (MS+ 5,5 $g.L^{-1}$ agar+ 30 $g.L^{-1}$ azúcar+ 0 $mg.L^{-1}$ BAP) en donde se obtuvo una mayor longitud de brotes.

Tabla 44.
Promedios y pruebas para la variable altura de brotes evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana*.

| Medio | Hormonas | Dosis | Medias | Rangos | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| M1 | BAP | D0 | 1,95 | A | | | | |
| M1 | AG3 | D0 | 1,78 | A | B | | | |
| M2 | AG3 | D2 | 1,67 | | B | C | | |
| M1 | AG3 | D2 | 1,67 | | B | C | | |
| M2 | AG3 | D0 | 1,65 | | B | C | | |
| M1 | BAP | D1 | 1,61 | | B | C | D | |
| M2 | AG3 | D1 | 1,59 | | B | C | D | |
| M1 | AG3 | D1 | 1,59 | | B | C | D | |
| M2 | BAP | D0 | 1,56 | | | C | D | |
| M2 | BAP | D2 | 1,42 | | | | D | E |
| M1 | BAP | D2 | 1,4 | | | | D | E |
| M2 | BAP | D1 | 1,33 | | | | | E |

Nota: J. Jiménez, 2014.

### 3.1.6.2 Número de nudos

Una vez que se obtuvieron los datos se efectuó una transformación $\sqrt{x+1}$, con el objetivo de disminuir el coeficiente de variación del ensayo y ajustar los datos a la distribución normal (Vinueza, 2013, pág. 125), luego se realizaron los ADEVA correspondientes a los 30 días.

El ADEVA (Tabla 45) para esta variable, detectó que los factores medio para la multiplicación (M) y dosis (D) presentan diferencias altamente significativas estableciendo que ambos factores influyen en el desarrollo de nudos, el factor hormonas y las interacciones de cada uno no muestran significancia estadística. El coeficiente de variación fue de 7,99 % y el promedio de número de nudos fue de 1,63.

Tabla 45.
ADEVA para la variable número de nudos a los 30 días para la etapa de multiplicación de *Buddleja incana*

| Número de nudos | | | |
|---|---|---|---|
| 30 días | | | |
| F de V | GL | Cuadrados medios | p-valor |
| Total | 119 | | |
| Tratamientos | 11 | 0,24 | <0,0001 ** |
| Medio | 1 | 0,55 | <0,0001** |
| Hormonas | 1 | 0,24 | 0,0003 ** |
| Dosis | 2 | 0,53 | <0,0001 ** |
| MXH | 1 | 0,03 | 0,1857 NS |
| MXD | 2 | 0,16 | 0,0001 ** |
| HXD | 2 | 0,15 | 0,0002 ** |
| MXHXD | 2 | 0,06 | 0,0232 ** |
| Error | 108 | 0,02 | |
| CV | 7,99 % | | |
| Promedio | 1,63 nudos/planta | | |

** altamente significativo 1%

NS no significativo

Nota: J. Jiménez, 2014

Debido a que existieron diferencias significativas en los factores de estudio medios para la multiplicación (M) y dosis (D) se aplicaron las pruebas Tukey y DMS al 5 % para establecer cuál fue el mejor medio de multiplicación y dosis correspondiente (Tabla 46 y Tabla 47), para medios de multiplicación se estableció dos rangos de significación a los 30 días, el promedio más alto fue para M1 (MS) con una media de 1,68 ± 0,02 nudos, mientras que M2 (WPM) obtuvo el promedio más bajo con una media de 1,54 ± 0,02 nudos.

Estos resultados concuerdan con Meneses (2011), quien menciona que el medio de cultivo MS con la combinación nutricional y hormonal específica incrementó el número de nudos de *novo*, longitud de brotes, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces. Este incremento es un aspecto esencial en la optimización de la fase de micropropagación de las plantas, pues redunda favorablemente a las fases subsiguientes de transferencia de las mismas a condiciones naturales, aclimatización y establecimiento en campo.

En la variable dosis (D) se estableció dos rangos de significación, el promedio más alto fue con la D0 (sin hormonas) con una media de 1,74 ± 0,02 nudos y el promedio más bajo para D2 (Dosis alta) con una media de 1,53 ± 0,02 nudos. Estos resultados

concuerdan con Cárdenas (2011), en donde observó que a D1 (sin hormonas), *Buddleja incana* presentó mayor cantidad de nudos (1,25).

Tabla 46.
Promedios y pruebas para la variable número de nudos evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana*.

| Medio | Medias | Rangos | |
|---|---|---|---|
| M1 | 1,68 | A | |
| M2 | 1,54 | | B |

Nota: J. Jiménez, 2014.

Tabla 47.
Promedios y pruebas para la variable número de nudos evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.*

| Dosis | Medias | Rangos | |
|---|---|---|---|
| D0 | 1,74 | A | |
| D1 | 1,57 | | B |
| D2 | 1,53 | | B |

Nota: J. Jiménez, 2014.

Para establecer cuál fue el mejor medio de multiplicación, hormona y dosis correspondiente (Tabla 48), se establecieron seis rangos de significación a los 30 días, el promedio más alto fue para la interacción con el medio M1 (MS) sin adición de la hormona BAP con una media de 1,94 ± 0,04 nudos, seguido de M1 (MS) sin adición de la hormona $AG_3$ con una media de 1,79 ± 0,04 nudos.

El mejor medio de cultivo es el M1 (MS+ 5,5 $g.L^{-1}$ agar+ 30 $g.L^{-1}$ azúcar+ 0 $mg.L^{-1}$ BAP) en donde se obtuvo una mayor cantidad de nudos.

Tabla 48.
Promedios y pruebas para la variable número de nudos evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.*

| Medio | Hormonas | Dosis | Medias | Rangos | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| M1 | BAP | D0 | 1,94 | A | | | | | |
| M1 | AG3 | D0 | 1,79 | A | B | | | | |
| M1 | AG3 | D1 | 1,7 | | B | C | | | |
| M2 | AG3 | D0 | 1,65 | | B | C | D | | |
| M1 | AG3 | D2 | 1,64 | | B | C | D | | |
| M1 | BAP | D1 | 1,6 | | B | C | D | E | |
| M2 | BAP | D0 | 1,6 | | B | C | D | E | |
| M2 | AG3 | D2 | 1,59 | | | C | D | E | |
| M2 | AG3 | D1 | 1,58 | | | C | D | E | |
| M2 | BAP | D2 | 1,47 | | | | D | E | F |
| M1 | BAP | D2 | 1,41 | | | | | E | F |
| M2 | BAP | D1 | 1,38 | | | | | | F |

Nota: J. Jiménez, 2014.

### 3.1.6.3 Índice de multiplicación

La tabla 49, muestra los índices de multiplicación obtenidos a los 30 días de evaluación mostrando que los tratamientos T1 y T2 sin adición de hormonas presentan un mayor índice de multiplicación con valores de 2,60 y 2,38 respectivamente. Para *Buddleja incana* el medio de cultivo MS sin adición de hormonas aseguró una tasa de multiplicación de 2,60. Machado (2002), durante la multiplicación *in vitro* de *Gerbera jamessonii* utilizando medio de cultivo MS sin adición de hormonas, obtuvo un mayor coeficiente de multiplicación (3) en comparación con el medio de cultivo MS adicionado con diferentes concentraciones de hormonas. Salazar (2012), menciona que los medios de cultivo complementados con hormonas como el BAP aseguraron proliferación de yemas axilares pero también causaron efectos fisiológicos (crecimiento del callo abundante en la base de las plántulas siendo esto negativo) como se evidenció en los tratamientos T4, T9 y T10.

Los tratamientos T4, T9 y T10 presentaron síntomas de hiperhidricidad. Alvarado (2000), mencionó que mientras se aumenten las dosis de hormonas como el BAP se podrán observar tejidos vegetales con síntomas de hiperhidricidad. Perrugoria (2009), menciona que la hiperhidricidad puede ser ocasionada por estrés del tejido provocando cambios en sus características bioquímicas, anatómicas y fisiológicas.

Otras causas podrían ser el bajo peso seco, menor cantidad de lingnina, bajos contenidos de calcio, concentración de hormonas, etc.

Tabla 49.
Índice de multiplicación evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana*.

| Tratamiento | Medio de cultivo | Dosis | Índice de multiplicación |
|---|---|---|---|
| T1 | M1 BAP | 0 ppm | 2,60 |
| T2 | M1 AG3 | 0 ppm | 2, 38 |
| T3 | M1 BAP | 0,5 ppm | 1,58 |
| T4 | M1 BAP | 1 ppm | 1,00 |
| T5 | M1 AG3 | 0,5 ppm | 1,89 |
| T6 | M1 AG3 | 1 ppm | 1,73 |
| T7 | M2 BAP | 0 ppm | 1,77 |
| T8 | M2 AG3 | 0 ppm | 1,57 |
| T9 | M2 BAP | 0,5 ppm | 0,95 |
| T10 | M2 BAP | 1 ppm | 1,18 |
| T11 | M2 AG3 | 0,5 ppm | 1,49 |
| T12 | M2 AG3 | 1 ppm | 1,53 |

Nota: J. Jiménez, 2014.

### 3.1.6.4 Longitud de raíces

Una vez que se obtuvieron los datos se efectuó una transformación $\sqrt{x+1}$, con el objetivo de disminuir el coeficiente de variación del ensayo y ajustar los datos a la distribución normal (Vinueza, 2013, pág. 125), luego se realizaron los ADEVA correspondientes a los 30 días.

El ADEVA (Tabla 50) para esta variable, detectó que el factor dosis (D) presenta diferencias altamente significativas y los factores medios de multiplicación (M) y hormonas (H) no muestran significancias estadísticas. El coeficiente de variación fue de 19,29 % y el promedio de longitud de raíces fue de 2,73 cm.

Tabla 50.
ADEVA para la variable longitud de raíces a los 30 días en la etapa de multiplicación de *B. incana*

| Longitud de raíces | | | |
|---|---|---|---|
| 30 días | | | |
| F de V | GL | Cuadrados medios | p-valor |
| Total | 119 | | |
| Tratamientos | 11 | 1,09 | <0,0001 ** |
| Medio | 1 | 1 | 0,0065 ** |
| Hormonas | 1 | 1,37 | 0,0016 ** |
| Dosis | 2 | 2,53 | <0,0001 ** |
| MXH | 1 | 0,23 | 0,1851 NS |
| MXD | 2 | 0,62 | 0,0107 ** |
| HXD | 2 | 1,33 | 0,0001 ** |
| MXHXD | 2 | 0,21 | 0,1986 NS |
| Error experimental | 108 | 0,13 | |
| CV | 19,29 | | |
| Promedio | 2,73 cm | | |

** altamente significativo 1%

NS no significativo

Nota: J.Jiménez, 2014.

Debido a que existió diferencias significativas se aplicaron las pruebas de Tukey y DMS al 5 % para establecer cuál fue el mejor medio de multiplicación, hormonas (H) y dosis (D) (Tabla 51, Tabla 52 y Tabla 53), para medios de multiplicación (M) se estableció dos rangos de significación a los 30 días, el promedio más alto fue para M1 (MS) con una media de 1,96 ± 0,05 cm , mientras que el M2 (WPM) obtuvo el promedio más bajo con una media de 1,86 ± 0,06 cm. Estos resultados concuerdan con Meneses (2011), quien menciona que el medio de cultivo MS con la combinación nutricional y hormonal específica incrementó el número de nudos de *novo*, longitud de brotes, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces. Para el factor dosis (D) el promedio más alto fue para D0 sin adición de hormonas con una media de 2,15 ± 0,06 cm, mientras que el promedio más bajo se reportó para la dosis D2 (1 ppm) obtuvo el promedio más bajo con una media de 1,66 ± 0,06 cm. Para el factor hormonas (H) el promedio más alto fue sin adición de hormonas con una media de 2,25 ± 0,08 cm, mientras que el promedio más bajo se reportó para la hormona BAP (1 ppm) obtuvo el promedio más bajo con una media de 1,55 ± 0,08 cm. Caravia (2013), en su estudio con *Prosopis pallida* menciona que el uso del medio de cultivo MS sin adición de BAP favorece el desarrollo de raíces de dicha especie, corrobando de esta manera el presente trabajo.

Tabla 51.
Promedios y pruebas para la variable longitud de raíces evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana*.

| Medio | Medias | Rangos | |
|---|---|---|---|
| M1 | 1,96 | A | |
| M2 | 1,78 | | B |

Nota: J. Jiménez, 2014.

Tabla 52.
Promedios y pruebas para la variable longitud de raíces evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.*

| DOSIS | Medias | Rangos | |
|---|---|---|---|
| D0 | 2,15 | A | |
| D1 | 1,81 | | B |
| D2 | 1,66 | | B |

Nota: J. Jiménez, 2014.

Tabla 53.
Promedios y pruebas para la variable longitud de raíces evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.*

| Hormonas | Dosis | Medias | Rangos | | |
|---|---|---|---|---|---|
| BAP | D0 | 2,25 | A | | |
| AG3 | D1 | 2,07 | A | B | |
| AG3 | D0 | 2,05 | A | B | |
| AG3 | D2 | 1,82 | | B | C |
| BAP | D1 | 1,55 | | | C |
| BAP | D2 | 1,5 | | | C |

Nota: J. Jiménez, 2014.

Para establecer cuál fue el mejor medio de multiplicación (M), hormonas (H) y dosis (D) correspondientes (Tabla 54), se establecieron cuatro rangos de significación a los 30 días, el promedio más alto fue para la interacción con el medio M1 (MS) y M2 (WPM) con la hormona BAP a una dosis de 0 ppm obteniendo una media de 2,25 ± 0,11 cm. El promedio más bajo fue para el medio M2 (WPM) con la hormona BAP a una dosis de 1 ppm obteniendo una media de 1,19 ± 0,11 brotes. Saucedo (2009), en su investigación con *Xanthosoma sagittifolium* menciona que en la fase de enraizamiento el uso de medios de cultivo sin adición de BAP desarrollaron raíces más largas obteniendo un promedio de 4,5 cm.

Tabla 54.
Promedios y pruebas para la variable longitud de raíces evaluada a los 30 días para la multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana.*

| Medio | Hormonas | Dosis | Medias | Rangos | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| M2 | BAP | D0 | 2,25 | A | | | |
| M1 | BAP | D0 | 2,25 | A | | | |
| M1 | AG3 | D1 | 2,17 | A | | | |
| M2 | AG3 | D0 | 2,06 | A | B | | |
| M1 | AG3 | D0 | 2,05 | A | B | | |
| M2 | AG3 | D1 | 1,96 | A | B | C | |
| M2 | BAP | D1 | 1,91 | A | B | C | |
| M2 | AG3 | D2 | 1,87 | A | B | C | |
| M1 | AG3 | D2 | 1,77 | A | B | C | |
| M1 | BAP | D2 | 1,55 | | B | C | D |
| M2 | BAP | D2 | 1,45 | | | C | D |
| M2 | BAP | D1 | 1,19 | | | | D |

Nota: J. Jiménez, 2014.

# CONCLUSIONES

- Se aprueba la hipótesis alternativa para *C. catenaeformis* y *B. incana* ya que las dos especies responden a la micropropagación con la técnica convencional de organogénesis.

- En la fase de establecimiento *in vitro* de semillas de *Cedrelinga catenaeformis* el Tratamiento con la adición de Oxitetraciclina 3g. 0,15 $L^{-1}$+ Benomil 1g.$L^{-1}$+ Ácido ascórbico 100 ppm + Ácido cítrico 100 ppm 30 ´+ NaOCl 2 % 20´, presentó un bajo porcentaje de contaminación, esto pudo deberse a la acción bactericida y fúngica del NaOCl.

- En la fase de establecimiento *in vitro* de brotes de *Cedrelinga catenaeformis* el Tratamiento con la adición de Fungicidas 20´ + NaOCl 0,5 % 60´ + NaOCl 1 % 10´ + Tween 20 presentó un bajo índice de contaminación gracias a la acción detergente que posee el Tween 20 y el poder oxidante del NaOCl que eliminó una gran cantidad de microorganismos. El porcentaje de brotación en dicho tratamiento fue del 20 %.

- En la fase de establecimiento *in vitro* de semillas de *Buddleja incana* los tratamientos con adición de Fungicidas 60´ + NaOCl 1 % + Tween 20 10´ y los tratamientos con la adición de Povidin solución 1 % 60´ + Kilol 30 gotas. 100 ml agua destilada 30´ + Benomil 1 g.L-1 + NaOCl 3 % 10´ presentaron un índice contaminación de 0 % y un índice de supervivencia del 100 %, el tiempo de exposición y la concentración de NaOCl tienen una relación directamente proporcional con el porcentaje de supervivencia. El tratamiento T3 que contenía medio de cultivo MS fue el más efectivo para la variable longitud de brote, ya que los valores más altos fueron de 1,33± 0,03 cm a los 30 días y a los 45 días de 1,47± 0,03 cm.

- En la fase de establecimiento *in vitro* de brotes de *Buddleja incana* el tratamiento con la adición de Fungicidas 20´ + NaOCl 0,5 % 60´ + NaOCl 1 % 10´ + Tween 20 presentó un índice de contaminación del 0 % en el medio de cultivo WPM. Existe una estrecha correlación entre la concentración del agente desinfectante y el tiempo necesario para eliminar una determinada fracción de la población fúngica y bacteriana. El porcentaje de brotación en dicho tratamiento fue del 100 %.El número y longitud de brotes tuvieron una media de 1,67± 0,1 brotes/ explante y de 1,55± 0,08 cm de longitud.

- En los ensayos de multiplicación *in vitro* de *Buddleja incana*, el medio de cultivo MS presentó los mejores resultados en los tratamientos sin adición de las hormonas BAP y $AG_3$. La longitud de brote presentó una media de 1,95± 0,05 cm, el número de brotes presentó mejores resultados con 0,5 ppm de BAP con una media de 2,47 ± 0,08 brotes/ explante, el número de nudos presentó una media de 1,94 ± 0,04 nudos/ explante y la longitud de raíces presentó una media de 2,25 ± 0,08 cm por lo que no es necesario un medio de enraizamiento. El índice de multiplicación fue de 2,60.

## LISTA DE REFERENCIAS


Abdelnour, A. (2002). Micropropagación de Chayote (*Sechium edule*) a partir de brotes vegetativos. *Agronomía mesoamericana*, 151.

Agramonte, Y. (2001). *Principios de la Biotecnología en plantas. Una introducción a la Ingeniería Genética.* Brasil.

Aguilar, L. (2010). *Fitohormonas.* Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

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

Alvarado, S. (2000). *Establecimiento de protocolos para la regeneración de Curcuma zedoaria.* Universidad Católica de Temuco, Chile.

Álvarez, C. (2006). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leaches phenolics in vitro plantlet regeneration of Faba bean. *African Journal of Biothechnology*, 1002.

Alzugaray, Z. (2013). *Caracterización morfológica y anatómica de Schinopsis balansae.* Colombia.

Amador, J. (2013). Effects of volume and initial stregth of medium on the growth, photosynthesis and ion uptake of potato (Solanum tuberosum) plantlets in vitro. *Hortic Sci*, 120.

Ansorena, J. (1994). *Sustratos, propiedades y caracterización.*

Arditti, J. (1993). *Micropropagation of orchids.* New York.

Arica, D. (2003). *Beneficios del sistema agroforestal de la comunidad campesina de Antacusi.* Perú.

Aróstegui, V. (1992). *Propagación de especies forestales nativas promisorias en Jenaro Herrera.* Perú.

Atares, D. (2007). Comparation of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult*.

Azofeifa, A. (2009). *Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro.*

Barra, A., & Palomino, C. (2003). *Conservación de cedrorona (Cedrelinga catenaeformis).* Brasil.

Barrera, P. (2013). *Informe Técnico.* Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Programa Nacional de Forestería, Quito.

Barrera, P. (2014). *Informe Técnico de Cedrelinga catenaeformis.* Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Programa Nacional de Forestería, Quito.

Bautista, U. (1997). *Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos.*

Bejarano, A. (2008). *Micropropagation of Puya santossi.* Cuba.

Benson, D. (2000). *Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatación de vitroplantas de P. sufruticosa.*

Billard, C. (2014). *Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género Oncidium.* México.

Borges, M. (2009). *Desinfección de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de Dioscorea alata L. clon caraqueño.*

Borrero, E. (2007). *Protocolo para la regeneración de plántulas a partir de explantes de hojas de cinco variedades ecuatorianas de Tomate de árbol.* Universidad San Francisco de Quito, Quito.

Branbyge, J. (2004). *Tropical Native Species Reforestation Information Clearinghouse.* Reforestation program in marginal area for the Ecuadorian highlands, Quito.

Bray, R. (2000). *Avances en el cultivo in vitro de especies leñosas y forestales en el instituto de biotecnología de las plantas.* Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba.

Buitrago, A. (2008). *Biotecnología aplicada en especies forestales.*

Campos, L. (2009). *Dendrocronología en árboles de tornillo, Cedrelinga catenaeformis Ducke, del centro de investigaciones Genaro Herrera en el Noreste de la amazonía.* Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

Cano, M. (2013). *Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación ex situ de especies vegetales de interés.* Instituto Universitario de Investigación CIBIO.

Cantos, M., Liñan, J., Pérez, C., & Troncoso, A. (1998). Obtención de plantas selectas de vid, variedad Zalema, libres de virosis entrenudo corto. (pág. 709). Actas de Horticultura.

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

Carranza, M. (2013). *Propagación clonal in vitro de Swietenia macrophylla.* Quevedo.

Carravia, E. (2013). *Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Algarrobo Tropical (Prosopis pallida).* Universidad Central del Ecuador, Quito.

Castillo, A. (2008). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología, INIA.*

Castillo, J. (2004). *Hormonas Vegetales.* Aldea Global del Instituto Salk.

Castillo, M. (2012). *Propagación vegetativa de dos especies de la familia Podocarpácea* .

Castillo, W. (1983). *Descripción dendrológica de 26 especies forestales de importancia comercial: Zonas de Tahuamano y Alto Huallaga.* Cámara Nacional Forestal- ITTO.

Chávez, M. (2012). *Fitohormonas.* España.

Concepción, J. (2005). *Programa de mejoramiento genético del Guayabo (Psidium guajava).* Cuba.

Costales, D. (2005). *Guía para el establecimiento de plantaciones forestales en la zona andina.* Proyecto FAO.

Davies, A. (2002). *Multiplicación in vitro de Quercus robur.*

Davis, P. (2004). *Plant Hormones: Byosinthesis, signal, transduction, action.* Londres.

Gamboa, J. (1999). *Micropropagación de melina (Gmelina arborea).* Costa Rica.

Gárate, M. (2010). *Técnicas de propagación por estacas.* Universidad Nacional de Ucayali, Perú.

García, J. (2009). *Aislamiento de protoplastos del género Fuchsia.* Chile.

Garro, G. (2009). Optimización de un protocolo para el cultivo in vitro y la micropropagación masiva del llantén (*Plantago major*). *Tecnología en Marcha*, 33.

Gentry, A. (1993). A Field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of Northest South America. *Exegenetics Ltd, Edington, Wilts*.

George, A., & Sherrington, G. (1984). *Plant Tissue Culture: techniques and experiments.*

Gómez, M. (2006). *Evaluación de alternativas silvopastoriles utilizando Yagual (Polylepis racemosa), Quishuar (Buddleja incana), Colle (Buddleja coriacea) en la microcuenca del Río Chimborazo.* Riobamba.

González, C. (1998). *Micropropagación vegetativa in vitro de aliso (Alnus acuminata).* Asociación civil para la investigación y desarrollo forestal (ADEFOR), Perú.

González, G. (2009). *Características morfológicas de especies forestales.* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería Agronómica , Colombia.

González, H. (2010). *Evaluación de la eficacia in vitro de productos naturales y químicos en el control de especies fúngicas que afectan al cultivo de Musa paradisiaca.*

González, O. (2003). *Determinación de las concentraciones adecuadas de 2,4 D y 6-BAP para la inducción de callos morfogénicos de boniato.* Cuba.

Grijalva, J. (2010). *Prospección de semillas de especies leñosas nativas priorizadas con potencial agroforestal en las comunidades kichwas de la Provincia de Napo para el Manejo Sostenible de la Tierra.*

Guairacaja, J. (2013). *Evaluación agronómica de plantas de Quishuar (Buddleja incana) propagados por estacas, utilizando cuatro tipos de de sustratos y dos tipos de enraizadores en el Cantón Guamote, Provincia de Chimborazo.* Chimborazo.

Guevara, A. (2013). Cultivo *in vitro*. *Jardín Botánico de Córdoba*.

Hernández, Y. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutos perennes. *Scielo*.

Herrera, M. (2010). *La multiplicación por estaca o enraizamiento de ramilla.* Perú.

Instituto Nacional de Metereología e Hidrología-INAMHI. (2014). *Informe técnico Estación Experimental Santa Catalina.* Quito.

Jiménez, H. (2006). *Avances en el cultivo in vitro de especies leñosas y forestales en el Instituto de Biotecnología de las Plantas.* Cuba.

Laboratorio Cultivo de Tejidos LCT-INIAP. (2014). *Protocolos de desinfección para especies forestales.* Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Departamento de Biotecnología, Quito.

Lagoutte, C. (2009). Efecto del tamaño de celdas y citoquininas en el crecimiento de plantas de petunia. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 152.

Laynez, J. (2006). *Desinfección de ápices de yuca (Manihot esculenta) con hipoclorito de sodio.* Venezuela.

Leví, D. (1987). *Propagación por estacas de tornillo (Cedrelinga catenaeformis Ducke), con aplicación de estimulante de enraizamiento bajo condiciones de Tingo María.* Universidad Nacional Agraria de la selva.

Llanga, B. (2014). *Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de Quishuar (Buddleja incana), Aliso (Alnus acuminata) y Romerillo (Hypericum laricifolium) localizados en tres zonas geográficas diferentes.* Riobamba.

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

Luna, C. (2003). Micropropagation of Ilex dumosa from nodal segments in a tissue culture system. *Biocell*, 135.

Machado, F. (2002). *Técnicas in vitro para la producción y mejoramiento de plantas.* Universidad Nacional de Costa Rica, Costa Rica.

Malgren, S. (2006). Establecimiento *in vitro* de yemas Bambusa vulgaris. *Biotecnología Vegetal*.

Manta, M. (1990). *Lineamientos metodológicos para el análisis silvicultural de bosques naturales. con fines de producción de madera.* Perú.

Martínez, M. (2007). *Propagación vegetativa de Tamarix boveana ensayos de enraizamiento de esquejes.* Universidad Politécnica de Cartagena, Colombia.

Martinez, R. (2001). Embriogénesis somática a partir de callos de Nim (Azadiracha indica). *Ciencias Forestales y del Ambiente*, 114.

Mckendrick, S. (2000). Manual para la germinación in vitro de Orquídeas. *Ceiba Foundation for Tropical Conservation*.

Mendieta, M. (2002). *Propagación de orquídeas.* Costa Rica.

Meneses, S. (2011). *Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de Dioscorea alata L.*

Ministerio del Ambiente. (2011). *Manual de identificación, familias, géneros y árboles del Ecuador*. Ecuador.

Ministerio del Ambiente-MAE. (2005). *Informe técnico de árboles del Ecuador*. Ecuador.

Miranda, N. (2011). *Aclimatación de plantas obtenidas in vitro de Eucalyptus urophylla y Eucalyptus grandis.* México.

Mohan, R. (2010). Advances in genetically engineered (trangenic) plants in pest management an over view. *Crop Prot*.

Mora, S. (2010). *Organogénesis in vitro de Arándano (Vaccinium corymbosum).* México.

Mroginski, L. (2004). Biotecnología y mejoramiento vegetal. *INTA*.

Navarro, G. (2000). *Química Agrícola.* España: Mundi prensa.

Olmos, S. (2005). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*.

Orozco, L. (2006). *Manejo de semillas y la propagación de diez especies forestales del Bosque Andino.* Corporación Autónoma Regional, Antioquia.

Ortiz, M. (2007). *Micropropagación de árboles superiores.* Cuba.

Parada, H. (2009). *Introducción al cultivo de tejidos.* Universidad de Aguascalientes, México.

Patiño, M. (2011). *Evaluación de métodos de desinfección y medios de cultivo para la multiplicación in vitro de Caesalpinia spinosa.* Riobamba.

Pérez, J. (2006). Cultivo in vitro de plantas y sus aplicaciones en la agricultura. *Arte y comunicación Visul S.L*, 100.

Pérez, M. (1994). Cultivo de tejidos vegetales aplicado a la producción agrícola. *Revista Iberamericana*.

Perrugoria, M. (2009). *Desarrollo de una técnica para micropropagación de especies leñosas en biorreactores.*

Radeva, A. (2005). *Cultivo de células y tejidos vegetales: Generalidades.*

Rebolledo, V. (2006). Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pino. *Redalyc*, 32.

Reynel , J., & Marcelo , C. (2009). *Árboles de los ecosistemas forestales andinos.* Programa Regional ECONOBOA-INTERCOPERACIÓN, Lima.

Roca, W. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura. *Fundamentos y aplicaciones CIAT*.

Rodriguez, A. (2010). *Regeneración directa a partir de cotiledones maduros de genotipos cubanos de Girasol (Helianthus annus).* Cuba.

Rodriguez, R. (2005). *Reactivación de material vegetal élite de Pinus radiata mediante microinjerto in vitro.*

Rodriguez, V. (2000). *Organogénesis in vitro de Gleditsia amorphoides.* Argentina.

Rojas, F. (2012). *Brotación in vitro de yemas de teca (Tectona grandis).*

Rojas, M. (2000). *Control hormonal del desarrollo de plantas.* México.

Salazar, D. (2012). *Cultivo in vitro de Antharium andreanum.*

Sánchez, Y. (2012). *Elaboración de tablas de volúmenes y determinación de factores de forma de las especies forestales: Chuncho (Cedrelinga catenaeformis), Laurel (Cordia alliadora), Sangre de Gallina (Otoba sp), Ceibo (Ceiba samauma) y Canelo (Nectandra sp).* Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Sanz, J. (2007). *Cultivo in vitro de Gyrocarpus americanus como alternativa para la recuperación y conservación de la especie en el departamento del Tolima.*

Sarowar, C. (2003). Organogénesis directa y múltiple en tejidos vegetales de *Cajanus cajan*. *Invent Pens*, 31.

Saucedo, S. (2009). *Efecto de los reguladores de crecimiento para la propagación in vitro de Malanga (Xanthosoma sagittifolium).* Quevedo.

Schwyzer, A. (1988). *Propagación por estacas de Tornillo (Cedrelinga catenaeformis).* Técnico, Perú.

Sosa, F. (2009). Propagación in vitro de *Heliconia standley*. *Redalyc*, 30.

Soto, B. (2010). *Establecimiento in vitro de Cedrela salvadorensis.*

Soudre, M. (2010). *Proyecto Desarrollo Tecnológico apropiada para la propagación vegetativa de especies maderables valiosas en las regiones de Loreto y Ucayali.* Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana y Fondo para la Innovación Ciencia y Tecnología (IIAP), Perú.

Stripp, M. (2001). Influencia de la fuente de carbono y el agente gelificante sobre la regeración de arroz. *Biotecnología Vegetal*, 166.

Torre, L. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador.* Ecuador.

Trujillo, L. (2008). *Manual de Prácticas de Técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales.* Instituto Tecnológico Superior de Misantla.

Vaca, I. (2010). *Incremento del número de brotes de babaco (Vasconcellea x heilbornil cv BABACO) in vitro mediante la interacción de reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas completas.* Escuela Politécnica del Ejército, Ingeniería Agropecuaria.

Vallejo, S. (1988). *Micropropagación de tejidos vegetales de Quishuar (Buddleja incana), Cedro (Cedrela montana) y Pumamaqui (Oreopanax ecuadorensis).* Quito.

Vargas, G. (2003). *Propagación in vitro de portainjertos de Cerezo.* Universidad Católica de Valparaíso.

Varisai, E. (2003). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. *FOMES*.

Vásquez, T. (2007). Producción de callos e inducción de plantas de *Digitaria eriantha*.

Végvari, G. (2001). *Morphological changes of in vitro apples plants during acclimatization.*

Victoriano, H. (2010). *Organogénesis in vitro de Arándano (Vaccinium corymbosum L).* Instituto Politécnico Nacional.

Vidales, I. (2000). *Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática del aguacate (Persea americana).* Universidad de Colima, México.

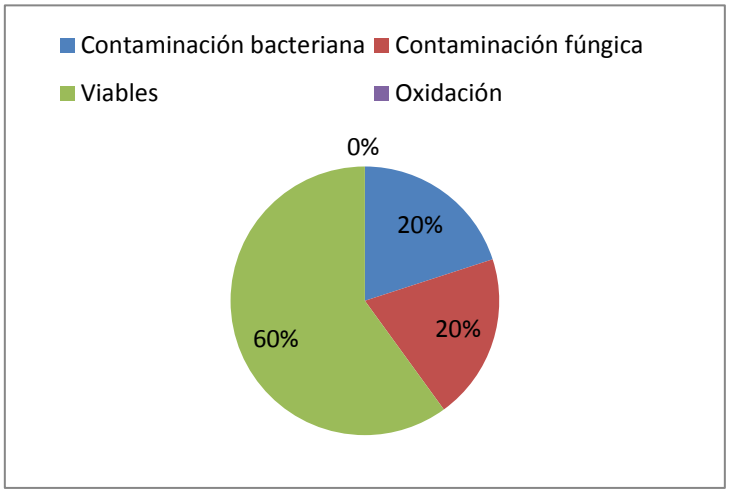
Vinueza, D. (2013). *Evaluación morfológica e histológica de las etapas de formación de la embriogénesis somática en las variedades Ducke 7 y Puebla de aguate (Persea americana Mill).* Quito.

Zelenco, H. (2009). Orchids species of Perú. *ZIA publications*.

## ANEXOS

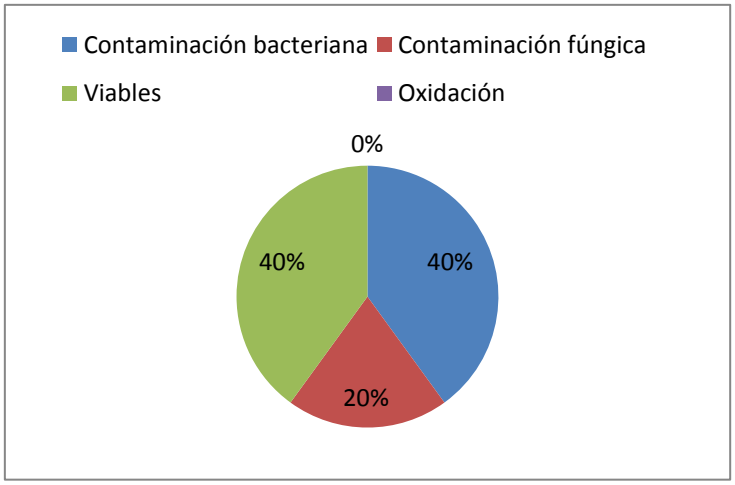
Anexo 1**.** Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los Tratamientos T1 y T2 en semillas de *C. catenaeformis*

T1




Elaborado por: Jiménez, 2014**.**

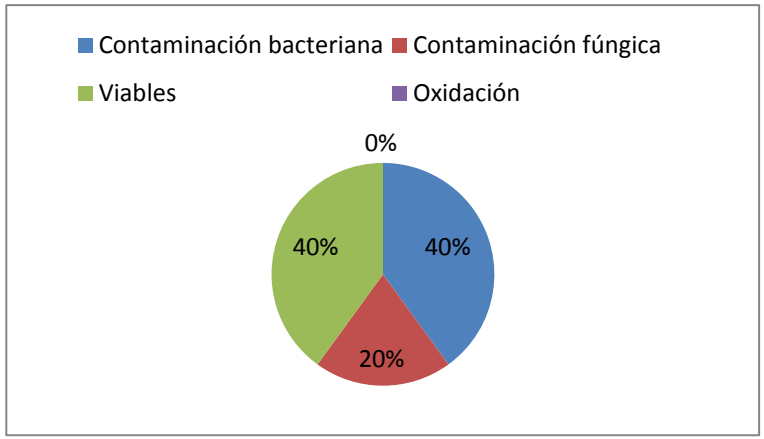
T2




Elaborado por: Jiménez, 2014**.**

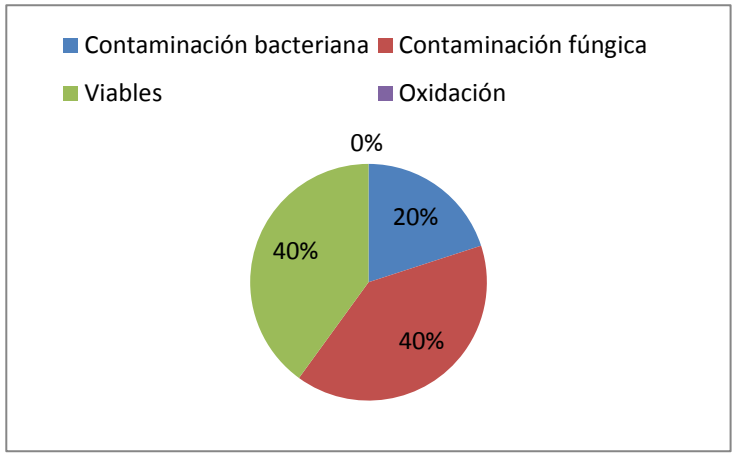
Anexo 2 .Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los Tratamientos T5 y T6 en semillas de *C. catenaeformis*

T5




Elaborado por: Jiménez, 2014.

T6



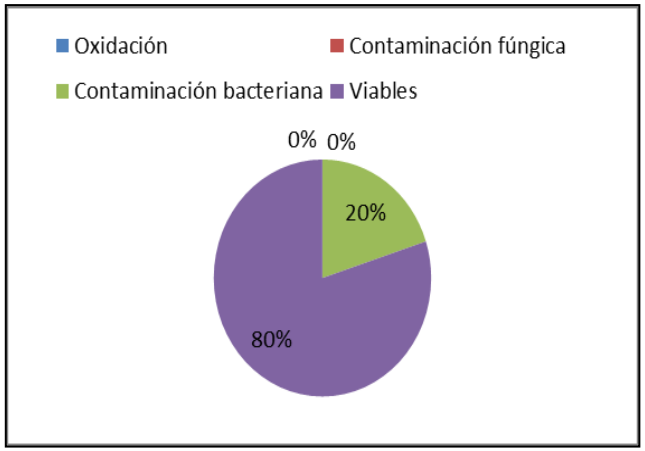

Elaborado por: Jiménez, 2014.

Anexo 3. Condiciones fitosanitarias de semillas de *C. catenaeformis*.

| | |
|---|---|
| Semillas de *C. catenaeformis*<br> <br>Elaborado por: Jiménez, 2014. | Semillas atacadas por larvas<br> <br>Elaborado por: Jiménez, 2014. |
| Semillas atacadas por hongos<br> <br>Elaborado por: Jiménez, 2014. | Pudrición de semillas<br> <br>Elaborado por: Jiménez, 2014. |

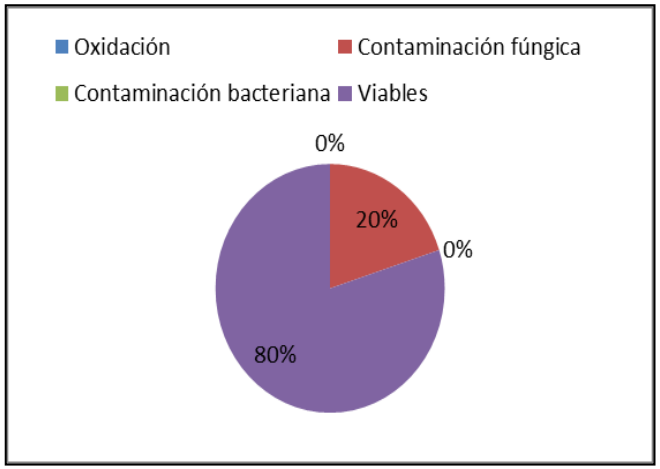
Anexo 4. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los Tratamientos T1 y T2 en brotes de *C. catenaeformis*.

T1




Elaborado por: Jiménez, 2014.

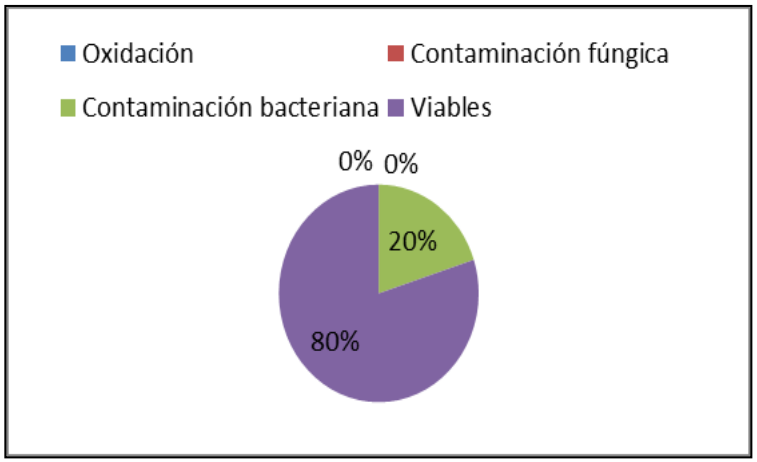
T2




Elaborado por: Jiménez, 2014.

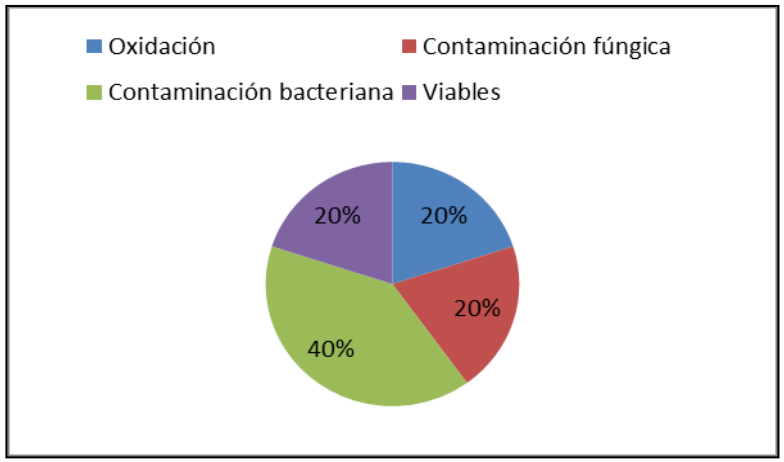
Anexo 5. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los Tratamientos T3 y T4 en brotes de *C. catenaeformis*

T3




Elaborado por: Jiménez, 2014.

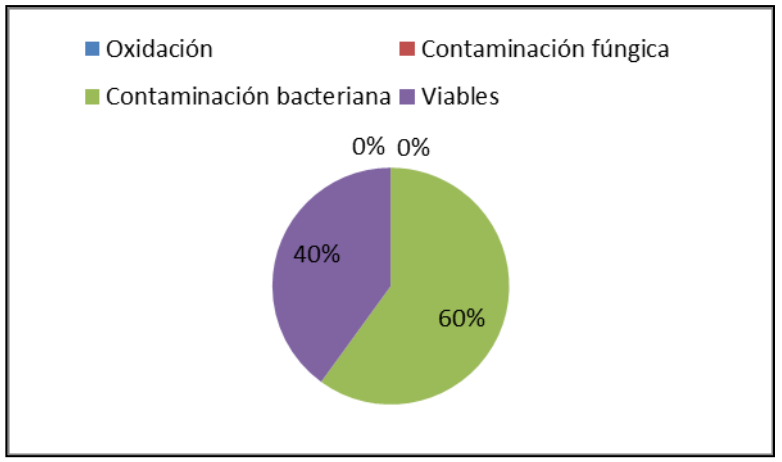
T4




Elaborado por: Jiménez, 2014.

Anexo 6. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en el Tratamiento T5 en brotes de *C. catenaeformis*.

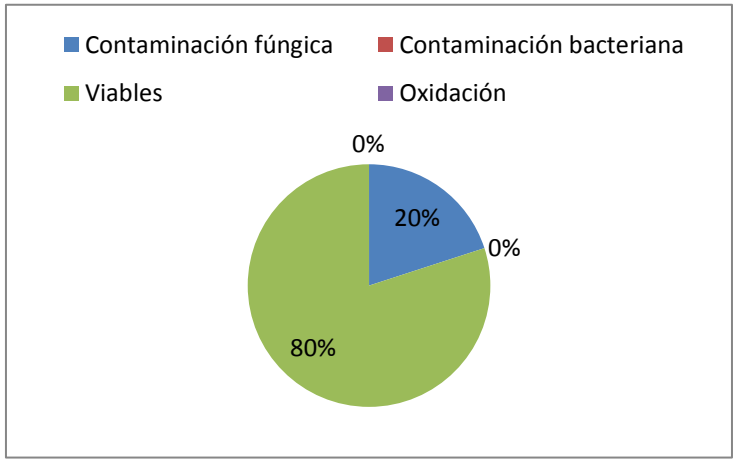
T5




Elaborado por: Jiménez, 2014.

Anexo 7. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en el Tratamiento T2 en semillas de *B. incana.*

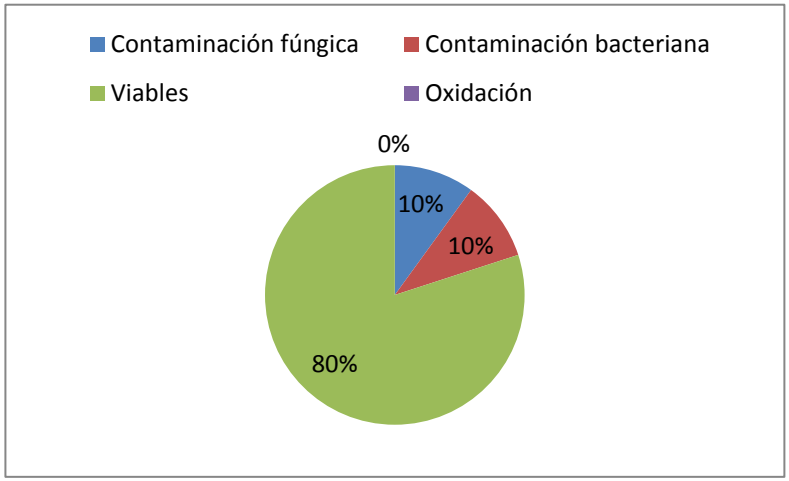
T2




Elaborado por: Jiménez, 2014.

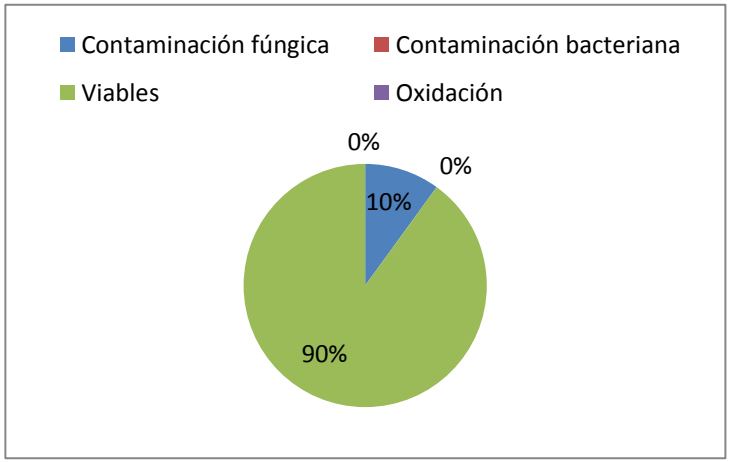
Anexo 8**.** Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los Tratamientos T5 y T6 en semillas de *B. incana*.

T5




Elaborado por: Jiménez, 2014.

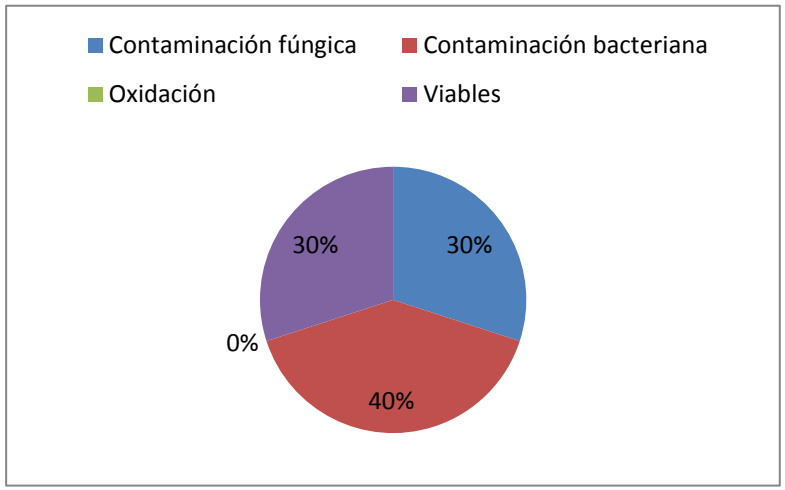
T6




Elaborado por: Jiménez, 2014.

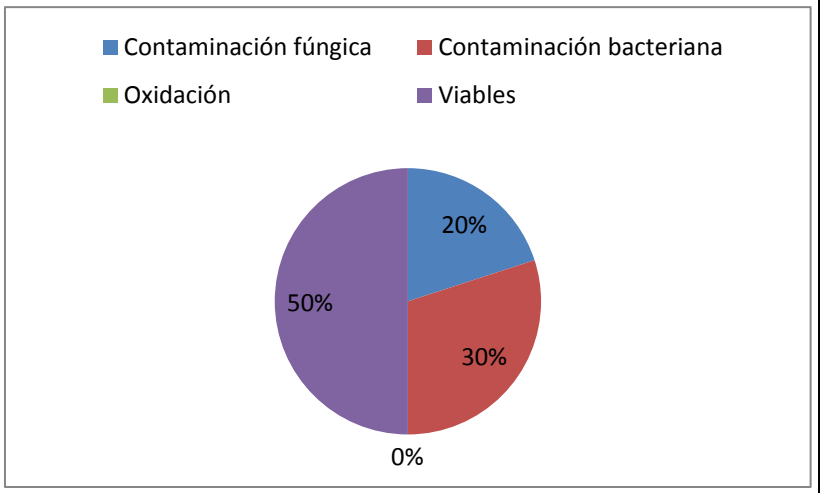
Anexo 9. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los Tratamientos T1 y T2 en brotes de *B. incana*.

T1




Elaborado por: Jiménez, 2014

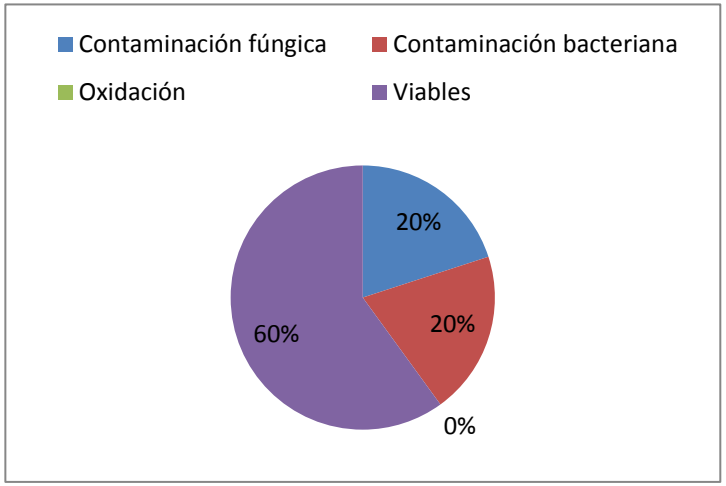
T2




Elaborado por: Jiménez, 2014

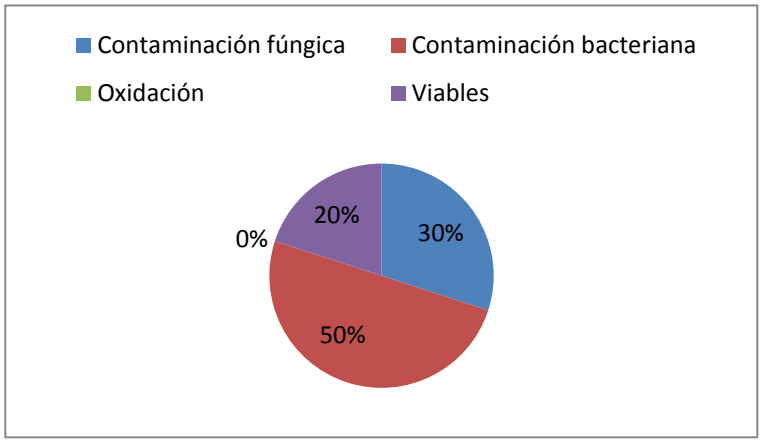
Anexo 10. Porcentajes de oxidación y contaminación bacteriana - fúngica en los Tratamientos T3 y T4 en brotes de *B. incana*.

T3




Elaborado por: Jiménez, 2014.

T4




Elaborado por: Jiménez, 2014

Anexo 11. Fotos de contaminación en semillas de *C. catenaeformis.*

| | |
|---|---|
| Contaminación por bacterias | Elaborado por: Jiménez, 2014. |
| Contaminación por hongos | Elaborado por: Jiménez, 2014. |

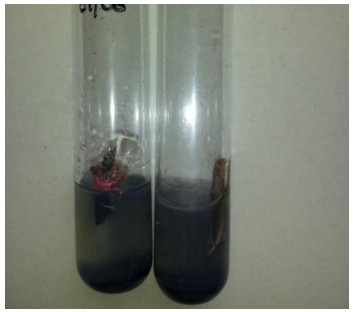
Anexo 12. Fotos de contaminación en brotes de *C. catenaeformis.*

| | |
|---|---|
| Contaminación por bacterias | Elaborado por: Jiménez, 2014 |
| Contaminación por hongos | Elaborado por: Jiménez, 2014. |

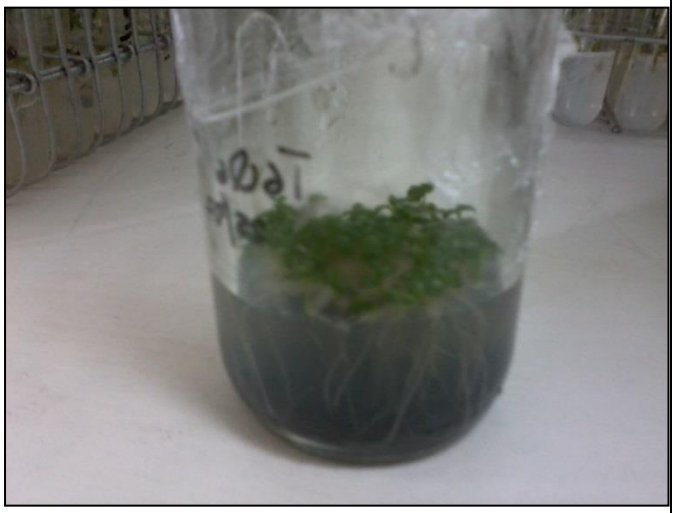
Anexo 13. Fotos de contaminación en semillas de *B. incana*.

| | |
|---|---|
| Contaminación por hongos | <br>Elaborado por: Jiménez, 2014. |

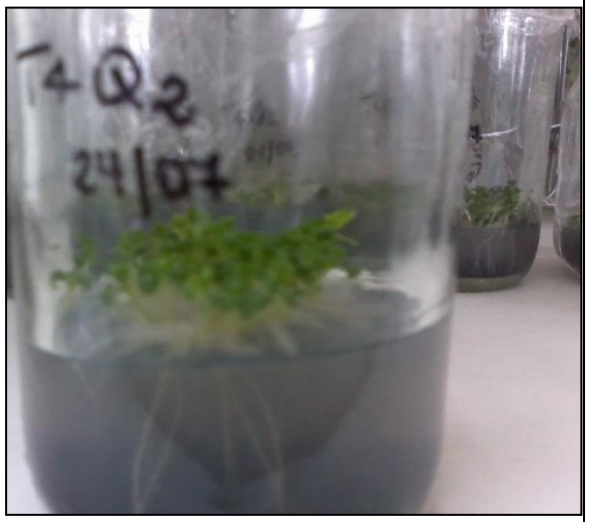
Anexo 14. Fotos de contaminación en brotes de *B. incana*.

| | |
|---|---|
| Contaminación por bacterias |  <br>Elaborado por: Jiménez, 2014. |
| Contaminación por hongos | <br>Elaborado por: Jiménez, 2014 |

Anexo 15. Fotos de germinación de *B. incana* a los 30 días.

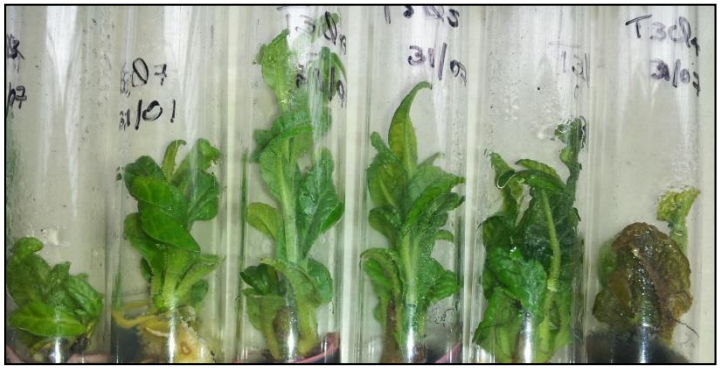


Elaborado por: Jiménez, 2014**.**




Elaborado por: Jiménez, 2014.

Anexo 16**.** Fotos de brotación de *B. incana* a los 30 días.

| | |
|---|---|
| |  |
| Elaborado por: Jiménez, 2014 | Elaborado por: Jiménez, 2014. |

Anexo 17. Fotos de multiplicación de *B. incana* a los 30 días.

<table>
<tr>
<td> <br>Elaborado por: Jiménez, 2014</td>
<td> <br>Elaborado por: Jiménez, 2014.</td>
</tr>
<tr>
<td> <br>Elaborado por: Jiménez, 2014.</td>
<td> <br>Nota: Jiménez, 2014.</td>
</tr>
</table>

Anexo 18: Glosario

**AIB:** Ácido indolbutírico.

**ANA:** Ácido naftilacético.

**AIA:** Ácido indolacético.

**ABA:** Ácido abscísico.

**Agente quelante:** Sustancias que tienen la propiedad de fijar iones.

**Callo embriogénico:** Inducción de las células, fase proliferativa.

**Hiperhidricidad:** Trastorno fisiológico caracterizado por la retención de agua.

**M&S:** Formulación Murashige y Skoog.

**pH**: Potencial hidrógeno.

**Recalcitrante:** No sobrevive en condiciones de sequedad y frío cuando los explantes son conservados *ex-situ.*

**WPM:** Formulación Woody Plant Medium (Lloyd y McCown).