

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

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

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

**TEMA:
DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN *in vitro* DE
Geranium chilloense Willd. ex Kunth. Y *Lupinus pubescens* Benth.
PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS COMPLETAS, PARA LA
PRIMERA ETAPA DE RESTAURACIÓN DE LAS QUEBRADAS DE
QUITO**

**AUTORA (S):
THALY GABRIELA BENAVIDES SILVA
ADRIANA ISABEL CÓRDOVA MUÑOZ**

**DIRECTOR/A
IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO**

Quito, mayo del 2015

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

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

Además, declaramos que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de las autoras.

Quito, mayo del 2015

Adriana Isabel Córdova Muñoz

C.I. 1723284277

Thaly Gabriela Benavides Silva

C.I. 1716302847

DEDICATORIA

A Dios por todas las bendiciones que he recibido en mi vida.

A mis padres Fanny y Manuel, por su apoyo incondicional, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación durante el transcurso de mi vida.

A mi hermana Andrea, por estar conmigo en las buenas y en las malas y ser mi ejemplo a seguir.

A mi novio Jonathan, por estar siempre a mi lado compartiendo mis alegrías y mis tristezas y brindándome su amor incondicional.

A mi hija Paula Emilia, que ha sido mi fortaleza y mi mayor impulso para seguir adelante y cumplir con mis metas.

A mi amiga y compañera de tesis Adri, por su apoyo en todo momento y por motivarme a seguir adelante.

Thaly Benavides

Dedico principalmente a Dios por todas las bendiciones en todo momento de mi vida.

A mis padres Carlos y Rosa, por darme la oportunidad de haber ayudado con mis estudios académicos y por prestarme siempre su ayuda, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, aconsejándome, corrigiéndome y siendo parte fundamental en la culminación de mi formación profesional.

A mis hermanos Gabriela, Juan Carlos, Daniel y Felipe que durante estos años ha sabido apoyarme en todo momento y han sido parte principal en mi vida.

A mi novio Daniel, que me a brindó su amor y apoyo incondicional en todo momento.

A mi compañera y amiga de tesis Thaly, que con su amistad y ayuda he logrado culminar el trabajo de titulación

Adriana Córdova

AGRADECIMIENTOS

A la Taxónoma Tatiana Jaramillo, por su apoyo y por facilitarnos el laboratorio y los recursos necesarios del Jardín Botánico de Quito, para poder realizar nuestra investigación.

Al Ing. Felipe Andrade, por su aporte invaluable y por darnos la oportunidad de crecer profesionalmente.

A la Ing. Alicia Morales, por todos sus valiosos conocimientos impartidos.

A nuestra tutora Msc. Ivonne Vaca, pues con su ayuda y dirección hemos logrado culminar exitosamente el trabajo de investigación dejando en nosotros conocimientos valiosos.

A la Universidad Politécnica Salesiana por la excelente educación brindada a lo largo de nuestra etapa universitaria.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis.....	3
Hipótesis Nula (HO)	3
Hipótesis Alternativa (HA)	3
Objetivos	3
Objetivo general:	3
Objetivos específicos:	3
CAPÍTULO 1	
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Flora nativa del Ecuador	5
1.1.1 Generalidades.....	5
1.1.2 Disminución en la población de flora nativa en el Ecuador.....	5
1.1.2.1 Causas de disminución de la Flora en Ecuador.....	6
1.1.3 Flora patrimonial de Quito.....	7
1.1.3.1 Criterios utilizados para la aceptación de una especie vegetal como planta patrimonial de Quito.	7
1.1.3.2 El Municipio del Distrito Metropolitano de Quito y sus acciones para el rescate de plantas nativas	9
1.1.4 Protección de laderas (quebradas) del Distrito Metropolitano de Quito.....	11
1.1.4.1 Marco legal: Políticas de protección de espacios naturales del Distrito Metropolitano de Quito	13
1.1.5 Género <i>Geranium</i>	17
1.1.5.1 Generalidades.....	17
1.1.5.2 Clasificación taxonómica del género <i>Geranium</i>	17

1.1.5.3	Morfología	17
1.1.5.4	Importancia	18
1.1.6	Geranio de los Chillos (<i>Geranium chilloense</i> Willd. ex Kunth).....	18
1.1.6.1	Origen y distribución.....	18
1.1.6.2	Morfología	19
1.1.6.3	Usos populares	20
1.1.6.4	Importancia de <i>Geranium chilloense</i>	21
1.1.7	Género <i>Lupinus</i>	21
1.1.7.1	Generalidades.....	21
1.1.7.2	Clasificación taxonómica del género <i>Lupinus</i>	21
1.1.7.3	Morfología	21
1.1.7.4	Importancia	22
1.1.8	Ashpa chocho de Rumipamba (<i>Lupinus pubescens</i> Benth).	23
1.1.8.1	Origen y Distribución.....	23
1.1.8.2	Morfología	23
1.1.8.3	Usos populares	23
1.1.8.4	Importancia de <i>Lupinus pubescens</i>	24
1.2	Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos.....	24
1.2.1	Concepto	24
1.2.2	Fundamentos del cultivo de tejidos.....	25
1.2.3	Totipotencialidad celular	25
1.2.4	Factores que influyen el cultivo <i>in vitro</i>	25
1.2.4.1	Material vegetal.....	25
1.2.4.2	Factores Físicos.....	26

1.2.4.3	Factores Químicos.....	27
1.2.4.3.1	Medio de cultivo	27
1.2.4.3.2	Sales Inorgánicas.....	27
1.2.4.3.3	Compuestos orgánicos	28
1.2.4.4	Materiales Inertes	31
1.2.5	Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	31
1.2.5.1	Selección del material vegetal.....	31
1.2.5.2	Establecimiento del cultivo aséptico	32
1.2.5.3	Multipliación	33
1.2.5.4	Enraizamiento	33
1.2.5.5	Adaptación al sustrato	33
1.2.6	Tipos de crecimiento <i>in vitro</i>	34
1.2.6.1	Crecimiento organizado	34
1.2.6.1.1	Cultivo de estructuras organizadas.....	34
1.2.6.2	Crecimiento desorganizado.....	35
1.2.6.2.1	Cultivo de estructuras no organizadas.	35
1.2.7	Técnicas de micropropagación.....	36
1.2.7.1	Inducción de organogénesis	36
1.2.7.2	Embriogénesis somática.....	36
1.2.7.3	Microinjertos	37
1.2.7.4	Cultivo de embriones	37
1.2.8	Importancia, ventajas y aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales	37
1.2.9	Problemas <i>in vitro</i>	39

CAPÍTULO 2	
MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1 Ubicación	41
2.2 Material vegetal.....	41
2.3 Materiales.....	41
2.4 Equipos, instrumental y cristalería.....	42
2.5 Metodología	42
2.5.1 <i>Geranium chilloense</i>	42
2.5.1.1 FASE 0: Escarificación de las semillas de <i>Geranium chilloense</i>	43
2.5.1.1.1 Factores en estudio.....	43
2.5.1.1.2 Unidad experimental	44
2.5.1.1.3 Diseño	44
2.5.1.1.4 Análisis Funcional.....	44
2.5.1.1.5 Escarificación 1	44
2.5.1.1.6 Escarificación 2.....	44
2.5.1.1.7 Variables evaluadas durante la fase de escarificación en <i>Geranium chilloense</i>	44
2.5.1.2 FASE I. Protocolo de desinfección e introducción al medio de cultivo	46
2.5.1.2.1 Tratamientos de desinfección de las semillas de <i>Geranium chilloense</i>	46
2.5.1.2.2 Factores en estudio.....	46
2.5.1.2.3 Descripción de los protocolos de desinfección	47
2.5.1.2.4 Variables evaluadas en los protocolos de desinfección	47
2.5.1.2.5 Introducción al medio de cultivo de <i>Geranium chilloense</i>	48
2.5.1.2.6 Unidad experimental	48

2.5.1.2.7	Diseño	48
2.5.1.2.8	Análisis Funcional.....	49
2.5.1.2.9	Variables valoradas para la introducción al medio de cultivo	49
2.5.1.3	FASE II. Concentración óptima de reguladores de crecimiento para la fase de multiplicación en <i>Geranium chilloense</i>	51
2.5.1.3.1	Factores en estudio.....	51
2.5.1.3.2	Unidad experimental	52
2.5.1.3.3	Diseño	52
2.5.1.3.4	Análisis Funcional.....	52
2.5.1.3.5	Variables evaluadas en la fase de multiplicación.....	53
2.5.1.4	Fase III: Adaptación al sustrato de <i>Geranium chilloense</i>	54
2.5.1.4.1	Factores en estudio.....	55
2.5.1.4.2	Unidad experimental	55
2.5.1.4.3	Diseño	55
2.5.1.4.4	Análisis Funcional.....	55
2.5.1.4.5	Variables valoradas durante las Fase III en <i>Geranium chilloense</i>	55
2.5.2	<i>Lupinus pubescens</i>	57
2.5.2.1	Escarificación de las semillas de <i>Lupinus pubescens</i>	57
2.5.2.2	FASE I. Protocolo de desinfección e introducción al medio de cultivo	57
2.5.2.2.1	Protocolos de desinfección de las semillas de <i>Lupinus pubescens</i>	57
2.5.2.2.2	Factores en estudio.....	58
2.5.2.2.3	Descripción de los tratamientos de desinfección	58
2.5.2.2.4	Variables evaluadas en los protocolos de desinfección	59
2.5.2.2.5	Introducción al medio de cultivo de <i>Lupinus pubescens</i>	59
2.5.2.2.6	Unidad experimental	59

2.5.2.2.7	Diseño	60
2.5.2.2.8	Análisis Funcional.....	60
2.5.2.2.9	Variables valoradas para la introducción al medio de cultivo	60
2.5.2.3	FASE II. Concentración óptima de reguladores de crecimiento para la fase de multiplicación en <i>Lupinus pubescens</i>	61
2.5.2.3.1	Factores en estudio.....	62
2.5.2.3.2	Unidad experimental	62
2.5.2.3.3	Diseño	63
2.5.2.3.4	Análisis Funcional.....	63
2.5.2.3.5	Variables evaluadas en la fase de multiplicación.....	63
2.5.2.4	FASE III: Enraizamiento <i>in vitro</i>	64
2.5.2.4.1	Factores en estudio.....	64
2.5.2.4.2	Unidad experimental	64
2.5.2.4.3	Diseño	64
2.5.2.4.4	Análisis Funcional.....	65
2.5.2.4.5	Variables evaluadas durante la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Lupinus pubescens</i>	65
2.5.2.5	Fase IV: Adaptación al sustrato de <i>Lupinus pubescens</i>	66
2.5.2.5.1	Factores en estudio.....	66
2.5.2.5.2	Unidad experimental	66
2.5.2.5.3	Diseño	67
2.5.2.5.4	Análisis Funcional.....	67
2.5.2.5.5	Variables valoradas durante las Fase IV en <i>Lupinus pubescens</i>	67
CAPÍTULO 3.....		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		71

3.1	<i>Geranium chilloense</i>	71
3.1.1	FASE 0: Escarificación de las semillas de <i>Geranium chilloense</i>	71
3.1.1.1	Porcentaje de contaminación bacteriana	72
3.1.1.2	Porcentaje de contaminación fúngica.....	72
3.1.1.3	Porcentaje de fenolización del medio de cultivo.....	72
3.1.1.4	Porcentaje de fenolización del explante.....	73
3.1.1.5	Porcentaje de germinación	73
3.1.1.6	Porcentaje de Supervivencia	73
3.2	FASE I. Protocolo de desinfección e introducción al medio de cultivo	75
3.2.1	Protocolo de desinfección en las semillas de <i>Geranium chilloense</i>	75
3.2.1.1	Porcentaje de contaminación bacteriana	76
3.2.1.2	Porcentaje de contaminación fúngica.....	76
3.2.1.3	Porcentaje de fenolización del medio de cultivo.....	76
3.2.1.4	Porcentaje de fenolización del explante.....	77
3.2.1.5	Porcentaje de supervivencia.....	77
3.2.1.6	Porcentaje de germinación	77
3.2.2	Introducción al medio de cultivo en sales MS	80
3.2.2.1	Porcentaje de germinación	81
3.2.2.2	Porcentaje de supervivencia.....	81
3.2.2.3	Porcentaje de presencia de raíces.....	81
3.2.2.4	Promedio de número de hojas.....	82
3.2.2.5	Promedio de longitud	82
3.2.2.6	Color del explante	82
3.2.2.7	Porcentaje de contaminación bacteriana	87

3.2.2.8	Porcentaje de contaminación fúngica.....	87
3.2.2.9	Porcentaje de fenolización del medio de cultivo.....	87
3.2.2.10	Porcentaje de fenolización del explante.....	88
3.3	FASE II. Multiplicación in vitro de los explantes de <i>Geranium chilloense</i>	89
3.3.1.1	Promedio número de brotes	90
3.3.1.2	Promedio número de hojas.....	90
3.3.1.3	Promedio de longitud	90
3.3.1.4	Porcentaje de presencia de raíces	91
3.3.1.5	Porcentaje de sobrevivencia.....	91
3.3.1.6	Porcentaje de callo	94
3.3.1.7	Porcentaje de marchitez	94
3.3.1.8	Color del explante	94
3.4	Fase IV. Adaptación al sustrato de <i>Geranium chilloense</i>	96
3.4.1.1	Porcentaje de prendimiento.....	97
3.4.1.2	Porcentaje de sobrevivencia.....	97
3.4.1.3	Promedio número de hojas.....	97
3.4.1.4	Promedio de longitud	98
3.4.1.5	Color de la plántula	98
3.4.1.6	Porcentaje de marchitez	101
3.4.1.7	Porcentaje de pudrición.....	101
3.4.1.8	Promedio número de brotes.	101
3.5	<i>Lupinus pubescens</i>	102
	FASE I. Protocolo de desinfección e introducción al medio de cultivo	102
3.5.1	Protocolo de desinfección de <i>Lupinus pubescens</i>	102

3.5.1.1	Porcentaje de contaminación bacteriana	103
3.5.1.2	Contaminación fúngica	103
3.5.1.3	Sobrevivencia.....	104
3.5.1.4	Fenolización	104
3.5.2	Introducción al medio de cultivo MS.....	106
3.5.2.1	Porcentaje de germinación	107
3.5.2.2	Porcentaje de sobrevivencia.....	107
3.5.2.3	Porcentaje presencia de raíces.....	107
3.5.2.4	Porcentaje de cotiledones abiertos	108
3.5.2.5	Promedio número de hojas.....	109
3.5.2.6	Promedio de longitud	109
3.5.2.7	Color del explante	109
3.5.2.8	Porcentaje de contaminación bacteriana	113
3.5.2.9	Porcentaje de contaminación fúngica.....	113
3.6	FASE II. Interacción entre AIA y BAP evaluados en la fase de multiplicación in vitro de <i>Lupinus pubescens</i>	114
3.6.1.1	Índice de multiplicación.....	115
3.6.1.2	Promedio número de hojas.....	116
3.6.1.3	Promedio de longitud	116
3.6.1.4	Color del explante	116
3.6.1.5	Porcentaje de sobrevivencia.....	116
3.6.1.6	Porcentaje de callo	119
3.6.1.7	Porcentaje de raíces.....	119
3.6.1.8	Fenolización del explante.....	119
3.7	FASE III. Enraizamiento in vitro de <i>Lupinus pubescens</i>	121

3.7.1.1	Porcentaje de enraizamiento	121
3.7.1.2	Porcentaje de sobrevivencia	122
3.7.1.3	Porcentaje de callogénesis.....	123
3.7.1.4	Promedio número de hojas.....	123
3.7.1.5	Promedio longitud	123
3.7.1.6	Color del explante	124
3.8	FASE IV: Adaptación al sustrato en <i>Lupinus pubescens</i>	126
3.8.1.1	Porcentaje de prendimiento.....	127
3.8.1.2	Porcentaje de sobrevivencia	127
3.8.1.3	Promedio número de hojas.....	127
3.8.1.4	Promedio número de brotes	128
3.8.1.5	Promedio de longitud	128
3.8.1.6	Color de la plántula	128
3.8.1.7	Porcentaje de marchitez	130
3.8.1.8	Porcentaje de pudrición.....	130
3.8.1.9	Porcentaje de contaminación fúngica.....	130
	CONCLUSIONES	132
	RECOMENDACIONES	134
	LISTA DE REFERENCIAS	136
	ANEXOS	149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Geranium</i>	17
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Lupinus</i>	21
Tabla 3. Tratamientos de escarificación utilizados en las semillas de <i>Geranium chilloense</i>	43
Tabla 4. Protocolos de desinfección usados en las semillas de <i>Geranium chilloense</i>	46
Tabla 5. Composición de los medios de cultivo utilizados en la fase de introducción de <i>Geranium chilloense</i>	48
Tabla 6. Interacción de bencil amino purina (BAP) y de ácido indolacético (AIA), utilizados en la fase multiplicación en Medio MS en <i>G. chilloense</i>	52
Tabla 7. Sustratos utilizados para la fase de adaptación en <i>Geranium chilloense</i>	55
Tabla 8. Tratamientos de desinfección usados en las semillas de <i>Lupinus pubescens</i>	58
Tabla 9. Composición de sales MS evaluadas en la fase de introducción al medio cultivo de <i>Lupinus pubescens</i>	59
Tabla 10. Interacción de las concentraciones de bencil amino purina (BAP) y ácido indolacético (AIA), en la fase multiplicación de <i>Lupinus pubescens</i>	62
Tabla 11. Concentraciones de ácido naftalacético y carbón activado, utilizados en la fase de enraizamiento in vitro de <i>L. pubescens</i> , en medio MS al 50 %.	64
Tabla 12. Sustratos utilizados para la fase de adaptación en <i>Lupinus pubescens</i>	66
Tabla 13. ADEVA para las variables de contaminación bacteriana, contaminación fúngica, fenolización del medio de cultivo, fenolización del explante, sobrevivencia y germinación evaluadas en la fase de escarificación en las semillas de <i>Geranium chilloense</i>	71
Tabla 14. Promedios y pruebas de significación para los porcentajes de contaminación bacteriana y contaminación fúngica, fenolización del medio de cultivo, fenolización del	

explante, germinación y sobrevivencia para la evaluación de la escarificación en <i>Geranium chilloense</i> , evaluados a los 60 días.	72
Tabla 15. ADEVA para las variables de porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica; fenolización del medio de cultivo y del explante, sobrevivencia y germinación, evaluadas en desinfección de <i>Geranium chilloense</i>	75
Tabla 16. Promedios y pruebas de significancia para el porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica; fenolización del medio y del explante y sobrevivencia evaluadas en los protocolo de desinfección de <i>Geranium chilloense</i> , a los 60 días de evaluación.....	76
Tabla 17. ADEVA para las variables de porcentaje de germinación, porcentaje de presencia de raíces, promedio del número de hojas, promedio de longitud, color y porcentaje sobrevivencia en la fase de introducción al medio de cultivo en <i>Geranium chilloense</i>	80
Tabla 18. Promedios y pruebas de significancia para el porcentaje de germinación, porcentaje de presencia de raíces, promedio del número de hojas, promedio de longitud, color y porcentaje sobrevivencia, con respecto a la concentración de sales MS en <i>Geranium chilloense</i> , evaluados a los 60 días.	80
Tabla 19. ADEVA para porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica, fenolización del medio de cultivo de cultivo y del explante, de acuerdo a la concentración de sales MS en la Fase I evaluados a los 60 días.....	86
Tabla 20. Promedios y pruebas de significancia para los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica; fenolización del medio de cultivo y del explante, de acuerdo a la concentración de sales MS en <i>Geranium chilloense</i> , evaluadas a los 60 días del ensayo.	87
Tabla 21. ADEVA para los promedios de número de brotes; número de hojas y longitud, porcentajes de raíces y sobrevivencia evaluados en la fase de multiplicación de <i>Geranium chilloense</i> , a los 30 días.	89
Tabla 22. Promedios y pruebas de significancia de las variables evaluadas en la interacción de AIA y BAP en la fase de multiplicación in vitro de <i>Geranium chilloense</i> ,a los 30 días.....	90

Tabla 23. ADEVA para porcentaje de callo, porcentaje de marchitez y color en la fase de multiplicación de <i>Geranium chilloense</i> a los 30 días.....	93
Tabla 24. Promedios y pruebas de significancia para los porcentajes de las variables presencia de callo, marchitez y color en la fase de multiplicación de <i>Geranium chilloense</i> , evaluadas a los 30 días.....	94
Tabla 25. ADEVA para el porcentaje de prendimiento, promedio número de hojas, promedio de longitud, color y porcentaje de sobrevivencia para la fase de adaptación al sustrato en <i>Geranium chilloense</i>	97
Tabla 26. Promedios y pruebas de significancia de las variables evaluadas en la fase de adaptación al sustrato de <i>Geranium chilloense</i>	97
Tabla 27. ADEVA para porcentaje de marchitez, pudrición y promedio número de brotes en las fase de adaptación al sustrato de <i>Geranium chilloense</i>	100
Tabla 28. Promedios y pruebas de significancia para los porcentajes de marchitez y pudrimiento, el número de brotes evaluadas en la fase de adaptación al sustrato de <i>Geranium chilloense</i> , a los 30 días.	100
Tabla 29. ADEVA para contaminación bacteriana y fúngica para el protocolo de desinfección de <i>Lupinus pubescens</i>	102
Tabla 30. Promedios y pruebas de significancia para las variables porcentaje de contaminación bacteriana, fúngica y sobrevivencia, evaluadas en los tratamientos de desinfección de <i>Lupinus pubescens</i> , a los 15 días.....	103
Tabla 31. ADEVA para germinación, sobrevivencia, presencia de raíces, cotiledones abiertos, número de hojas, longitud y color en la fase de introducción al medio de cultivo MS.....	106
Tabla 32. Promedios y pruebas de significancia para las variables porcentaje de germinación, sobrevivencia, presencia de raíces y cotiledones abiertos y promedio de número de hojas, longitud y color evaluadas en la introducción al medio de cultivo en <i>Lupinus pubescens</i> a los 15 días.....	106

Tabla 33.ADEVA para contaminación bacteriana y contaminación fúngica en relación con MS sigma.....	112
Tabla 34. Promedios y pruebas de significancia de los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica relacionado con la concentración de sales MS a los 15 días de evaluación.	113
Tabla 35. ADEVA para índice de multiplicación, promedio de número de hojas, longitud, color y porcentaje de sobrevivencia en la fase de multiplicación de <i>Lupinus pubescens</i>	114
Tabla 36. Promedio y pruebas de significancia para índice de multiplicación, número de hojas, longitud, color y sobrevivencia, en la fase de multiplicación de <i>Lupinus pubescens</i> los 30 días.	114
Tabla 37. ADEVA para presencia de callo, presencia de raíces y fenolización del explante en la fase de multiplicación de <i>Lupinus pubescens</i>	118
Tabla 38.Promedios y pruebas de significancia para las variables porcentaje de callo, presencia de raíces y fenolización del explante con respecto a las diferentes interacciones entre BAP y AIA en <i>Lupinus pubescens</i> a los 30 días.....	119
Tabla 39. ADEVA para enraizamiento, sobrevivencia, callogénesis, número de hojas, longitud y color mediante la evaluación de un medio con carbón activado combinado con ANA en <i>Lupinus pubescens</i>	121
Tabla 40. Promedios y pruebas de significancia para porcentaje de enraizamiento, sobrevivencia y callogénesis, promedios de número de hojas, longitud mediante la evaluación de carbón activado combinado con ANA en <i>Lupinus pubescens</i> los 21 días.	121
Tabla 41. ADEVA para prendimiento, sobrevivencia, promedio del número de hojas totales, promedio del número de brotes, longitud y color para la fase de adaptación al sustrato de <i>Lupinus pubescens</i>	126
Tabla 42. Promedios y pruebas de significancia para porcentajes de prendimiento y sobrevivencia y promedios de número de hojas, número de brotes, longitud y color para la fase de adaptación al sustrato en <i>Lupinus pubescens</i> los 30 días.....	126

Tabla 43. ADEVA para marchitez, pudrición y contaminación fúngica en la fase de adaptación al sustrato en <i>Lupinus pubescens</i> los 30 días.	129
Tabla 44. Promedios y pruebas de significancia para porcentaje de marchitez, pudrición y contaminación fúngica evaluados en la fase de adaptación al sustrato de <i>Lupinus pubescens</i> los 30 días.	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>G. chilloense</i> , a. y b. Hábito; c. y d. Hojas, lado adaxial; e. Flores, sépalos y pétalos removidos; f. Sépalos; g. Pétalos; h. Filamentos estaminales; i. Fruto; j. Mericarpio; k. Semillas.	20
Figura 2. <i>Lupinus pubescens</i> planta emblemática y patrimonial de Quito	24
Figura 3. a) Selección de la planta madre, b) Recolección de frutos, c) Fruto y semillas de <i>G. chilloense</i>	43
Figura 4. a) Semillas remojadas sumergidas en una solución 90% agua estéril y 10 % Ácido acético (vinagre).	46
Figura 5. a) Lavado y preparación de semillas, b) Corte transversal de semillas, c) Siembra de semillas en medio MS, d) Frascos cultivados en el cuarto de incubación...	49
Figura 6. Tabla de colores para la evaluación de los explantes de <i>Geranium chilloense</i> y <i>Lupinus pubescens</i> (Colores HTLM, 2012).	50
Figura 7. a) Explante obtenido de la Fase I; b) Siembra en el medio de multiplicación.	52
Figura 8. a) Sustratos utilizados para la Fase de adaptación; b) Siembra de explantes en los diferentes sustratos; c) Señalización de plántulas por sustrato; d) Adaptación de explantes a los sustratos en el cuarto de incubación.	54
Figura 9. a) Selección de la planta madre, b) Corte de vainas, c) Semillas de <i>L. pubescens</i>	57
Figura 10. a) Eliminación de material oxidado y raíces en el explante, b) Explante de 3 cm explante, c) Siembra del explante en medio MS para multiplicación.	62
Figura 11. Porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica; fenolización al medio de cultivo y al explante, germinación y sobrevivencia con respecto a los tratamientos de escarificación realizados en <i>Geranium chilloense</i> a los 60 días.	73

Figura 12. Porcentajes de contaminación bacteriana, fúngica, fenolización del medio, fenolización del explante, sobrevivencia y germinación evaluados en la desinfección de <i>Geranium chilloense</i> , a los 60 días.	77
Figura 13. a) Contaminación bacteriana utilizando el protocolo P2; b) Contaminación fúngica presenta en protocolo P1; c) Fenolización al medio del protocolo P1; d) Fenolización del explante utilizando el protocolo P1.	79
Figura 14. a) Germinación a los 7 días; b) Germinación y formación de hojas basales a los 21 días de siembra.	81
Figura 15. a) Presencia de raíces; b) Hojas totales en el explante	82
Figura 16. a) Explante verde claro (4), en sales MS al 50%; b) Explante verde oscuro (5), en sales MS al 25%.....	83
Figura 17. Porcentajes de germinación, presencia de raíces y sobrevivencia, evaluadas en la fase de introducción al medio de cultivo de <i>Geranium chilloense</i> a los 60 días.....	83
Figura 18. Promedio de número de hojas, longitud en (cm) y color evaluadas en la fase de introducción al medio de cultivo en <i>Geranium chilloense</i> a los 60 días.....	84
Figura 19. Explantes introducidos en medio MS al 100%, a) Desinfectado con P1, b) Desinfectado con P2 y c) Desinfectado con P3; y explantes introducidos en MS al 25% d) Desinfectados a través de los protocolos P1 , b) Desinfectado con P2 y c) Desinfectado con P3 respectivamente.....	86
Figura 20. Porcentajes de contaminación bacteriana, fúngica, fenolización del medio y del explante, evaluadas con respecto al porcentaje de sales MS utilizadas en la fase de introducción al medio de cultivo en <i>Geranium chilloense</i> , a los 60 días de evaluación..	88
Figura 21. Interacción BAP: AIA en ppm de cada tratamiento, a) T1 (0:0), b) T2 (0:0.5), c) T3 (0:1), d) T4 (1:0), e) T5 (1:0.5), f) T6 (1:1).....	93
Figura 22. Porcentajes de callo y marchitez evaluados con respecto a la interacción entre BAP y AIA en la fase de multiplicación de <i>G. chilloense</i> , a los 30 días.	95
Figura 23. a) Marchitez T3; b) Marchitez T6; c) Presencia de Callo T4; d) Presencia de callo T6.....	96

Figura 24. Porcentajes de prendimiento y sobrevivencia (Tabla 19), evaluadas en la fase de adaptación al sustrato en <i>G. chilloense</i> , a los 30 días.....	98
Figura 25. Promedios de número de hojas, número de brotes y longitud, evaluados con respecto a los tratamientos T1 y T2 en la fase de adaptación al sustrato en <i>G. chilloense</i>	99
Figura 26. Enraizamiento ex vitro en fibra de coco y turba a) Primera semana, b) Segunda semana y c) Tercera semana.....	100
Figura 27. Porcentajes de marchitez y pudrimiento evaluados con respecto a los sustrato Fibra de coco y Turba en la fase de aclimatación en <i>Geranium chilloense</i> , a los 30 días	101
Figura 28. Contaminación bacteriana en: a) Tratamiento T1; b) Tratamiento T2 c) Tratamiento T3.....	103
Figura 29. Contaminación fúngica en: a) Tratamiento P1; b) Tratamiento P2; c) Tratamiento P3.....	104
Figura 30. Porcentajes de contaminación bacteriana, fúngica y sobrevivencia con respecto a los protocolos de desinfección evaluados en la fase I en <i>Lupinus pubescens</i> , a los 15 días.....	104
Figura 31. a) Germinación a los dos días b) Germinación a los tres días de siembra....	107
Figura 32. Presencia de raíces a los 6 días de evaluación.	108
Figura 33. a) Cotiledón cerrado; b) Cotiledón abierto.	108
Figura 34. a) Explante verde claro evaluado a los 7 días; b) Explante verde oscuro evaluado a los 7 días	109
Figura 35. Porcentajes evaluados para las variables germinación, presencia de raíces, cotiledones abiertos y sobrevivencia en la fase de introducción al medio de cultivo en <i>Lupinus pubescens</i> a los 15 días.....	110
Figura 36. Evaluación de los promedios en las variables número de hojas y longitud (cm) con respecto a la concentración de sales MS utilizadas en la fase de introducción al medio de cultivo en <i>Lupinus pubescens</i> a los 15 días.	110

Figura 37. Explantes en sales MS al 50% a) Desinfectado con el protocolo P1, b) Desinfectado con el protocolo P2, y c) Desinfectado con el protocolo P3, Explantes en sales MS al 25% d) Desinfectado con el protocolo P1, e) Desinfectado con el protocolo P2 y f) Desinfectado con el protocolo P3.....	112
Figura 38. a) Tratamiento 1 blanco, b) Tratamiento 2 (0 BAP y 0,5 AIA, c) Tratamiento 3 (0 BAP y 1 AIA), d) Tratamiento 4 (1 BAP y 0 AIA), e) Tratamiento 5 (1 BAP y 0,5 AIA), f) Tratamiento 6 (1 BAP y 1 AIA).	115
Figura 39. Promedios de índice de multiplicación, número de hojas, longitud y color evaluadas en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> con respecto a las diferentes concentraciones de BAP y AIA en <i>Lupinus pubescens</i> a los 30 días.	117
Figura 40. Porcentaje de callo, presencia de raíces y fenolización al explante con respecto a las diferentes interacciones entre BAP y AIA en <i>Lupinus pubescens</i> a los 30 días.	120
Figura 41. Comparación entre tratamientos en la fase de Enraizamiento <i>in vitro</i> a) Explantes obtenidos en el tratamiento T1, b) Explantes obtenidos en el tratamiento T2.	122
Figura 42. Porcentajes de presencia de raíces sobrevivencia y callo en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> con respecto a la interacción de ANA y carbón activado en <i>Lupinus pubescens</i> a los 21 días.....	123
Figura 43. Promedios de número de hojas y longitud en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> con respecto a la interacción de ANA y carbón activado en <i>Lupinus pubescens</i> a los 21 días.	124
Figura 44. Porcentajes de prendimiento y sobrevivencia, con respecto a la fibra de coco y turba utilizados en la fase de adaptación al sustrato a los 30 días.....	127
Figura 45. Promedios de número de hojas y longitud con respecto a la fibra de coco y turba utilizados en la fase de adaptación al sustrato a los 30 días.....	128
Figura 46. Porcentajes de marchitez, pudrición y contaminación fúngica evaluados en la fase de adaptación al sustrato en <i>Lupinus pubescens</i> a los 30 días.	131

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Porcentaje de contaminación.....	45
Ecuación 2. Porcentaje de fenolización del explante	45
Ecuación 3. Porcentaje de fenolización del medio de cultivo.....	45
Ecuación 4. Porcentaje de germinación	45
Ecuación 5. Porcentaje de sobrevivencia	45
Ecuación 6. Presencia de raíces	50
Ecuación 7. Promedio de longitud	50
Ecuación 8. Promedio número hojas.....	50
Ecuación 9. Color del explante	50
Ecuación 10. Promedio número de brotes.....	53
Ecuación 11. Porcentaje de formación de callo	53
Ecuación 12. Porcentaje de marchitez	54
Ecuación 13. Porcentaje de pudrición.....	56
Ecuación 14. Porcentaje de prendimiento	56
Ecuación 15. Porcentaje de cotiledones abiertos	60
Ecuación 16. Índice de multiplicación	63

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resolución No. 350, Resuelve Declarar Patrimonio Natural, Histórico, Cultural y paisajístico al Sistema de Quebradas del Distrito Metropolitano de Quito ..	149
Anexo 2. Resolución No. 238 Plantas emblemáticas del Distrito Metropolitano de Quito	152
Anexo 3. Composición del medio de cultivo Murashige and Skoog (M&S) 1962	157

RESUMEN

Geranium chilloense Willd. ex Kunth conocida con el nombre de geranio de los Chillos, es una planta ornamental, nativa de Los Andes que se encuentra de manera silvestre en las quebradas del Distrito Metropolitano de Quito (Jaramillo, 2013, p. 86) y, forma parte de la historia de la flora nativa de Quito, ya que ha sido descrita desde la expedición de Alexander Humboldt y Aimé Bonpland en 1802 (Ruales & Guevara, 2010, pp. B54-B63). *Lupinus pubescens* Benth, conocida también con el nombre de Ashpa chocho o Allpa chocho, es una planta herbácea, nativa y ornamental debido a la belleza de sus flores, declarada como una de las siete especies emblema de la flora quiteña (USFQ, 2012).

El presente estudio se realizó con el propósito de desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth. y *Lupinus pubescens* Benth., para la obtención de plantas completas. En geranio de los Chillos, la mejor escarificación consistió en tres días de hidratación, seguida de una inmersión de dos horas en una solución de ácido acético al 10 % + 90% de agua destilada estéril, obteniendo un mayor porcentaje de germinación (31%). Para la desinfección se determinó, que el protocolo P1, que se basa en sumergir en alcohol al 96% (10 seg), luego hipoclorito de sodio 50% v/v (3% p.a), al lograr un cero de contaminación bacteriana, y el protocolo P3 que se basa en sumergir en etanol al 70% (1 min), luego en hipoclorito de sodio al 20% v/v (1,2 p.a) más tween (20 min), al obtener baja contaminación fúngica (3%), siendo ambos protocolos favorables para la desinfección. Mientras que en la etapa de introducción el medio MS reducido a 25% de la concentración de sus sales obtuvo mayor porcentaje de germinación (41%). En la multiplicación se logró mayor número de brotes (3,88) con el tratamiento T2 que consistió en 0 ppm de BAP y 0,5 ppm de AIA. Y finalmente en la fase adaptación al sustrato la turba estéril dio los mejores resultados para variable prendimiento (81%).

Para el chocho, se logró una desinfección óptima al utilizar el tratamiento P1, con alcohol etílico al 96% (10 seg), seguido de hipoclorito de sodio al 50% v/v (10 min), obteniendo bajo porcentaje de contaminación bacteriana (2%) y fúngica (5%); en cuanto

a la introducción al medio de cultivo, se escogió el medio MS reducido a la mitad de su concentración, ya que presentó el 100% de germinación. En la multiplicación, el tratamiento T5 con 1 ppm BAP y 0,5 ppm AIA, logró un mayor promedio de índice de multiplicación (3,22). En la fase de enraizamiento se obtuvo mayor porcentaje de presencia de raíces (64%) con 1 ppm de ANA combinado con 1000 mg de carbón activado y finalmente en la fase de adaptación al sustrato la fibra de coco mostró los mayores porcentajes de prendimiento (71%) y sobrevivencia (79%).

Palabras clave: cultivo *in vitro*, propagación, *Geranium chilloense*, *Lupinus pubescens*

ABSTRACT

Geranium chilloense Willd. ex Kunth known as geranio de los Chillos, is an ornamental plant, native of Los Andes it can be found in a wild way in the ravines of the Metropolitan District of Quito and it is part of the history of the native flora of Quito since has been described from the Alexander Humboldt and Aimé Bonpland expedition in 1802. *Lupinus pubescens* Benth, also known as Ashpa chocho or Allpa chocho, is an herbaceous, native and ornamental plant due to the beauty of his flowers, declared as one of the Seven Species emblem of the flora of Quito.

The present study was realized by the intention of developing a protocol for the propagation *in vitro* of *Geranium chilloense* and *Lupinus pubescens* to obtain complete plants. In *Geranium chilloense*, the best scarification consisted of three days of hydration followed by a two-hour immersion in a solution of acetic acid 10% + 90 % sterile distilled water, obtaining a higher germination percentage (31%). It was determined that P1 protocol that is based on immersed in alcohol at 96% (10 sec), then in hypochlorite sodium at 50% v/v (3% p.a), to achieve a zero of bacterial contamination and P3 protocol that is based on immersed in ethanol 70% (1 min), then in hypochlorite sodium at 20% (1,2 p.a) plus tween (20 min), obtaining low fungal contamination (3%), both being favorable for disinfection protocols. In the stage of introducing the MS medium reduced to 25 % of the concentration of salts obtained higher germination percentage (41%). For multiplication was greater number of shoots (3,38) with T2 treatment which consisted of 0 ppm 0,5 ppm of IAA and BAP. And finally during the adaptation to the substrate the best results for variable grafting (81 %).

For chocho, an ideal disinfection was achieved on having used the treatment P1, with ethyl alcohol at 96 % (10 sec), followed by sodium hypochlorite at 50 % v/v (10 min), obtaining low percentage of bacterial contamination (2%) and fungal (5%); as for the introduction to the culture medium, the MS diminished to the half of his concentration was chosen on having reached 100 % of germination. In multiplication, the treatment T5 with 1 ppm BAP and 0,5 ppm AIA, achieved a higher average rate of multiplication

(3,22). In the rooting phase higher percentage of presence of roots (64%) was obtained with 1 ppm of ANA combined with 1000 mg of activated charcoal and finally at the stage of adaptation coconut fiber substrate showed higher percentage of grafting (71%) and adaptability (79%).

Key Words: *In vitro* culture, propagation, *Geranium chilloense*, *Lupinus pubescens*

INTRODUCCIÓN

El Distrito Metropolitano de Quito está ubicado en una hoya, atravesada por ríos. Estos causes crean una gran cantidad de quebradas, denominadas también “Huayco” sinónimo de vida (Jaramillo, 2014, pág. 2).

Las quebradas además de constituirse como refugios de vida natural, en la antigüedad eran consideradas, como sitios sagrados, pues en su interior corría agua que era utilizada para realizar ritos ancestrales. Actualmente, el 50% de especies de plantas y animales nativos de la ciudad se encuentra en las quebradas de Quito (El Telégrafo, 2014). Lamentablemente, hoy por hoy los mismos habitantes han ocasionado la destrucción del patrimonio vegetal de la ciudad al rellenar quebradas, construir parques lineales y promover la siembra de especies exóticas, totalmente ajenas al paisaje, incluso creyendo por desconocimiento que se tratan de especies nativas (Bustamante M. , 2012).

En la actualidad el Municipio del Distrito Metropolitano de Quito, a través de diferentes proyectos busca garantizar la protección de las laderas más extensas en el eje longitudinal de Quito, con este motivo el Municipio crea la resolución histórica C350 (Anexo 1), en donde se resuelve “Declarar Patrimonio Natural, Histórico, Cultural y Paisajístico al sistema de Quebradas del Distrito Metropolitano de Quito” (Consejo Metropolitano de Quito, 2012), impulsando la restauración, conservación y protección del suelo, flora, fauna, recursos hídricos y funciones naturales ligadas a las quebradas del Distrito Metropolitano de Quito (Mosquera G. , 2014). Los ecosistemas nativos de la sierra ecuatoriana reúnen una alta biodiversidad poco conocida, así como elevados niveles de endemismo y por ello son prioridad para investigación y conservación (Bustamante M. , 2012). Entre los proyectos de conservación y restauración de quebradas se contemplan dos grandes representantes de numerosas especies patrimoniales de Quito, como son el geranio de los Chillos y el chocho silvestre o Ashpa chocho.

Geranium chilloense Willd. ex Kunth, conocida con el nombre de geranio de los Chillos, es una planta ornamental, nativa de Los Andes, se la encuentra de manera silvestre en las

quebradas del DMQ (Jaramillo, 2013, p. 86) y, forma parte de la historia de la flora nativa de Quito ya que ha sido descrita desde la expedición de Alexander Humboldt (Ruales & Guevara, 2010, pp. B54-B63). *Lupinus pubescens* Benth, conocida también con el nombre de Ashpa chocho o Allpa chocho, es una planta herbácea, nativa y ornamental debido a la belleza de sus flores, declarada como una de las siete especies emblema de la flora quiteña (USFQ, 2012). Tanto el geranio de los Chillos como el chocho silvestre, son consideradas especies con un alto potencial para utilizarse en la primera etapa de restauración en las quebradas de Quito, mientras que en los espacios públicos y parques deberían ser integradas como componentes del nuevo paisajismo de Quito (Jaramillo, 2013, pág. 4).

Para la reforestación y ornamentación del Distrito Metropolitano de Quito, el Municipio cuenta con viveros donde propagan especies nativas y exóticas por métodos convencionales, tales como siembra de semillas y cultivo de estacas, alrededor de 300000 plantas por año, cantidad que no abastece la demanda (El Comercio, 2009). Por ello se ha visto la necesidad de implementar otras metodologías de producción de plántulas, mediante el desarrollo de un protocolo *in vitro* de propagación de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth. (Geranio de los Chillos) y *Lupinus pubescens* Benth (Ashpa chocho), para la obtención de plantas completas.

Es importante recalcar que la propagación de las dos especies nativas mencionadas, contribuirán a la restauración y conservación de la flora propia de las quebradas de Distrito Metropolitano de Quito y de sus zonas aledañas, para que en un futuro cercano las quebradas retornen a ser nichos de vida natural, por lo tanto, un manejo integral de las laderas contemplará también oportunidades sanas de educación, recreación y contacto directo con el ecosistema, influyendo en la valoración por parte de los ciudadanos con la naturaleza propia de Quito y sus alrededores, contribuyendo a la disminución en la introducción de especies foráneas que afectan altamente el desarrollo y continuidad de nuestra flora y fauna nativa (FAO, 2013).

Hipótesis

Hipótesis Nula (HO)

La propagación *in vitro* es una técnica que no permite obtener plantas completas de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth ni de chocho *Lupinus pubescens* Benth.

Hipótesis Alternativa (HA)

La propagación *in vitro* es una técnica que permite obtener plantas completas de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth y chocho *Lupinus pubescens* Benth.

Objetivos

Objetivo general:

Desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth y *Lupinus pubescens* Benth., para la obtención de plantas completas, para la primera etapa de restauración de las quebradas de Quito.

Objetivos específicos:

- Seleccionar un protocolo óptimo de desinfección de explantes de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth. y *Lupinus pubescens* Benth mediante la evaluación de tres tratamientos, para la introducción al medio de cultivo.
- Evaluar tres concentraciones de sales Murashige & Skoog (MS) en la fase de introducción al medio de cultivo, con la finalidad de obtener el mayor porcentaje de explantes adaptados posibles.
- Determinar la concentración óptima de ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el medio de cultivo, mediante la evaluación de tres niveles, con la finalidad de obtener el mayor número de brotes en la fase de multiplicación.

- Establecer la interacción óptima de carbón activado (CA) y ácido naftalenacético (ANA), mediante la evaluación de dos dosis para cada uno, con la finalidad de obtener el mayor porcentaje de enraizamiento *in vitro*.
- Elegir el sustrato óptimo durante la fase de aclimatación mediante la evaluación de turba y fibra de coco, con la finalidad de obtener el mayor porcentaje de adaptación *ex vitro*.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Flora nativa del Ecuador

1.1.1 Generalidades

Múltiples especies de plantas del Ecuador fueron recolectadas y estudiadas de manera científica hace más de 200 años por el geólogo y naturalista Alexander von Humboldt y el botánico francés Aimé Bonpland. En 1804, los científicos se instalan en París, donde inician la descripción y nombramiento de cada especie nueva recolectada. Posteriormente, publican el catalogo ‘Flora Quitensis’ editado en latín por Humboldt, Bonpland & Kunth., el cual tiene como introducción el recorrido de los viajeros en Quito y zonas aledañas. El catálogo inicia con localidades de las actuales provincias de Carchi e Imbabura, luego continúan citando localidades de Quito y sus alrededores que incluyen a zonas actuales de la provincia de Pichincha y Napo (Ruales & Guevara, 2010, p. 54;55).

Los hechos anteriormente mencionados dan un valor histórico y cultural a la flora ecuatoriana, sin embargo parte de este valor viene dado desde los pueblos ancestrales que desarrollaron conocimientos sobre las utilidades curativas, nutritivas y constructivas de nuestra flora nativa, que ha sido transmitida de generación en generación, enriqueciendo de alguna manera la sabiduría popular (Martínez, 2013, p. 1).

1.1.2 Disminución en la población de flora nativa en el Ecuador

Ecuador presenta una inmensa variedad de flora, sin embargo se estima que entre 19 y 46 especies de plantas, se han extinguido en el país en los últimos 250 años como respuesta a la pérdida de hábitat (Ruales, 2007, pág. 1), que en gran medida se debe a que Ecuador, al ser el país más densamente poblado del continente sudamericano ejerce una terrible presión sobre los bosques primarios, secundarios y chaparrales, que son destruidos, deforestados e incendiados para ampliar las zonas agrícolas y urbanas del país (Vargas, 2006, pp. 13 - 14).

Adicionalmente, se conoce que 282 especies, es decir alrededor del 7% de la flora endémica del Ecuador, está calificada como críticamente amenazada, existen también indicadores de inminentes extinciones de gran escala en el país, tanto en la costa como en Los Andes. Por lo que se cree que a largo plazo no se podrá preservar más del 5 ó 10% de las especies silvestres remanentes, teniendo en cuenta la frenética expansión y destrucción humanas (Ruales, 2007, p. 1).

1.1.2.1 Causas de disminución de la Flora en Ecuador

- La segregación urbana producto de la expansión periférica, ha ocupado áreas protegidas, suelos agrícolas y recursos naturales, lo cual ha ocasionado mayores dificultades para mantener la protección de suelos con riqueza patrimonial (Villafuerte, 2014, pág. 18).
- "Introducción permanente de especies exóticas o domesticadas, que compiten o extinguen a las plantas nativas" (Ruales, 2007, p. 3).
- "Tala indiscriminada de bosques nativos, por la expansión de la frontera agrícola para monocultivos" (Burbano & Herdoíza, 2009, p. 4).
- Baja investigación en áreas urbanas, menos del 6% de las publicaciones sobre conservación de la biodiversidad se refieren a investigaciones en dichas áreas, lo cual implica poco interés en el poblado (Ruales, 2007, p. 3).
- En un gran porcentaje las plantas nativas son hierbas, plantas pequeñas y arbustos, que usualmente no caben dentro de nuestros parámetros actuales de estética, disminuyendo la siembra y utilización de plantas nativas en el ornamento de la ciudad (Martínez, 2013, p. 2).

1.1.3 Flora patrimonial de Quito

En 1736, época de la Misión Geodésica Francesa en Quito, empiezan las relaciones entre personajes de la historia y nuestras plantas: Charles-Marie de La Condamine y la Quina de Loja, Antonio de Ulloa y las plantas del páramo, Joseph de Jussieu y decenas de plantas de la Audiencia de Quito, nombradas principalmente por los botánicos Philip Miller, Jean Baptiste de Lamarck, Louis Desrousseaux, Antoine Laurent de Jussieu, Christian Persoon y Alexandre de Cassini. Más tarde en el año 1802 Alexander von Humboldt y Aimé Bonpland, quienes residieron alrededor de seis meses en Quito y en el valle de los Chillos, aportaron con más de cien especies de plantas patrimoniales de la ciudad y su entorno, siendo este el comienzo del que puede denominarse el siglo del conocimiento de la flora de Quito (Jaramillo, 2013, pág. 5).

Las plantas patrimoniales en la zona de Quito y su periferia, están ligadas a procesos históricos-culturales, pero que a su vez tienen profundas implicaciones ecológicas, hecho por el cual se han realizado investigaciones acerca de la flora de Quito, con el objetivo de obtener un mayor conocimiento de la historia botánica de la ciudad y de sus zonas aledañas, generar información que pueda ser usada en estudios de impacto ambiental que a su vez creen programas de restauración de paisajes y finalmente, alertar a los habitantes de zonas geográficas muy urbanizadas, sobre la riqueza de especies patrimoniales de las que son dueños y que de manera inconsciente se las destruye (Ruales & Guevara, 2010, pág. 56).

1.1.3.1 Criterios utilizados para la aceptación de una especie vegetal como planta patrimonial de Quito.

Para tomar a una especie como planta patrimonial de Quito según Ruales & Guevara (2010), en su artículo acerca de "La flora patrimonial de Quito descubierta por la expedición de Humboldt y Bonpland en el año de 1802", debe cumplir los tres criterios descritos a continuación:

- Si la especie fue colectada por primera vez en Quito o zonas aledañas.
- Si esta colección fue la que se utilizó para nombrar y describir especies.
- Si la especie nativa, está presente en Los Andes u otras regiones americanas, pero la colección de la planta fue hecha en Quito o zonas aledañas.

Dentro de este artículo también se ha tomado en cuenta las plantas patrimoniales de Quito, que presentan vulnerabilidad o riesgo de extinción, las cuales deben cumplir los siguientes parámetros:

- Si la especie es endémica de Los Andes ecuatorianos, puede estar presente en otras regiones, pero su descripción se hizo en base a un espécimen recolectado en Quito y zonas adyacentes.
- Si ésta es endémica y conocida solo a partir del espécimen tipo colectado en la zona de Quito.
- Si la especie es considerada como endémica y está restringida en 30 o más años a partir de su descubrimiento.
- Si las poblaciones registradas en zonas cercanas a Quito, sus valles y zonas adyacentes no se encuentran en áreas protegidas, se hallan en peligro o probablemente están extintas.

Si una especie cumple con uno o más parámetros anteriormente descritos, en especial los relacionados al endemismo, conocimiento a partir de solamente el espécimen tipo, la no existencia de nuevas colecciones y su probabilidad de extinción; se determina como especie prioritaria y en riesgo; siendo necesario identificar mecanismos para la búsqueda, rescate y de ser el caso, conservación *ex-situ* o *in-situ* de las especies patrimoniales de Quito.

1.1.3.2 El Municipio del Distrito Metropolitano de Quito y sus acciones para el rescate de plantas nativas

En el Distrito Metropolitano de Quito y en sus parroquias aledañas, el municipio mantiene cinco Áreas de Protección Ecológica, denominadas:

- a) Protección de quebradas
- b) Bosques protectores
- c) Bloques de protección de la Ciudad de Quito
- d) Bosques y mantenimiento de cobertura vegetal
- e) Reservas.

El Departamento de Parques y Jardines perteneciente a la Empresa Metropolitana de Obras Públicas entidad del Municipio de Quito, maneja el “Sistemas de áreas verdes y espacios públicos de esparcimiento, recreación y deportes”. Este Departamento maneja diez parques en la ciudad de Quito, de los cuales, no solo en dos parques (La Alameda y El Ejido) se menciona sobre la presencia de especies de plantas nativas(Ruales, 2007, p. 3). Indicando un alto índice de siembra de especies introducidas en la mayoría de parques de DMQ y sus alrededores, significando una disminución en la población de especies nativas.

La corporación Vida para Quito creada por el Municipio y la Empresa Metropolitana de Alcantarillado y Agua Potable, realiza obras que mejoren la salud ambiental y calidad de vida de la ciudad y la de sus habitantes, dicha corporación también administra los proyectos “Áreas Verdes” y “Reforestación”. En cuanto al primer proyecto maneja doce parques y una ruta ecológica, mientras que el segundo proyecto se encarga de la Reforestación del Distrito Metropolitano de Quito (Vásquez, 2008).

De los doce parques anteriormente mencionados del proyecto “Áreas Verdes”, el más grande es el Parque Metropolitano, del cual se menciona “El parque debe considerar y expresar en su vegetación y fauna, elementos propios de su naturaleza, lo que conlleva a un proceso progresivo de sustitución del eucalipto por especies nativas; lo que a su vez

permitirá la regeneración de la fauna propia de la serranía” (Ruales, 2007, pág. 4), sin embargo no cita un cronograma para el proceso, así como tampoco menciona qué especies nativas se incorporarán para reemplazar al eucalipto. También, se señala que ese proceso permitirá la regeneración de la fauna propia de la serranía, fauna que tampoco se describe. Mientras que en otro de los parques manejado por la corporación, el Parque Itchimbia se reporta como obra ejecutada “la siembra de árboles de varias especies (arrayán, quishuar, pumamaqui, álamo y capulí)”, mencionando específicamente la siembra de cinco especies nativas. Para el caso del parque Las Cuadras en el sector de Chillogallo, al suroccidente de Quito en 2005, la corporación inicia la rehabilitación del antiguo vivero, en la actualidad el vivero Las Cuadras, un espacio de 4 hectáreas que aprovisiona al menos 1000000 de plantas, de 17 variedades de árboles entre nativos y exóticos, como: pumamaqui, cholán, cepillo, álamo, cucarda, tilo, yalomán, pusopato, fresno, arupos, acacias, entre otras especies para la arborización del Distrito Metropolitano de Quito (Vásquez, 2008), que a la vez servirá también como un centro didáctico para el conocimiento y aprendizaje sobre la producción de semillas, cultivo de plantas y, conocimiento de la flora propia de Quito en un “espacio natural”, significando que éste será el parque más importante para la multiplicación de especies nativas, que servirán al proyecto de reforestación y como un futuro centro de capacitación sobre la flora nativa de Quito (Ruales, 2007, pág. 4).

Pese a que El Departamento de Parques y Jardines y la corporación Vida para Quito, entidades adscritas al municipio del Distrito Metropolitano de Quito, manejan criterios ambientales, se denota una baja prioridad para la recuperación de la flora nativa y la reconciliación ecológica, es decir, La Corporación Vida para Quito informa, e incluso ilustra con fotografías sobre la utilización especies nativas para la reforestación, sin embargo aún se consideran la multiplicación y siembra de especies exóticas como parte del plan de reforestación con plantas nativas (Vásquez, 2008). Evidenciando que no existe una total claridad del significado de la flora patrimonial de Quito, se sigue presentado confusión al referirse a plantas exóticas como plantas nativas, lo cual sugiere una falta de investigación en el tema, a este hecho se suma también que a nivel privado

tampoco se conoce de arquitectos paisajistas o productores de plantas para jardinería que manejen la propagación y diseño de jardines con flora nativa, peor aún el tema de reconciliación ecológica (Ruales, 2007, pág. 5).

1.1.4 Protección de laderas (quebradas) del Distrito Metropolitano de Quito.

Las quebradas son componentes esenciales del sistema hidrográfico local, se trata de aberturas naturales, estrechas y alargadas de distintas profundidades, ubicadas en las laderas de las montañas, a través de las cuales fluyen las aguas lluvia al producirse fuertes precipitaciones. Las quebradas surcan la ciudad en trayectos que van de 5 a 100 m, y a una profundidad de 3 a 70 m, la principal importancia de las quebradas radica en que sus paredes son propicias para germinar enredaderas, arbustos, árboles y albergar mamíferos, reptiles, insectos y aves, son refugios donde permanece la biodiversidad nativa (Villafuerte, 2014, pág. 18).

El paisaje quebrado fue siempre una característica del Distrito metropolitano de Quito, el cual cuenta con cuatro tipos de quebradas: las de páramo, de ambiente seco, bosque andino y húmedo. Esta clasificación conforma más de 240 quebradas. Donde se alberga el 50% de plantas y animales nativos de la ciudad. Los wuaycus (su nombre quichua) son considerados como los últimos reductos de vida silvestre de la ciudad. Hecho que reafirma la Secretaría Metropolitana de Ambiente resaltando que hay una enorme riqueza biológica en las quebradas, sin embargo es poco conocida. También señala que esta riqueza es altamente endémica. “Se estima que cerca del 25% de la flora de Quito es endémica y que el 20% de ésta se conoce de especímenes únicos colectados a fines del siglo XIX e inicios del siglo XX en los alrededores de Quito, principalmente en las estribaciones del volcán Pichincha y zonas adyacentes” (El Telégrafo, 2014).

Lastimosamente a través del tiempo se ha generalizado la idea de que en las quebradas viven personajes mitológicos, malignos y que, las marañas de su vegetación solo albergan molestias. Estas creencias poco a poco se convirtieron en verdad, pues los

mismos habitantes se han encargado de gestionarlas quebradas inadecuadamente, convirtiéndolas en desagües, refugios de maleantes y botaderos de basura. También, está el hecho de que en un gran porcentaje las quebradas quiteñas, con un afán de modernizarnos han sido rellenas para obtener una ciudad más plana, es por eso que gran parte de nuestra ciudad ahora se edifica sobre quebradas rellenas, especialmente en el centro de la ciudad (Bustamante M. , 2012).

En el reportaje realizado por el comunicador Freddy Ehlers, quien dirige la Secretaría del Buen vivir acerca de "Quebrada, Tesoro de la ciudad", entrevistó al arquitecto Alfonso Ortiz Crespo, quien menciona que a partir de la época de 1980, recién en la planificación municipal se busca no rellenar quebradas por protección ambiental, tomando en cuenta también la flora y fauna nativa, la creación de áreas verdes y el permitir un mejor escurrimiento del agua lluvia. Para el naturalista Juan del Hierro participe también del reportaje comenta que, con la intervención del hombre debido al crecimiento de la ciudad, se ha perdido el 90% de las quebradas, pero no es su forma física como tal, sino en el contenido de biodiversidad, porque la gente ha tomado a las quebradas como botaderos de basura y en otros casos las han relleno.

El desarrollo de las ciudades y el crecimiento poblacional en algunas localidades de manera desordenada son los principales causantes del deterioro ambiental y paisajístico de las quebradas. Las laderas del Distrito Metropolitano de Quito, han sido afectadas por la construcción de infraestructura vial, viviendas, el uso de estos espacios como un basural, escombrera y relleno para construir asentamientos ilegales en estos ecosistemas frágiles siendo un riesgo para la población (Villafuerte, 2014).

La Gestión Ambiental del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) se ha consolidado durante los últimos veinte años, contemplado dentro de sus Políticas la Protección del Patrimonio Natural y el establecimiento del subsistema de Áreas Naturales Protegidas del DMQ. Donde promueve la integración, conectividad, mantenimiento, recuperación y rehabilitación de espacios naturales priorizados según seguridad ambiental del Distrito",

cuyo objetivo específico se enfoca a disminuir la afectación antrópica progresiva a ecosistemas y espacios naturales de conservación del Distrito (Argüello, Arboleda, Menoscal, Maldonado, & Urresta, 2012, pág. 42).

1.1.4.1 Marco legal: Políticas de protección de espacios naturales del Distrito Metropolitano de Quito

Sección segunda - Ambiente sano

- Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

Sección tercera - Patrimonio natural y ecosistemas

- Art. 404.- El patrimonio natural del Ecuador único e invaluable comprende, entre otras, las formaciones físicas, biológicas y geológicas cuyo valor desde el punto de vista ambiental, científico, cultural o paisajístico exige su protección, conservación, recuperación y promoción (Constitución República del Ecuador, 2008).

Sección Segunda - Bienes de los Gobiernos Autónomos Descentralizados

Artículo 417.- Bienes de uso público.- Son bienes de uso público aquellos cuyo uso por los particulares es directo y general, en forma gratuita. Constituyen bienes de uso público:

- d) Las quebradas con sus taludes y franjas de protección; los esteros y los ríos con sus lechos y sus zonas de remanso y protección, siempre que no sean de propiedad privada, de conformidad con la ley y las ordenanzas.

- e) Las superficies obtenidas por rellenos de quebradas con sus taludes (COOTAD, 2010).

Ordenanza metropolitana 172, régimen administrativo del suelo en el Distrito Metropolitano de Quito: derogatoria de las ordenanzas metropolitanas No. 3746, 0031 y 255 (Consejo Metropolitano de Quito, 2011).

Sección III Prevención, Protección e Implementación

Parágrafo 1ro. Del Paisaje, Protección de Taludes y Quebradas

- Artículo 117.- Áreas de protección de quebradas.- En quebradas se observarán las siguientes áreas de protección y condiciones: Los bordes superiores de las quebradas, depresiones y taludes serán determinados y certificados por el organismo administrativo responsable del catastro metropolitano, en base al análisis fotogramétrico y de la cartografía disponible en sus archivos.

Resolución No. C350 - Declarar patrimonio natural, histórico, cultural y paisajístico al sistema de quebradas del Distrito Metropolitano de Quito (Secretaría General del Consejo Metropolitano de Quito, 2012)

- Artículo 1.- Declaratoria.- Declárese al Sistema de Quebradas del Distrito Metropolitano de Quito, como Patrimonio Natural, Histórico, Cultural y Paisajístico, y establecer como prioritario su cuidado, rehabilitación integral y mantenimiento a fin de prevenir los riesgos inherentes y brindar a la ciudadanía lugares de alta calidad ambiental, recreación, esparcimiento y cultura.
- Artículo 2.- Caracterización.- Las quebradas se caracterizan por poseer pendientes en diferentes grados, con presencia de remanentes de vegetación natural andina; además, constituyen cauces naturales y

microcuencas que, en muchas ocasiones, atraviesan la estructura urbana de Quito, siendo en muchos casos sujetas a usos socioeconómicos diversos, de carácter rural y urbano.

- Artículo 3.- Objeto.- La presente declaratoria de las quebradas como patrimonio natural, histórico, cultural y paisajístico, tiene por objeto proteger, conservar y recuperar las funciones naturales de las mismas, permitiendo una fusión urbano y rural que promueva el mejoramiento de la calidad de vida de los habitantes del Distrito y la seguridad ante posibles riesgos, además de brindar a los y las habitantes de la ciudad, lugares de calidad ambiental, recreación y esparcimiento
- Artículo 4.- Fines.- Los fines específicos de la presente declaratoria son los establecidos en las Ordenanzas Metropolitanas Nos. 171, 172 y 213, considerando además los siguientes:
 - a) La protección del suelo, su flora, fauna, recursos hídricos y recursos naturales existentes
 - b) El rol de conectores ecológicos del Subsistema Metropolitano de Áreas Naturales Protegidas del Distrito Metropolitano de Quito y de la Red Verde Urbana; y,
 - c) Permitir el fortalecimiento de la identidad y convivencia surgida alrededor de las quebradas.
- Artículo 5.- Manejo, Conservación y Coordinación.- La secretaría encargada del ambiente en el Distrito Metropolitano de Quito, en coordinación con las secretarías encargadas de la seguridad y gobernabilidad, ordenamiento territorial y la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento, promoverán y

normarán las actividades de manejo de los recursos naturales que se desarrollen en las quebradas, en los términos y con las limitaciones que se establezcan en las ordenanzas y sus reglamentos, así como su extensión y las condiciones para su conservación, uso, recuperación y restauración.

La secretaría encargada del ambiente, en coordinación con las demás dependencias metropolitanas, organismos de derecho público, privado y las universidades de la ciudad, emprenderán acciones urgentes tendientes a fomentar la recuperación de las quebradas del Distrito.

Hasta la fecha, aunque se han consolidado políticas ambientales favorables a la protección y restauración de las quebradas, hay escasos proyectos realizados sobre la recuperación de las quebradas de Quito. En un estudio realizado por Argüello, y otros(2012), a cerca de un monitoreo de la reforestación de las quebradas de Quito donde la empresa Servicios Forestales Serviforest S.A., se comprometió a la siembra de 37152 plantas en 43 hectáreas, distribuidas de acuerdo a las características de las quebradas (San Antonio, Chita Huaico, Grande, Rancho, Laime, Almeida, Río Villorita, Santa Rosa de Singuna, Rumihurco, El Tejar y Alugullá), el proyecto se llevóa través de la siembra en los bordes de especies forestales, arbustivas y herbáceas nativas. Tales como: Guanto, Ashpa chocho, Higuero, Arrayán, Polylepis, Níspero, Acacia, Guabo, Aliso, Molle, *Acacia mimosa*. Al realizarse el monitoreo, se obtuvieron resultados bajos, debido al poco cuidado por parte de la población, el depósito de basura, escombros, descarga de aguas residuales, construcciones en los bordes de los taludes, invasiones, en algunos casos presencia de ganado. Además, se evidenció que la empresa Serviforest S.A. no había ejecutado la siembra encontrándose únicamente eucalipto (págs 42-63).

1.1.5 Género *Geranium*

1.1.5.1 Generalidades

Geranium comprende 450 especies distribuidas en casi todo el mundo, excepto en las zonas tropicales de tierras bajas. Este género, es uno de los más representativos de la familia Geraniaceae. A nivel de Sudamérica, Perú cuenta con 34 especies nativas (ninguna introducida), Colombia posee 20 especies y en Ecuador existen 25 especies que se hallan a lo largo de Los Andes, entre los 2000 y 4000 msnm. Estas plantas crecen en los bordes de las carreteras, entre las rocas, zonas húmedas, prados, laderas cubiertas de arbustos y bosques húmedos montanos (Aedo, 2012, pág. 1).

1.1.5.2 Clasificación taxonómica del género *Geranium*

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Geranium*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Geraniales
Familia	Geraniaceae
Género	<i>Geranium</i>

Nota:(Tropicos.org, Missouri Botanical Garden, 2015);(Stevens, 2001)

1.1.5.3 Morfología

Se caracterizan por ser herbáceas anuales, bienales o perennes, rara vez arbustivas de pequeño tamaño o acolchadas. Presentan tallos aéreos de 20 a 80 cm de altura. Hojas simples, generalmente palmato-lobuladas o palmati-sectas, escasamente digitadas, tridentadas o enteras; estipuladas - libre o soldada-, papiráceas, pecioladas. Las hojas basales forman generalmente una roseta, hojas caulinares dispuestas de manera alterna u opuesta. Inflorescencia terminal o axilar, cimosa bracteada. Flores generalmente en címula bifloras, actinomorfas, raramente zigomorfas. Sépalos 5, imbricados, de ápice obtuso, mucronados. Pétalos 5, simétricos, libres, frecuentemente emarginados, a veces unguiculados. Estambres 10, en 2 verticilos: el exterior es opositipétalo y el interior alternipétalo, todos con anteras rara vez los 5 internos, filamentos libres. Nectarios 5, que alternan con los pétalos (Pender & Szczęśniak, 2011, p. 138).

Posee ovario 5 locular, con 2 primordios seminales superpuestos en cada lóculo y estilo con 5 ramas. El fruto en esquizocarpo, con un largo rostro; en la madurez se divide en 5 mericarpos de semilla solitaria, que son eyectadas al secarse el fruto; pueden o no presentar endospermo y poseen un embrión con cotiledones de margen entero o hendido y plegados (Aedo, 2005, pp. 1-3).

1.1.5.4 Importancia

Geranium se ha convertido en un género de gran importancia a nivel investigativo medicinal y en biorremediación. Se examinó la actividad antiprotozoaria del extracto de diclorometano (MeOH), fracciones y compuestos puros de las raíces de *Geranium mexicanum* en *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, se descubrió que el extracto, la fracción orgánica y un flavonoide puro se activa para estas dos especies. El compuesto activo principal fue la epicatequina, el cual sirve para el tratamiento de la diarrea, disentería y enfermedades causadas en algunos casos por protozoos entéricos (Calzada, Cervantes, & Yépez, 2005, págs. 191-193). En otro estudio analizado, se estableció que un extracto rico en polifenoles de la planta medicinal *Geranium sanguineum* L. posee una fuerte actividad anti-viral contra la influenza, el extracto contiene antioxidantes y alta capacidad de barrido en radicales (Sokmen, et al, 2005, págs. 2981-2993). *Geranium robertianum* fue utilizado como indicador en la absorción de fósforo y la disminución de infección por micorrizas vesículo- arbusculares (VAM), mediante colémbolos *Folsomia candida* (Harris & Boerner, 1990, págs. 204, 205).

1.1.6 Geranio de los Chillos (*Geranium chilloense* Willd. ex Kunth)

1.1.6.1 Origen y distribución

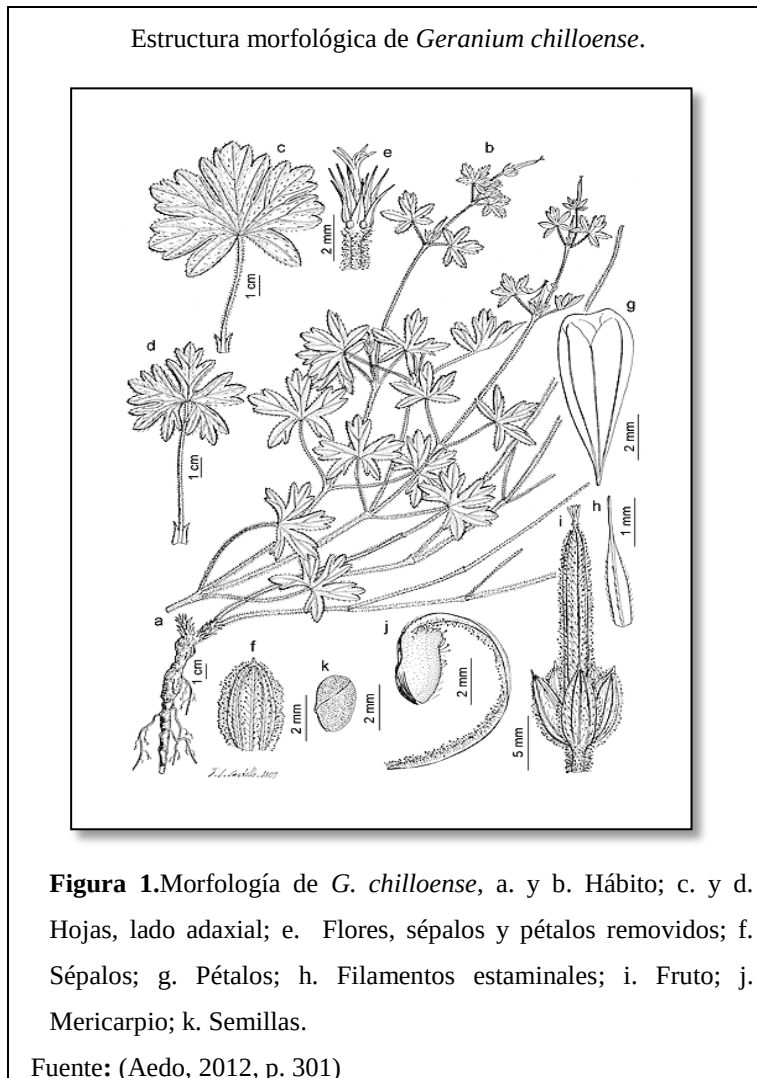
Humboldt y Bonpland el 1802 recolectaron 37 especies, en los alrededores de lo que en ese tiempo era la hacienda Chillo, siendo la especie más representativa de las varias colectadas el *Geranium chilloense*, nombrada posteriormente por el botánico alemán Carl Ludwig Willdenow (Ruales & Guevara, 2010, pp. B54-B63). "Se encuentra distribuido en Colombia, Ecuador y Perú. En nuestro país se halla a lo largo de Los Andes, entre los 2000 y 4000 msnm" (Jaramillo, 2013, pág. 86), "*Geranium chilloense*

se desarrolla en los bordes de las carreteras, entre rocas, zonas húmedas, prados, laderas cubiertas de arbustos y bosques húmedos montanos"(Aedo, 2012, p. 300).

1.1.6.2 Morfología

El geranio de los Chillos es una hierba perenne de 26 a 100 cm de alto. Su rizoma de 6,5 a 9,8 mm de diámetro, $\pm$ vertical, napiforme. Tallo ascendente o trepador, ramificado, con pelos eglandulares y glandulares patentes. Hojas basales en roseta $\pm$ persistente, cordadas, palmatolobuladas, no coriáceas, pilosas, con pelos eglandulares adpresos, a veces pelos glandulares en ambos lados; posee 5 segmentos, en un solo plano, el segmento medio va de rómbico a obtriangular, presenta 3 a 5 lóbulos en el ápice; sus hojas caulinares son opuestas; los pecíolos alcanzan 31 cm de largo, sin zona de abscisión, con pelos eglandulares patentes y usualmente también pelos glandulares patentes; las estípulas son ampliamente lanceoladas parecidas al papel de color rojizo, con pelos eglandulares en el envés y margen, adaxialmente pelos diminutos. La inflorescencia es una cima unípara o monocasio, una sola flor, solitaria, pedicelos 6,5 a 47 mm de largo, con pelos eglandulares y glandulares. Sépalos de 4,3-7 mm de largo, 1,7 - 3,1 mm de ancho, lanceolados, suaves, no acrescentes, con mucrón, con pelos eglandulares erecto - patentes y pelos glandulares abaxialmente y glabros adaxialmente. Sus pétalos miden 6,5 a 7,9 mm de largo, 1,7 a 4,4 mm de ancho, erectos - patentes, enteros o ligeramente entallado con leves hendiduras, sin garra, glabros o ciliados en el margen basal (con pelos), de color blanco. Posen 10 estambres en dos verticilos; filamentos de 2,2 a 3,5 mm de largo, lanceolados, con pelos eglandulares en el envés y en el margen; anteras 0,5-0,8 mm de largo, de color amarillento. Nectarios seminales 5, hemisféricos, glabros. Gineceo de 2,4 a 4,4 mm de largo, de color amarillento. Sus frutos miden 17-21 mm de largo, erectos, descarga: tipo eyección; mericarpios de 2,3-3,8 mm de largo, callo basal, parduzco con pelos eglandulares erecto-patentes y pelos glandulares patentes, restos

estigmáticos con 5 lóbulos glabros. Las semillas varían de 2-2,9 mm de largo, 1 -1,9 mm de ancho, finamente reticuladas, glabras, de color marrón a café; con cotiledones enteros (Figura 1) (Aedo, 2012, págs. 299-300).



1.1.6.3 Usos populares

Esta especie fue utilizada para detener hemorragias sobre todo en la época colonial durante las batallas (Batancourt & Oliva, 2012, p. 18).

1.1.6.4 Importancia de *Geranium chilloense*

Geranium chilloense, es parte histórica de la flora patrimonial de Quito, descubierta en la expedición de Alexander von Humboldt y Aimé Bonpland en el año 1802, cuando residieron en Quito y en el valle de los Chillos (Ruales & Guevara, 2010, pp. B54, B63). La investigación de la especie mencionada representa el fortalecimiento del proceso de apropiación y valoración del patrimonio natural de Quito, actualmente ha tomado gran interés en la restauración de quebradas de la ciudad, mientras que en los espacios públicos y parques, el geranio de los Chillos es integrada como componente del nuevo paisajismo de Quito (Jaramillo, 2013, pág. 86).

1.1.7 Género *Lupinus*

1.1.7.1 Generalidades

El género *Lupinus* perteneciente a la familia de las fabáceas (papilionáceas), está representado por más de 300 especies. Está distribuido principalmente en dos grandes áreas: el área mediterránea y el continente americano, siendo este último el que presenta mayor número de especies, debido a la facilidad de hibridización interespecífica que tienen las especies americanas (Swoboda, 1998, p. 12).

1.1.7.2 Clasificación taxonómica del género *Lupinus*

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Lupinus*

Reino	Plantae
División	Espermatofita
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Género	<i>Lupinus</i>

Nota: (Caicedo, Peralta, & Rivera, 2001); (Stevens, 2001)

1.1.7.3 Morfología

"*Lupinus* se caracteriza por ser una planta herbácea anual o perenne, algunas especies son arbustivas. Su altura está determinada por el eje principal que varía entre 0,5 a 2 m" (Santa Cruz E. , 2001, p. 1). "Su raíz es pivotante, robusta, profunda, forma abundantes

nódulos fijadores de nitrógeno de 1 a 3 cm de diámetro, se localizan principalmente en la raíz primaria e incluso en las raíces secundarias" (Proaño, 2011, p. 19). Posee un tallo leñoso, ramificado de color verde oscuro a castaño, en las especies silvestres es rojizo a morado oscuro, el número de ramas varía desde unas pocas hasta 52 ramas. Sus hojas son digitadas y pubescentes; están compuestas de 5 a 12 folíolos de forma ovalada a lanceolada, el peciolo varía de verde a morado, según el contenido de antocianinas en las plantas (Caicedo, Peralta, & Rivera, 2001, pp. 2, 3).

Posee flores papilionáceas, pentámeras, comúnmente azules o violáceas, raramente blancas o amarillas, dispersas o en verticilos, su cáliz posee 5 sépalos fusionados en un tubo, la corola está conformada por 1 estandarte, 2 alas y 1 quilla que envuelve al pistilo y a los 10 estambres monoandros. Los frutos son legumbres, pubescentes, transversalmente tabicadas, de varias semillas generalmente aplanadas (Swoboda, 1998, p. 12).

1.1.7.4 Importancia

En el cultivo de *Lupinus* no se requiere un suelo muy fértil, ya que es capaz de crecer en suelos desgastados, donde otras especies no se desarrollarían, lo cual lo hace un cultivo rentable y sustentable (Swoboda, 1998, pp. 13-14). El desarrollo de la especie en suelos no muy favorables se debe a su gran capacidad en la fijación de nitrógeno atmosférico al suelo, debido a que en la raíz se desarrolla un proceso de simbiosis con bacterias nitrificantes, lo que convierte a *Lupinus* en un cultivo mejorador de suelos. Por lo tanto, su importancia también radica en que ayuda a recuperar la fertilidad de los suelos y controla la erosión de los mismos (Swoboda, 1998, pp. 13-14).

"Además los alcaloides (esparteína, lupinina, lupanidina, entre otros) presentes en *Lupinus*, se emplean para controlar ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales" (Proaño, 2011, p. 23)

1.1.8 Ashpa chocho de Rumipamba (*Lupinus pubescens* Benth).

1.1.8.1 Origen y Distribución

Especie herbácea nativa de la ciudad de Quito conocida con el nombre de ashpa chocho o allpa chocho. Fue nombrada para la ciencia en 1846 como *Lupinus pubescens* por el botánico inglés George Bentham. Fue recolectada por primera vez por el botánico alemán Karl Theodor Hartweg en la zona rural de Rumipamba (Jaramillo, 2013, p. 22).

"Esta especie está distribuida en Venezuela, Ecuador y Colombia. En nuestro país se ha reportado hasta la provincia de Azuay, desde los 2000 hasta los 4000 msnm" (Jaramillo, 2013, p. 22). "Según Mc Bride (1957), en Los Andes se pueden diferenciar 83 especies del género *Lupinus*. El tarwi o chocho, se debe haber originado probablemente de una mutación espontánea de una o varias especies" (Proaño, 2011, p. 17).

1.1.8.2 Morfología

Lupinus pubescens es una hierba terrestre o subarbusto, perenne, de hasta 80 cm de alto, pubescente, raíz pivotante y robusta, tallo vigoroso, ramificado en forma de V, las hojas son digitadas y compuestas en grupos de hasta 9 foliolos, oblongos-lanceolados, presentan estipulas en la base del peciolo, su color va de verde a morado. La inflorescencia es racimosa y axilar, flores de color violeta intenso con blanco, con forma de mariposa, en racimos axilares (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo, 2001, pág. 47).

Poseen una bractéola corta, labio superior emarginado, inferior entero, corola formada por cinco pétalos: 1 estandarte, 2 quillas, 2 alas, es glabra. El fruto es una legumbre verde, pubescente. Las semillas son usualmente aplanadas y cubiertas total o parcialmente con excrecencias de color café claro a negro (Jaramillo, 2013, p. 22).

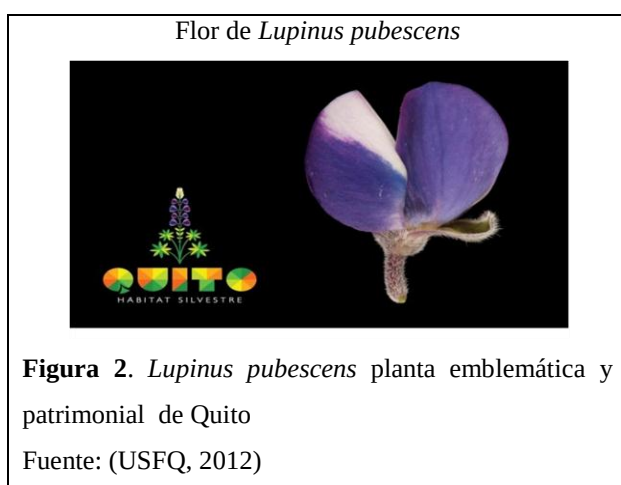
1.1.8.3 Usos populares

Las hojas del Ashpa chocho han sido utilizadas en emplasto, para curar el sarpullido, sus frutos y semillas sirven como alimento para los animales, las semillas tienen alcohol triterpénico llamado lupinol de propiedades insecticidas (Aguilar, Ulloa, & Hidalgo,

2001, p. 47). Esta especie caracterizada por la belleza de sus flores, es usada como planta ornamental para la decoración, también se usa como abono verde para enriquecer los suelos de parques, jardines y zonas de producción agrícola (Jaramillo, 2013, p. 22).

1.1.8.4 Importancia de *Lupinus pubescens*

Ashpa chocho, dentro de la flora quiteña está considerada una de las siete especies de flora patrimonial y emblemática del Distrito Metropolitano de Quito (Figura 2) (Anexo 2), debido a su importancia biológica, cultural y la relación cotidiana con los habitantes del DMQ (USFQ, 2012). En cuanto a quebradas del Distrito metropolitano de Quito, es empleada en la restauración de los bordes por su alto contenido de nitrógeno (Argüello, Arboleda, Menoscal, Maldonado, & Urresta, 2012).



1.2 Cultivo *in vitro* de tejidos

1.2.1 Concepto

Ball, fue el pionero de la multiplicación vegetativa *in vitro* o micropropagación, en 1946 obtuvo el desarrollo *in vitro* de plantas enteras a partir de meristemos apicales de vástagos de *Tropaeolum majus* y de *Lupinus albus* L. El material a cultivar requiere pasar por un protocolo de desinfección y ser cultivado en un medio nutritivo estéril, constituido principalmente por sales minerales de macronutrientes y micronutrientes,

vitaminas, hormonas vegetales, azúcar, entre otros. Estos pueden estar en estado líquido o solidificarse con agar, en base al tipo de cultivo *in vitro* (Proaño, 2011, p. 23).

1.2.2 Fundamentos del cultivo de tejidos

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es un conjunto de técnicas experimentales de reproducción en condiciones controladas de laboratorio, es decir totalmente asépticas, en las cuales a partir de pocas células individuales, un pequeño segmento inicial de tejido, llamado explante o incluso un órgano completo, puede regenerar en corto tiempo un gran número de plantas genéticamente iguales a la planta madre de la célula, explante u órgano. Todas las técnicas fundamentadas en cultivo *in vitro* de células, órganos o tejidos vegetales se basan en la totipotencia celular (Seguí, 2010, pág. 289).

1.2.3 Totipotencialidad celular

El fundamento teórico del cultivo *in vitro* es el concepto de la totipotencialidad celular, que es la capacidad que tiene una célula somática para regenerar una planta completa e igual a la planta madre, esto se debe a que cada célula posee en su material genético, toda la información necesaria para especificar cualquier rasgo morfológico, químico o funcional de la célula, el tejido y la planta, durante su ciclo vital (Calva & Pérez, 2005, p. 3).

Estas células expuestas a ciertas condiciones, desarrollan tipos de organogénesis. El término de toti-potencia celular se le atribuye a Morgan (1901), quién dijo que una célula es capaz de desarrollarse hasta formar un organismo completo, si las condiciones ambientales le son favorables y si se le aplican los estímulos adecuados (Ayala A. , 2011, p. 24). Este principio ha permitido crear, desarrollar y producir plantas completas a partir de tejidos vegetales específicos (Mosquera N. , 2007).

1.2.4 Factores que influyen el cultivo *in vitro*

1.2.4.1 Material vegetal

El estado fisiológico de la planta madre influye en su capacidad morfogénica, ya que la totipotencialidad disminuye con la edad, por lo tanto mientras el tejido sea más joven y

menos diferenciado (meristemos, explantes jóvenes no leñosos en estado vegetativo y de mayor tamaño), será mejor la respuesta *in vitro*, también se debe tomar en cuenta otros factores como que el material experimental sea sano, puesto que esto repercute sobre el porcentaje de infección después del aislamiento; y el tamaño del explante, puesto que la dificultad para iniciar un cultivo *in vitro* aumenta con la disminución del mismo (Coba, 2009, pp. 21-22).

1.2.4.2 Factores Físicos

Los factores físicos tales como la temperatura, luz y pH, juegan un papel muy importante dentro del proceso del cultivo de tejidos vegetales (Cárdenas, 2011, pp. 20-21).

- Temperatura de incubación: Para los explantes *in vitro* debe fluctuar entre 24 – 28 °C, temperaturas mayores a estas degeneran rápidamente explantes y, temperaturas inferiores evitan la activación de los proceso de iniciación de división celular (Arcos, 2010, p. 34).
- Luz: Es un factor fundamental en el proceso de morfogénesis, puesto que involucra varios componentes como la intensidad y el fotoperíodo, se debe tomar como espectro útil para el desarrollo de las plántulas de 400 a 700 nanómetros (Santamaría, 2012, p. 18).
- pH: También denominado grado de acidez o alcalinidad, éste debe mantenerse en un rango de 5,2 – 5,9 con el fin de mantener un desarrollo vegetativo óptimo, sin embargo es específico para cada especie vegetal (Ayala A. , 2011, p. 36).
- Humedad relativa (HR): La humedad relativa en cultivo *in vitro* es alta, de 70 a 80 % HR, puesto que por las paredes de vidrio y la cubierta plástica crean un efecto igual al de invernadero, una humedad menor a 50% provoca pérdidas de agua causando mayor

concentración de sales en el medio, lo cual puede resultar tóxico para los explantes, mientras que una elevada humedad relativa produce una mayor cantidad de infecciones (Albarracín, 2012, p. 27).

- Concentración de O₂ y CO₂: Se proporciona aireación a un cultivo líquido cuando se lo coloca en agitación. La concentración de CO₂ dentro de cualquier recipiente de cultivo bien sellado es casi siempre muy alta, por lo que el suministro de este gas tiene muy poco interés en el cultivo *in vitro* (Coba, 2009, p. 22).

1.2.4.3 Factores Químicos

1.2.4.3.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo es un factor esencial, ya que en él juegan un papel vital los requerimientos nutricionales y hormonales, el medio de cultivo es una combinación sólida o líquida de agua, macro y micro nutrientes, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, que en ocasiones se puede combinar con reguladores de crecimiento, dependiendo del objetivo que se persiga, puesto que éste debe ser semejante a la condición natural de la planta (Proaño, 2011, p. 27).

1.2.4.3.2 Sales Inorgánicas

Macronutrientes: Son elementos esenciales para el desarrollo de las plantas entre los cuales tenemos: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Azufre (S), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Hierro (Fe) (Pavón, 2002, p. 28).

Micronutrientes: Son elementos esenciales que se requieren en cantidades pequeñas entre los cuales tenemos: Boro (B), Molibdeno (Mo), Manganeseo (Mn), Cobalto (Co), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Cloro (Cl) y Yodo (I) (Pavón, 2002, p. 28).

1.2.4.3.3 Compuestos orgánicos

- **Carbohidratos:** Generalmente se usa sacarosa como fuente de carbono para el desarrollo de los explantes, debido a que las plantas que están en un sistema *in vitro* presentan tejidos no autótrofos y la fotosíntesis no siempre puede realizarse, especialmente si el cultivo se encuentra en la oscuridad, por lo tanto el explante no puede fabricar el azúcar requerida para su desarrollo. El contenido de sacarosa se encuentra generalmente en concentraciones del 1% al 5%, dependiendo del requerimiento de la especie y la edad fisiológica de la misma (Albarracín, 2012, p. 21).
- **Hormonas:** También llamadas reguladores de crecimiento se clasifican en:

Auxinas: Promueven la elongación y el agrandamiento celular, la formación de raíces laterales, inhiben la formación de brotes axilares y adventicios, retardan la abscisión de hojas y frutos, las auxinas se sintetizan principalmente en los ápices de los tallos y desde allí se desplazan hacia la base (Vallejo, 2012, p. 13). Estas son:

Ácido indol-3-acético (AIA): "Es la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas y actúa a nivel de los ápices, en los que hay tejidos meristemáticos, los cuales son indiferenciados" (Cruz, Melgarejo, & Romero, 2010, pág. 41).

La concentración óptima en el medio de cultivo de esta auxina puede estar entre 0,1 y 1 mg.L⁻¹, sin embargo esta concentración depende del tipo de explante, además de la concentración endógena de la auxina en la planta; por lo que pueden utilizar concentraciones de 0,001- 10mg.L⁻¹ (Arcos, 2010, p. 31).

- **Ácido α -naftalenacético (ANA):** Es una auxina sintética, se usa normalmente para inducir la formación de raíces adventicias, reducir la caída de algunos frutos, la división celular en el cambium vascular y diferenciación del xilema secundario, aumentar el crecimiento de los tallos y promover la síntesis de etileno (Proaño, 2011, pp. 30-31).

- **Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D):** "Es un herbicida hormonal, fenoxi derivado, utilizado como herbicida sistémico y selectivo para el control de malezas, sin embargo es tóxico a concentraciones elevadas" (Tarragó, Fernández, Marinich, & Lilles, 2005, pág. 1). "El 2,4-D se utiliza para inducir y mantener la formación de callos puesto que promueve una división acelerada de células, se utiliza en concentraciones de 0,1 a 10mg.L⁻¹ y entre 0,1 a 5 mg.L⁻¹ como concentración óptima" (Arcos, 2010, p. 31).

Citoquininas: Son derivados purínicos, similares principalmente a la adenina, promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales. Se sintetizan principalmente en tejidos en división activa como en semillas, frutos, raíces y en regiones meristemáticas, las citoquininas son empleadas generalmente en concentraciones de 1 a 10 mg.L⁻¹ (Albarracín, 2012, p. 23). Se clasifican en:

- **Benzilaminopurina (BAP):** Es una citoquinina, que se sintetiza en los meristemos apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en las frutas. En su forma pura, es una sustancia cristalina y blanca, en grado industrial, es blanca o ligeramente amarillenta y sin olor. Se solubiliza mejor en una solución ácida, la hormona Benzilaminopurina, es absorbida a través de las semillas germinadas, raíces, hojas y ramas tiernas. Y entre sus funciones, están las de promover la división, el crecimiento y la elongación de las células, la germinación de semillas, formación de botones florales y la floración. Regula el crecimiento de las raíces e

inhibe el proceso de envejecimiento de las hojas (Proaño, 2011, pág. 30).

- **Kinetina (KIN):** La KIN o 6-furfurilaminopurina es un compuesto que fue obtenido por Miller en 1955 y se ubica dentro del grupo de las citoquininas. Ésta hormona tiene varios efectos en diversos sistemas de crecimiento vegetal, ya que parece afectar la translocación de compuestos solubles nitrogenados. Entre sus efectos fisiológicos, están la habilidad de promover la división y elongación celular, además de romper la dormancia (Aguirre, 2008, pág. 15).
- **Zeatina (ZEA):** Estimula la división celular en callo, promueve la formación de las yemas o raíces a partir de tejido calloso, promueve la expansión de los cotiledones en dicotiledóneas, retrasa la senescencia de hojas, su estructura molecular es similar a la kinetina y su presencia es predominante en plantas superiores (Zeiger & Taíz, 2006, pp. 948-949).

Giberelinas (GA): Las giberelinas son un grupo de reguladores del crecimiento, formadas de diterpenos aisladas a partir del hongo *Gibberella fujikuroi*. Se utilizan raramente en el cultivo de tejidos, debido a que la mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas. Sin embargo la más utilizada es la giberelina GA₃ (Recalde, 2007, pág. 38).

Ácido abscísico (ABA): El ácido abscísico en la mayor parte de los casos produce un efecto negativo en los cultivos *in vitro*, pero en determinados casos promueve la maduración de embriones, y en cultivos de células en suspensión facilita la sincronización de la división celular (Recalde, 2007, pág. 39).

- **Vitaminas:** Las vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivos *in vitro* y la falta de algunas de ellas puede ser un factor limitante en la organogénesis o embriogénesis, entre las más usadas están la tiamina, biotina, ácido nicotínico, piridoxina, pantotenato, riboflavina, sin embargo hay que tener en cuenta su condición de termolábiles, para evitar su degradación en el medio de cultivo (Jácome, 2012, p. 27).
- **Aminoácidos:** Los aminoácidos deben ser utilizados con cautela, ya que un mal manejo podría ocasionar problemas en la nutrición, los más comunes en la utilización de cultivo *in vitro* son: L-arginina, ácido aspártico, L-glutamina, L-tirosina, una mezcla de aminoácidos es beneficiosa para estimular la formación de vástagos (Armendáris, 2014, p. 20).

1.2.4.4 Materiales Inertes

- "Geles Húmedos: Actúan como agentes de soporte, y son agar, gelrite y fitagel.
- Carbón Activado: En dosis bajas contrarresta los efectos negativos de los fenoles" (Esquivel & Escalant, 1994, pág. 10).

1.2.5 Etapas del cultivo *in vitro*

1.2.5.1 Selección del material vegetal

Esta etapa se ideó inicialmente como una forma de prevenir y reducir los problemas de contaminación microbiana, que de forma natural se encuentran en la superficie de la planta (Recalde, 2007, pág. 26).

Siendo de vital importancia conocer las condiciones en las que se encuentra o se ha mantenido la planta madre, de la cual se obtendrá el material vegetal para el cultivo *in vitro* previo a la desinfección (Gordón, 2012, p. 38). Por lo tanto se debe observar si la planta madre es saludable, si está fuera del estado de senescencia y libre de enfermedad

por patógenos, pese a que los explantes puede obtenerse de varias partes de la planta madre (yemas, hojas, porciones de raíces, semillas, entre otras), de preferencia se debe tomar plantas en estado juvenil puesto que hay mayor proporción de células en división, el material vegetal mantendrá la edad y las características fisiológicas de la planta madre (Albarracín, 2012, pp. 39-40).

En explantes que provienen a partir de semillas, en ciertos casos es necesario realizar un tratamiento pre-germinativo, debido a que la semilla puede encontrarse en latencia. En condiciones naturales esa latencia, tiene como propósito asegurar la sobrevivencia de las especies bajo condiciones desfavorables para el desarrollo de las plántulas. Las causas más comunes de latencia son la presencia de altos niveles de inhibidores de crecimiento que bloquean las sustancias estimulantes y la presencia de una cutícula impermeable al agua y al oxígeno, el propósito de la escarificación es disminuir la dureza de las semillas y acelerar el proceso de germinación (Sanabria, Silva, Oliveros, & Barrios, 2001, pág. 117).

Existen dos tipos de escarificación química y mecánica

- Escarificación química: Se lleva a cabo utilizando productos químicos, este tipo de escarificación, además de debilitar la capa externa de la semilla, favorece a la descontaminación de las mismas. Entre los productos que más se utiliza esta el ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácidos orgánicos (Manotoa, 2012, pág. 12).
- "Escarificación mecánica: Consiste en raspar la cubierta de las semillas con lijas, limas o hacerles un ligero corte en la punta de la semillas" (Ramirez, 2012, pág. 26).

1.2.5.2 Establecimiento del cultivo aséptico

Esta etapa consiste en la selección del explante y la asepsia del mismo para iniciar el cultivo. El objetivo es establecer cultivos asépticos y viables. La principal dificultad que surge en esta etapa son la contaminación, tanto endógena como exógena y, la oxidación

fenológica. El cultivo se considera establecido cuando el explante y/o tejido están vivos y aparentemente libre de contaminación en el medio de cultivo (Recalde, 2007, pág. 26).

1.2.5.3 Multiplicación

Una vez que el explante se ha adaptado a las condiciones del laboratorio, sin presentar ningún tipo de contaminación endógena o exógena, es transferido a un nuevo medio de cultivo, con adición de algunos reguladores de crecimiento. A medida que el explante comienza a crecer y multiplicarse es subdividido y cada nuevo explante es sub cultivado individualmente en un nuevo medio de cultivo (Suarez, 2011, pág. 18).

El objetivo en esta fase es lograr el mayor número de plantas posibles, en menor tiempo, a partir de las vitroplantas establecidas (Recalde, 2007, pág. 27).

1.2.5.4 Enraizamiento

En esta etapa las plántulas deben desarrollar un pseudotallo o tallo con las primeras hojas y formar raíces, ya que constituye una etapa de preparación y endurecimiento de los brotes para ser transferidos exitosamente al sustrato e incrementar la sobrevivencia (Vallejo, 2012, pág. 17).

"Existen muchos factores químicos y físicos que favorecen el enraizamiento *in vitro*. El estrés hídrico, la alta temperatura, la baja intensidad de luz y el uso de carbón activado" (Recalde, 2007, pág. 28).

1.2.5.5 Adaptación al sustrato

Los explantes recién enraizados son bastante sensibles a cambios ambientales, por lo que el éxito o el fracaso del proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufren cambios que permiten la adaptación de las mismas a vivir en condiciones de invernadero o campo (Vallejo, 2012, pág. 18).

Las plantas enraizadas *in vitro* presentan algunas características peculiares que dificultan su adaptación al medio externo, una vez terminado el período de cultivo *in vitro*. Estas características son: alta humedad relativa dentro de los recipientes, que provoca que las plantas obtenidas *in vitro* carezcan de algunos de los sistemas normales para evitar la pérdida de agua (la cutícula está poco desarrollada y el mecanismo de cierre de los estomas está atrofiado). Las plantas obtenidas no realizan una fotosíntesis normal, debido a que sus requerimientos de carbono son satisfechos por el medio de cultivo, por lo que son plantas más delgadas y con menor contenido de clorofila (Recalde, 2007, pág. 29).

1.2.6 Tipos de crecimiento *in vitro*

1.2.6.1 Crecimiento organizado

Cultivos que inician de una parte organizada de la planta (ápices caulinares, radicales, primordios foliares, semillas, entre otros), la cual crece *in vitro* manteniendo sus características estructurales, este tipo de crecimiento se da también cuando hay desarrollo a partir de una estructura de tejido desorganizado (organogénesis indirecta) (Esquivel & Escalant, 1994, p. 1). El cultivo de tejido organizado tiene como finalidad producir plantas que no se desvíen del genotipo materno, con el propósito de producir plantas libres de virus a partir de cultivos infectados, mantener plantas para la transferencia de materiales genéticos, producir plantas para realizar pruebas de resistencia y selección, entre otros (Estrada, 2000, p. 121).

1.2.6.1.1 Cultivo de estructuras organizadas.

- Tejido meristemático: Obtención de células a partir de yemas, ápices y meristemos de las primeras hojas bajo la yema apical; se utilizan para estimular la formación de ramas axilares que puedan separarse y posteriormente enraizar, esta técnica tiene como ventaja que los individuos regenerados presenta gran estabilidad genética, impidiendo la generación de variación somaclonal (Roca & Mroginski, 1993, p. 133). Las ventajas que se obtiene a partir de este tipo de cultivo son la regeneración de plántulas en menor tiempo libres de

contaminación y que mantienen el genotipo y fenotipo de la especie elite (Lozada, 2010, p. 20).

- Embriones cigóticos: Se puede utilizar como explante semillas o aislar embriones en estado temprano de desarrollo (corazón), tiene como objetivo romper la dormancia en las semillas sin previo tratamiento de pregerminación, acelerando el proceso germinativo y el posterior desarrollo de las plántulas. Las ventajas que presenta este tipo de cultivo son recuperar híbridos incompatibles, disminuir el riesgo de contaminación por patógenos, y servir como fuente de explantes totipotentes, obtención de híbridos interespecíficos (Catillo, et al., 2010, pp. 1-2).

1.2.6.2 Crecimiento desorganizado

Se forma cuando hay fragmentación o corte de órganos y tejidos diferenciados, lo cual dará como resultado el desarrollo de una estructura desorganizada y no definida, llamado callo, que surge sobre heridas causadas por la fragmentación del tejido (Pavón, 2002, p. 7). El tejido desorganizado o callo, puede ser mantenido en medio de cultivo líquido o sólido durante varios meses o años, se puede utilizar en suspensión de células y protoplastos (Esquivel & Escalant, 1994, p. 1).

1.2.6.2.1 Cultivo de estructuras no organizadas.

- Callos: Conjunto de células procedentes de la desorganización de un tejido o de una suspensión de células, éste presenta células no diferenciadas que conserva el poder de dividirse (Esquivel & Escalant, 1994, p. 1). En general, los callos derivados de embriones y plántulas tienen un mayor potencial para la morfogénesis. Sin embargo también es importante el estado fisiológico y la edad de la planta donadora de callo, siendo recomendable utilizar plantas jóvenes y con crecimiento activo (Pavón, 2002, p. 7).
- Suspensiones celulares: Contienen células libres y microagregados de células en medio líquido en movimiento, los mismos que pueden ser permanentes mediante el suministro continuo de nutrientes. Esta técnica permite regenerar plantas

mediante organogénesis indirecta y embriogénesis indirecta y directa (Ayala A. , 2011, p. 34).

- Protoplastos: Cultivo de células libres de pectocelulósica, rodeado únicamente de la membrana citoplasmática, que se aíslan por métodos mecánicos (choque osmótico) o enzimáticos (mezcla de enzimas degradadoras) y pueden ser aislados de varias partes de la planta (frutos, hojas, ápices de raíces, callos, suspensiones celulares, entre otras), el tejido de mayor uso sin embargo es el procedente de material foliar, este tipo de cultivo es adecuado para la manipulación genética o hibridación somática (Arcos, 2010, p. 24).

La respuesta de los explantes a cultivar *in vitro* depende del estado de desarrollo y edad ontogénica, es decir que las células sean capaces de dividirse (Hortmann & Kester, 1968, p. 644)

1.2.7 Técnicas de micropropagación

1.2.7.1 Inducción de organogénesis

Inducción de brotes adventicios o meristemas radicales mediante organogénesis, es decir, la inducción a partir de los explantes directamente o a partir del callo por la desdiferenciación de células del explante (Segui, 2010, p. 297) la diferenciación de brotes se da cuando el medio tiene alta relación citoquininas: auxinas, y de raíces cuando esta relación es baja (Pavón, 2002, p. 9).

1.2.7.2 Embriogénesis somática

Desarrollo de un embrión completo a partir de células somáticas provenientes de tejido vegetal, el cual está perfectamente capacitado para germinar y dar lugar a una nueva planta, genéticamente idéntica al donante. Se realiza mediante la inducción directa o indirecta, a partir de callo embriogénico originado del explante (Segui, 2010, p. 297).

1.2.7.3 Microinjertos

Una porción de tejidos de una planta (injerto), se une sobre otra ya asentada (patrón), de modo que el conjunto de ambos crezca como un solo organismo. A nivel de cultivo *in vitro* esta técnica se realiza en condiciones asépticas, colocando una púa miniatura sobre un pie establecido *in vitro*. El resultado de éste, es que luego puede ser propagado y climatizado (Alvarado, 2012).

1.2.7.4 Cultivo de embriones

El cultivo de embriones, es una técnica utilizada cuando ciertos embriones no germinan, porque dependen de fuentes externas de nutrimentos o cuando hay síntesis de inhibidores de las semillas, lo que hace que germine después de un periodo de latencia. Este cultivo se realiza mediante una escisión o un corte longitudinal del embrión (escarificación), el cual se debe pasar a un medio de cultivo aséptico; mediante esta técnica se puede realizar rescate de embriones vegetales (Roca & Mroginski, 1993, p. 134).

1.2.8 Importancia, ventajas y aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos tiene numerosas ventajas y aplicaciones y éstas son:

- Permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en espacios reducidos, en menor tiempo comparadas con las técnicas tradicionales de cultivo.
- Obtención de plantas libres de patógenos.
- Se producen plantas 100% homocigotas.
- Facilitan la preservación de especies en peligro de extinción y recursos filogenéticos.
- Favorece a la producción de individuos fértiles modificados genéticamente.

- Se usa para la creación de modelos experimentales de plantas, para estudios básicos en el campo de biología y fisiología vegetal.
- Permite el estudio de varios aspectos de biología celular, citogenética, fisiología, metabolismo primario y secundario, morfogénesis y patología vegetal.
- La ingeniería metabólica usa el cultivo *in vitro*, para la obtención de productos naturales y metabolitos secundarios.
- Permite obtener una planta completa mediante el cultivo de diferentes explantes (tallo, hoja, semilla, embrión, cotiledón, raíz, entre otros).
- Ayuda en la conservación e intercambio de germoplasma en base a tres enfoques:
 - Almacenamiento a baja temperatura sin congelación(1-9 °C), en nevera, lo cual ralentiza su crecimiento y no compromete su viabilidad
 - La criopreservación para mantener a largo plazo suspensiones celulares, ápices caulinares, embriones sexuales e incluso plántulas jóvenes.
 - Mantenimiento de explantes en cultivos *in vitro* a los que se les añade compuestos que retrasan el crecimiento.
- Propagación clonal, la cual permite una obtención rápida, económica y en poco espacio de una gran cantidad de individuos. Además, estas plantas al ser clónicas garantizan uniformidad en tamaño, forma, estructura, calidad, entre otras.
- Fitorremediación que se define como un conjunto de tecnologías que usan plantas para inmovilizar, destruir o extraer contaminantes en suelos, sedimentos y aguas subterráneas (Segui, 2010, pp. 291-300).

- **Mejoramiento genético,** Las diferentes técnicas biotecnológicas como cultivo de células en suspensión, fusión de protoplastos, cultivo de anteras, entre otras; son herramientas de gran utilidad para el mejoramiento genético de plantas alimenticias y no alimenticias, principalmente de aquellas en las que es difícil su propagación por semilla. Los avances de la biotecnología en algunos cultivos han sido muy rápidos, ya que en poco tiempo se puede causar mutación, fusionar o transformar cualquier célula y, de entre miles de células tratadas, hacer selección de aquellas que tengan posibilidades de regenerar plantas nuevas con las características deseadas (Castanon, 2002, pág. 4).
- **Variabilidad genética,** El cultivo *in vitro* es una herramienta muy útil en la generación de variabilidad genética mediante procesos como el de la variación somaclonal inducida, entre otros, cuando los cultivos se someten a algún tipo de estrés tanto abiótico como biótico. La variación es impredecible y puede ser heredable (genética) o no heredable (epigenética) y el desarrollo de la variación está asociado a mutaciones puntuales, reordenamiento y recombinación cromosómica, metilación del DNA, alteración en el número de secuencias, etc. y parece estar influenciada por el genotipo, el tipo de explante, el medio de cultivo, la edad de la planta de donde se iniciaron los cultivos, entre otros. Condición indispensable para beneficiarse de la variación somaclonal es la necesidad de disponer de un sistema *in vitro* que sea eficaz y capaz de regenerar una planta completa a partir, normalmente, de cultivos de tejidos no diferenciados (Couselo, Corredoira, Vieitez, & Ballester, 2010, págs. 77-87).

1.2.9 Problemas *in vitro*

Los problemas que más afectan al cultivo *in vitro* son la contaminación de los explantes y oxidación fenólica

Contaminación: 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 use, se pueden transmitir

microorganismos de la superficie del explante o de su interior. Por lo tanto, es conveniente analizar las plantas de las que proceden los explantes en búsqueda de individuos limpios y rechazando aquellos que están contaminados fuertemente. La búsqueda de contaminaciones debe incluir análisis de los organismos que pueden crecer en el medio de cultivo y por otra parte los patógenos que infectan de forma específica al cultivo. Los principales microorganismos asociados a las superficies de las plantas son hongos, levaduras y bacterias. Muchos de estos microorganismos se pueden eliminar mediante esterilizaciones superficiales. Los microorganismos pueden proceder también de un fallo en la campana de flujo laminar y de una esterilización insuficiente del medio de cultivo o del equipo (Alonso, 2002, pág. 32).

Oxidación fenólica: La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, es la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas, generando incluso muerte celular (Azofeifa, 2009, pág. 153).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación

La investigación se desarrolló en el laboratorio del Jardín Botánico de Quito, ubicado en Pasaje N34, Rumipamba E6-264 y Avenida de los Shyris. Distrito Metropolitano de Quito. N 0° 48' 50''; E 78° 30' 51'' a 2820 msnm.

- Las condiciones experimentales específicas del cuarto de incubación fueron: Temperatura 18-24°C y Humedad relativa 60%.

La recolección de semillas se realizó en el Jardín Botánico de Quito y en el Parque metropolitano Metro Sur, éste último ubicado en el sector de El Troje, entre la Av. Simón Bolívar y el Valle de los Chillos.

2.2 Material vegetal

- Se utilizaron semillas de geranio de los chillos (*Geranium chilloense* Willd. ex Kunth) y semillas de chocho (*Lupinus pubescens* Benth.)

2.3 Materiales

Fase 0: Escarificación

Agua destilada estéril, vinagre, frascos de 100 ml, parafilm, ligas.

Fase 1: Protocolo de desinfección e introducción al medio de cultivo

Hipoclorito de sodio (6% p.a.), alcohol (70% y 96%), agua destilada estéril, Tween 20, medio de cultivo MS marca Sigma, agua de coco, glucosa, agar, hidróxido de sodio (NaOH; [0,1 N]), frascos de 250 ml, parafilm, mascarilla, ligas y papel toalla.

Fase II: Fase de multiplicación (*in vitro*)

Se utilizaron medio MS marca Sigma, agua de coco, glucosa, agar, (NaOH; [0,1 N]), ácido indolacético (AIA), benzil amino purina (BAP), alcohol (70% y 96%), parafilm, frascos de 250 ml, mascarilla, ligas, papel toalla, papel milimetrado estéril.

Fase III: Enraizamiento (*in vitro*)

Se utilizaron, medio MS marca Sigma, agua de coco, glucosa, agar, (NaOH; [0,1 N]), ácido naftalenacético (ANA), carbón activado, alcohol (70% y 96%), parafilm, frascos de 250 ml, mascarilla, ligas, papel toalla, papel milimetrado estéril.

Fase IV: Adaptación al sustrato (*ex vitro*)

Cubetas de 48 alveolos con una longitud de 60 cm, turba estéril, fibra de coco estéril, agua destilada, fundas plásticas resistentes a altas temperaturas.

2.4 Equipos, instrumental y cristalería

Los equipos utilizados fueron: Auto-clave, pH-metro, balanza analítica, agitador magnético, estufa, refrigeradora, cámara de fotos, computadora, cámara de flujo laminar horizontal.

Los instrumentos de laboratorio que se utilizaron fueron: pinzas anatómicas, mecheros de alcohol, probetas, goteros, matraces erlenmeyer, vasos de precipitación, bisturíes y mango.

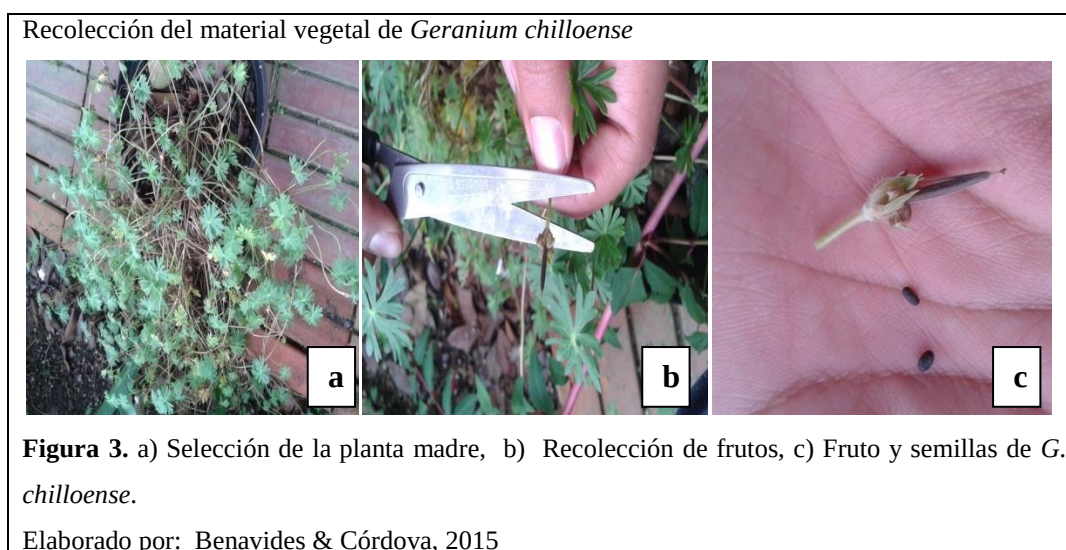
2.5 Metodología

2.5.1 *Geranium chilloense*

El presente estudio se realizó en cuatro etapas, cada fase tuvo una repetición en el tiempo.

2.5.1.1 FASE 0: Escarificación de las semillas de *Geranium chilloense*.

Se recolectó el material vegetal (216 semillas), en el Jardín Botánico de Quito y del parque metropolitano Metro Sur (Figura 3). Para esta fase se evaluó la escarificación, con variación en el número de días de hidratación y el tiempo de exposición en la dilución de ácido acético para la segunda repetición en el tiempo descrito en la tabla 1.



2.5.1.1.1 Factores en estudio

- a) Días de hidratación 3 y 5 días de inmersión.
- b) Tiempo de inmersión en una dilución de ácido acético al 10%.

Tabla 3. Tratamientos de escarificación utilizados en las semillas de *Geranium chilloense*.

Trat	Hidratación	T.I	Modificado de
T1	3 días	2 horas	(Kyanko, Russo, Fernández, & Pose, 2010, p. 126). (Aguayo, et al., 2012, p. 61) (Jiménez, Tiburzi, Salsi, Moguilevsky, & Pirovani, 2008, pp. 90-91)
T2	5 días	4 horas	(Ortiz, 2003, p. 16) (Manotoa, 2012, p. 11)

T.I= Tiempo de inmersión

Nota: Benavides & Córdova, 2015

2.5.1.1.2 *Unidad experimental*

Se utilizó un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad, con 35 ml de medio de cultivo MS, suplementado con 1 semillas de *Geranium chilloense* por frasco.

2.5.1.1.3 *Diseño*

Diseño completamente al azar (DCA) con 23 repeticiones por tratamiento.

2.5.1.1.4 *Análisis Funcional*

Prueba de significancia de Duncan al 5%, para los factores en estudio que presentaron diferencias significativas, empleando el software InfoStat.

2.5.1.1.5 *Escarificación 1*

Se colocaron 117 semillas de geranio de los Chillos en tres frascos de vidrio estériles (39 semillas por frasco), con 50 ml de agua destilada estéril, se cerró con parafilm, y se dejó reposar durante tres días a temperatura ambiente con un cambio de agua en el día número 2. A continuación se sumergieron las semillas en una dilución de 90 % de agua destilada estéril y 10 % de ácido acético, durante dos horas previo a la desinfección e introducción al medio de cultivo (Figura 4).

2.5.1.1.6 *Escarificación 2*

Se colocaron 99 semillas de geranio de los Chillos en tres frascos de vidrio estériles (33 por cada frasco), con 50 ml de agua destilada estéril, se cerró con parafilm y se dejó reposar durante cinco días, con un cambio de agua destilada estéril en el día 2 y 4, se mantuvo a temperatura ambiente, a continuación fueron sumergidas en una dilución de 90 % de agua destilada estéril y 10 % de ácido acético, durante cuatro horas previo a la desinfección e introducción al medio de cultivo.

2.5.1.1.7 *Variables evaluadas durante la fase de escarificación en Geranium chilloense:*

- Porcentaje de contaminación: Se realizó la observación de la presencia de colonias bacterianas o fúngicas en el medio de cultivo y/o explante. Se evaluó con cero “0” ausencia y uno “1” presencia de microorganismos.

$$\% \text{ Contaminación} = \frac{\sum \text{Explantes contaminados}}{\text{total de explantes}} * 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de contaminación

- Porcentaje de fenolización del explante: Mediante la observación, se evaluó la fenolización del explante, con valores de cero "0" ausencia y uno "1" presencia de oxidación.

$$\% \text{ Fenolización del explante} = \frac{\sum \text{Explantes fenolizados}}{\text{total de explantes}} * 100$$

Ecuación 2. Porcentaje de fenolización del explante

- Porcentaje de fenolización del medio de cultivo: Mediante la observación, se evaluó la fenolización del medio de cultivo, con valores de cero "0" ausencia y uno "1" presencia de oxidación.

$$\% \text{ Fenolización del medio} = \frac{\sum \text{Medio fenolizado}}{\text{total de frascos intrroducidos}} * 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de fenolización del medio de cultivo.

- Porcentaje de germinación: Se determinó como el número de semillas germinadas sobre el total de semillas introducidas, dando valores de cero "0" para semillas no germinados y uno "1" para semillas con surgimiento del hipocótilo (Ecuación 3).

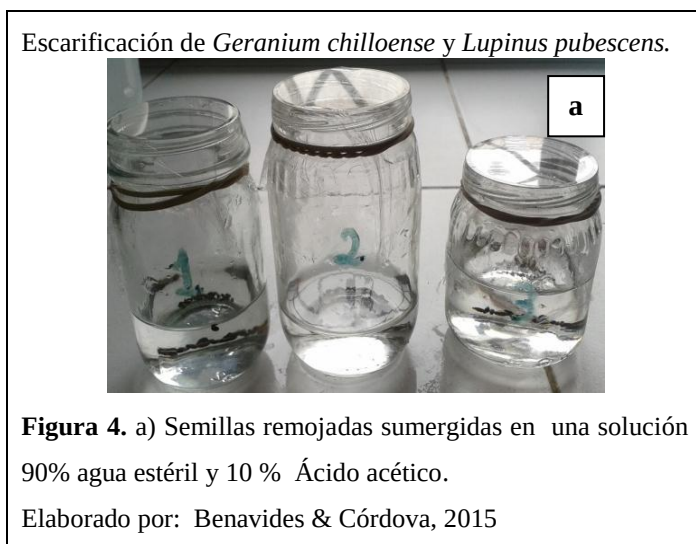
$$\% \text{ Germinación} = \frac{\sum \text{Explantes germinados}}{\text{total de explantes}} * 100$$

Ecuación 4. Porcentaje de germinación

- Porcentaje de sobrevivencia: Se tomó en cuenta el número de explantes vivos hasta el final de la fase I, sobre el total de semillas, se dio valores cero "0" muerto y uno "1" vivo (Ecuación 4).

$$\% \text{ Sobrevivencia} = \frac{\sum \text{Explantes vivos}}{\text{total de explantes}} * 100$$

Ecuación 5. Porcentaje de sobrevivencia



2.5.1.2 FASE I. Protocolo de desinfección e introducción al medio de cultivo

2.5.1.2.1 Tratamientos de desinfección de las semillas de *Geranium chilloense*.

Se distribuyeron equitativamente las semillas de *Geranium chilloense* previamente escarificadas, en frascos estériles de 250 ml para el proceso de desinfección, evaluando diferentes concentraciones y tiempos de inmersión de: hipoclorito de sodio, alcohol y Tween 20 (Tabla 2).

2.5.1.2.2 Factores en estudio

- a) Concentración
- b) Tiempo de inmersión.

Tabla 4. Protocolos de desinfección usados en las semillas de *Geranium chilloense*

Trat	Solución 1		Solución 2			Referencia
	Alcohol		NaOCl		Tween 20	
	%	TI	%	TI		
P1	96	10 seg	50 v/v	10 min	-	(Santa Cruz M. , 2001, pág. 11)
P2	-	-	50 v/v	15 min	1 gota	(Severín, C. et al., 2002, págs. 70-71)
P3	70	1 min	20 v/v	20 min	1 gota	(Alonso, 2004)

TI=Tiempo de inmersión

Nota: Benavides & Córdova, 2015

2.5.1.2.3 Descripción de los protocolos de desinfección

- ✓ P1: Inmersión de las semillas en alcohol etílico al 96% durante 10 segundos, posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 50% v/v (3% p.a) durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril.
- ✓ P2: Se sumergieron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % v/v más una gota de Tween 20 durante 15 minutos, seguido de 3 enjuagues con agua destilada esterilizada.
- ✓ P3: Las semillas fueron sumergidas por 1 minuto en etanol al 70% y posteriormente se agitó durante 20 minutos en una solución al 20% v/v (1,2% p.a) de hipoclorito de sodio con una gota de Tween 20. Se realizaron cuatro lavados en agua destilada estéril.

2.5.1.2.4 Variables evaluadas en los protocolos de desinfección

- Porcentaje de contaminación: Se realizó la observación de presencia de colonias bacterianas o fúngicas en el medio de cultivo y/o explante. Se evaluó con cero "0" ausencia y uno "1" presencia de microorganismos (Ecuación 1).
- Porcentaje de fenolización del explante: Mediante la observación, se evaluó la fenolización del explante, con valores de cero "0" ausencia y uno "1" presencia de oxidación (Ecuación 2).
- Porcentaje de fenolización del medio: Mediante la observación, se evaluó la fenolización del medio, con valores de cero "0" ausencia y uno "1" presencia de oxidación (Ecuación 3).
- Porcentaje de germinación: Se determinó como el número de semillas germinadas sobre el total de semillas introducidas, dando valores de cero "0"

para semillas no germinadas y uno “1” para semillas con surgimiento del hipocótilo (Ecuación 4).

- Porcentaje de sobrevivencia: Se contabilizaron los explantes vivos hasta el final de la fase I sobre el total de semillas, con respecto a los protocolos de desinfección probados en la Fase I, se dio valores cero “0” muerto y uno “1” vivo (Ecuación 5).

2.5.1.2.5 Introducción al medio de cultivo de *Geranium chilloense*.

En cámara de flujo laminar, las semillas desinfectadas fueron escarificadas mediante un corte de un extremo aproximadamente de un milímetro de manera transversal (Figura 5). Éstas fueron introducidas en el medio de cultivo MS (Anexo 3), suplementado con sacarosa 30g, agua de coco 150 ml, 4,8g de agar y pH ajustado de 5,75 a 5,8 con hidróxido de sodio (NaOH; [0,1 N]). Posteriormente los explantes fueron incubados en el cuarto de incubación a una temperatura de 15-24°C y una humedad relativa del 60%, durante 30 días.

Tabla 5. Composición de los medios de cultivo utilizados en la fase de introducción de *Geranium chilloense*

Trat.	Porcentaje de sales MS	Peso (g) de sales MS	Referencias bibliográficas
T1	100%	4,33	(Alonso, 2004)
T2	50%	2,16	(Ayala A. , 2011, págs. 50-51)
T3	25%	1,82	(Proaño, 2011, pág. 42)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

2.5.1.2.6 Unidad experimental

Se utilizó un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad, con 35 ml de medio de cultivo MS suplementado, con 1 semillas de *Geranium chilloense* por frasco.

2.5.1.2.7 Diseño

Diseño completamente al azar (DCA) con 23 repeticiones por tratamiento.

2.5.1.2.8 Análisis Funcional

Prueba de significancia de Duncan al 5%, para los factores en estudio que presentaron diferencias significativas, empleando el software InfoStat.

Introducción al medio de cultivo de las semillas de *Geranium chilloense* y *Lupinus pubescens*

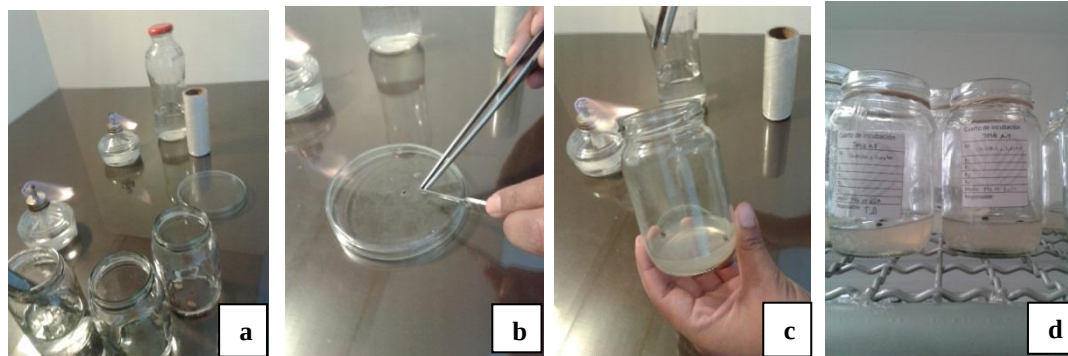


Figura 5. a) Lavado y preparación de semillas, b) Corte transversal de semillas, c) Siembra de semillas en medio MS, d) Frascos cultivados en el cuarto de incubación

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015

2.5.1.2.9 Variables valoradas para la introducción al medio de cultivo

- Porcentaje de germinación: Se determinó como el número de semillas germinadas sobre el total de introducidas, en cada medio de cultivo, dando valores de cero “0” para semillas no germinados y uno “1” semillas germinadas (Ecuación 4).
- Porcentaje de sobrevivencia: Evaluada como durabilidad de los explantes sobre el total de semillas introducidas con respecto a la concentración de sales MS usadas en la Fase I, se dio valores cero “0” muerto y uno “1” vivo (Ecuación 5).
- Porcentaje de presencia de raíces: Determinada mediante la observación de cada explante, otorgando valores de cero “0” ausencia y uno “1” presencia de raíz.

$$\%Presencia\ de\ raices\ \frac{\sum Explantes\ con\ raices}{total\ de\ explantes} * 100$$

Ecuación 6. Presencia de raíces

- Promedio de longitud: Se evaluó a través de la medición en centímetros (cm), desde la base del explante hasta el ápice del mismo.

$$Promedio\ longitud\ \frac{\sum longitud\ de\ explantes}{total\ de\ explantes}$$

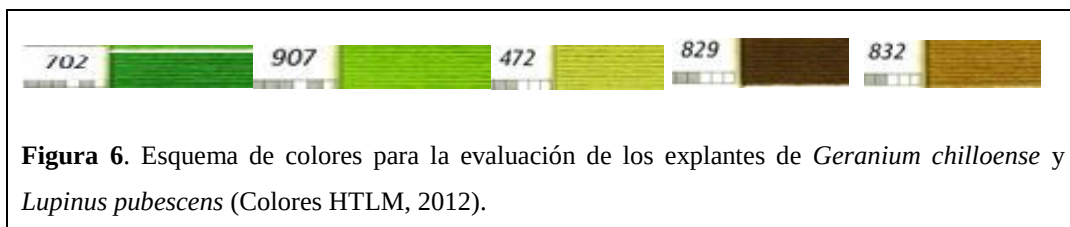
Ecuación 7. Promedio de longitud

- Promedio número hojas: Valoradas mediante la observación y conteo por explante en cada frasco.

$$Promedio\ No.\ hojas\ \frac{\sum No.\ hojas}{total\ de\ explantes}$$

Ecuación 8. Promedio número hojas

- Color del explante: Evaluada mediante una escala colorimétrica (Figura 6), a cada color se le otorgó un código de acuerdo a la tabla de colores, siendo 5 = verde oscuro (cód. 702), 4 = verde claro (cód. 907), 3 = amarillo (cód. 472), 2 = café oscuro (cód. 829), 1 = café claro (cód. 832), 0 = blanco o crema.



$$Color\ del\ explante\ \frac{\sum No.\ de\ color\ por\ explante}{total\ de\ explantes}$$

Ecuación 9. Color del explante

- Porcentaje de contaminación: Se realizó la observación de presencia de colonias bacterianas o fúngicas en el medio de cultivo o/y explante, con respecto a la concentración de sales MS. Se evaluó con cero “0” ausencia y uno “1” presencia de microorganismos (Ecuación 1).
- Porcentaje de fenolización del explante: Mediante la observación, se evaluó la fenolización del explante, con valores de cero "0" ausencia y uno "1" presencia de oxidación (Ecuación 2).
- Porcentaje de fenolización del medio: Mediante la observación, se evaluó la fenolización del medio, con valores de cero "0" ausencia y uno "1" presencia de oxidación (Ecuación 3).

Las presentes variables tanto para el protocolo de desinfección como en la introducción al medio de cultivo durante la primera fase, fueron evaluadas durante 60 días, haciendo observaciones cada 7 días.

2.5.1.3 FASE II. Concentración óptima de reguladores de crecimiento para la fase de multiplicación en *Geranium chilloense*.

Los explantes provenientes de la fase I, se pasaron al medio de multiplicación, sales de MS al 25 % (1/4 MS), el cual fue suplementado con 30 g de sacarosa, 150 ml de agua de coco, 4,8 gramos de agar y pH de 5,75 a 5,80. En esta fase se evaluaron 3 concentraciones de bencil amino purina (BAP) y 3 dosis de ácido indolacético (AIA), descritas en la tabla 4. Para la siembra en el medio de multiplicación, se eliminó el material oxidado y necrosado de cada explante (Figura 7).

2.5.1.3.1 Factores en estudio

- a) Concentración de BAP (0; 0,5 y 1 ppm)
- b) Concentración de AIA (0; 0,5 y 1 ppm)

Tabla 6. Interacción de bencil amino purina (BAP) y de ácido indolacético (AIA), utilizados en la fase multiplicación en Medio MS en *G. chilloense*.

Trat.	[BAP] (ppm)	[AIA] (ppm)	Referencias bibliográficas
T1	0	0	(Ruiz G. , 2013, p. 39)
T2	0	0,5	(Lozada, 2010, p. 50)
T3	0	1	(Lozada, 2010, p. 50)
T4	1	0	(Ruiz G. , 2013, p. 39)
T5	1	0,5	(Lozada, 2010, p. 50)
T6	1	1	(Lozada, 2010, p. 50)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

2.5.1.3.2 Unidad experimental

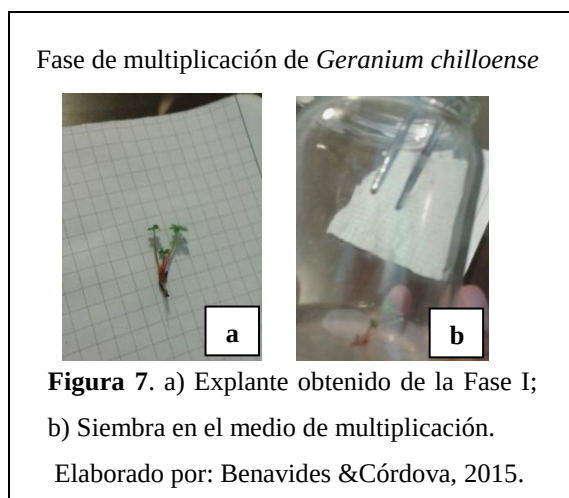
Un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad, con 35 ml de medio de cultivo MS suplementado, con 1 explante de *Geranium chilloense*.

2.5.1.3.3 Diseño

Diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial 3x2, con 9 repeticiones.

2.5.1.3.4 Análisis Funcional

Prueba de significancia de Duncan al 5%, para los factores en estudio que presentaron diferencias significativas, empleando el software InfoStat.



2.5.1.3.5 Variables evaluadas en la fase de multiplicación

- Promedio número de brotes: Evaluada por explante mediante un conteo de brotes.

$$\text{Promedio No. brotes} = \frac{\sum \text{No. brotes}}{\text{total de explantes}}$$

Ecuación 10. Promedio número de brotes

- Promedio número de hojas: “Valorados a través de un conteo del total de hojas por explante sin distinción del tamaño (Ecuación 8).
- Promedio de longitud: Se realizó a través de una medición en centímetros (cm) desde la base del explante hasta el ápice del mismo (Ecuación 7).
- Porcentaje presencia de raíces: Variable descrita mediante la observación dando valores de "0" ausencia y "1" presencia de raíces (Ecuación 6).
- Porcentaje formación de callo: Definida a través de la observación con valores de "0" ausencia y "1" presencia de callos.

$$\% \text{ Formación de callo} = \frac{\sum \text{No. explantes con callo}}{\text{total de explantes}}$$

Ecuación 11. Porcentaje de formación de callo

- Color del explante: Evaluadas mediante una escala colorimétrica (Figura 6), con valores de 5 = verde oscuro, 4 = verde claro, 3 = amarillo, 2 = café oscuro, 1 = café claro, 0 = blanco (Ecuación 9).
- Porcentaje de sobrevivencia: Se evaluó el número de los explantes vivos, sobre el total de introducidos hasta la culminación de la Fase II, con valores de cero “0” muerto y uno “1” vivo (Ecuación 5).

- Porcentaje de marchitez: Observación de la pérdida de turgencia y color, dando valores de cero “0” ausencia y uno “1” presencia de marchitez.

$$\% \text{ Marchitez} = \frac{\sum \text{No. explantes marchitos}}{\text{total de explantes}} * 100$$

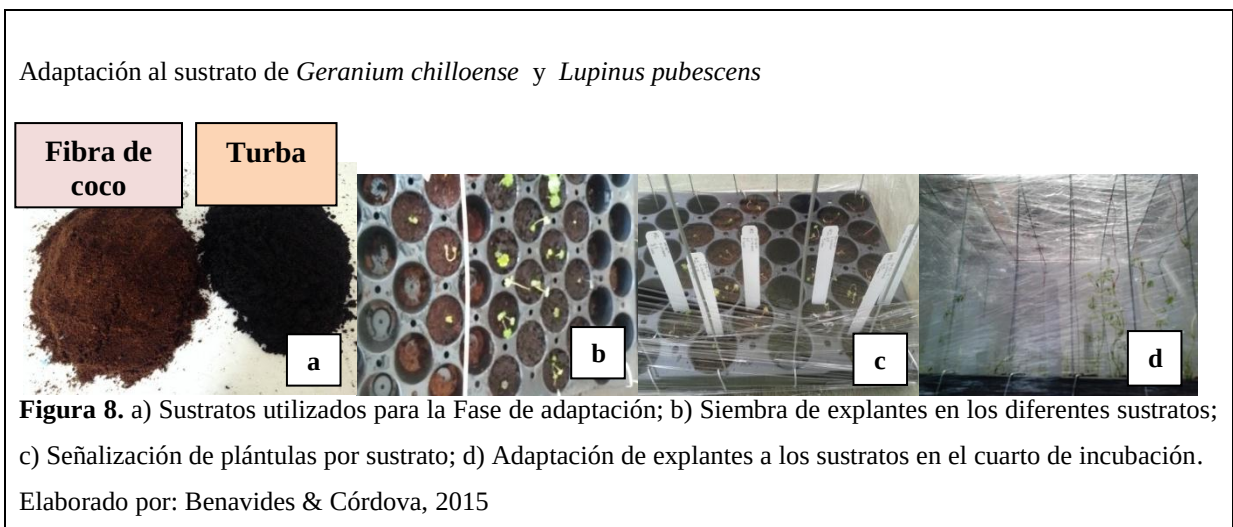
Ecuación 12. Porcentaje de marchitez

Cada variable, fue evaluada cada 7 días durante la fase de multiplicación (30 días).

2.5.1.4 Fase III: Adaptación al sustrato de *Geranium chilloense*

En esta última parte de la investigación se evaluaron dos tipos de sustratos, fibra de coco y turba (tabla 5). Los sustratos fueron remojados en agua destilada para su hidratación (fibra de coco 3 días, y turba 3 horas), posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 25 minutos, cada sustrato fue colocado en una bandeja de germinación, misma que posterior a la siembra fue cubierta con parafilm, obteniendo un ambiente similar a *in vitro* (Figura 8).

La cubierta se mantuvo durante 20 días, con un cambio de plástico por semana, durante la segunda semana el plástico fue perforado con agujeros separados de aproximadamente 0,5 cm para la adaptación paulatina de las plántulas, desde el día 16 hasta 22 se incrementó el diámetro de los agujeros hasta 1,5 cm con poca distancia entre ellos, y desde el día 23 hasta el 30 se retiró completamente el plástico (Figura 8).



2.5.1.4.1 Factores en estudio

a) Sustratos (Fibra de coco y Turba estéril)

Tabla 7. Sustratos utilizados para la fase de adaptación en *Geranium chilloense*.

Trat	Sustrato	Referencias bibliográficas
T1	Fibra de coco	(Proaño, 2011, p. 41)
T2	Turba estéril	(Andrade, 2014)

Nota: Benavides & Córdova, 2015.

2.5.1.4.2 Unidad experimental

Se utilizó una bandeja de germinación de 48 alveolos, con una plántula por alveolo, 24 plantas por tratamiento.

2.5.1.4.3 Diseño

Diseño completamente al azar (DCA), con 21 repeticiones por tratamiento.

2.5.1.4.4 Análisis Funcional

Prueba de significancia de Duncan al 5%, para los factores en estudio que presentaron diferencias significativas, empleando el software InfoStat.

2.5.1.4.5 Variables valoradas durante las Fase III en *Geranium chilloense*.

- Porcentaje de marchitez: Valorada mediante la observación de la pérdida de turgencia y color en los órganos de la plántula (tallo y hojas), se otorgó valores de “0” ausencia y uno “1” presencia de marchitez (Ecuación 12).
- Porcentaje de pudrición: Se evaluó mediante la observación del reblandecimiento y necrosamiento de la plántula, dando valores de “0” ausencia y uno “1” presencia.

$$\% \text{ Pudrición } \frac{\sum \text{No. plántulas con pudrimiento}}{\text{total de plantulas}} * 100$$

Ecuación 13. Porcentaje de pudrición

- Porcentaje de prendimiento: Se midió a través del arraigamiento o la dificultad de desprendimiento del explante del sustrato, dando valores de “0” no prendido; “1” prendido.

$$\% \text{ Prendimiento } \frac{\sum \text{No. plántulas prendidas}}{\text{total de plantulas}} * 100$$

Ecuación 14. Porcentaje de prendimiento

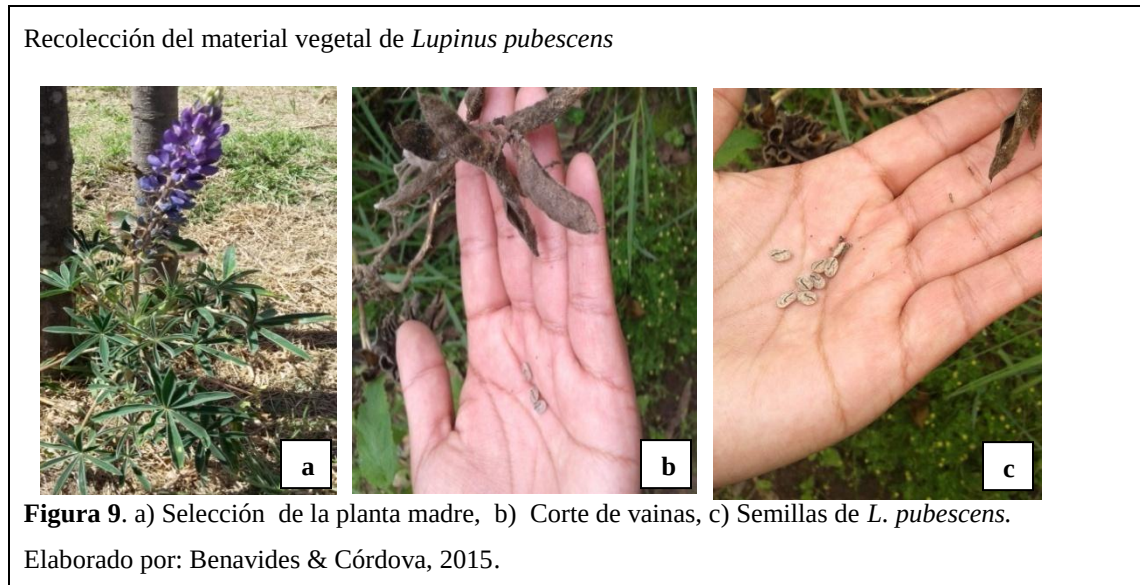
- Promedio número de hojas: Variable evaluada mediante un conteo numérico sobre el total de hojas por explante (Ecuación 8).
- Promedio número de brotes totales: Se evaluó por cada explante a través de un conteo numérico de cada brote axilar (Ecuación 10).
- Promedio longitud: Valorada mediante la medición en cm desde la base hasta el ápice de cada explante (Ecuación 7).
- Color del explante: Se evaluó a través de la observación del color (Figura 6), cada explante y se comparó con una escala colorimétrica dando valores de 5 = verde oscuro, 4 = verde claro, 3 = amarillo, 2 = café oscuro, 1 = café claro, 0 = blanco (Ecuación 9).
- Porcentaje de sobrevivencia: Se evaluó mediante la observación y conteo de los explantes vivos, sobre el total de introducidos hasta el final de la Fase III, con valores de cero “0” muerto y uno “1” vivo (Ecuación 5).

2.5.2 *Lupinus pubescens*.

El presente estudio se realizó en cuatro fases.

2.5.2.1 *Escarificación de las semillas de Lupinus pubescens.*

Se colocaron 252 semillas de *Lupinus pubescens* provenientes del Jardín Botánico de Quito y del parque metropolitano Metro Sur (Figura 9), en tres frascos de vidrio estériles (84 semillas por frasco), con 50 ml de agua destilada estéril, se cerró con parafilm, y se dejó reposar durante tres días a temperatura ambiente con un cambio de agua al segundo día. A continuación se sumergieron las semillas en una dilución de 90 % de agua destilada estéril y 10 % de ácido acético, durante dos horas previo a la desinfección e introducción al medio de cultivo (Figura 4).



2.5.2.2 **FASE I. Protocolo de desinfección e introducción al medio de cultivo**

2.5.2.2.1 *Protocolos de desinfección de las semillas de Lupinus pubescens.*

Se distribuyeron equitativamente las semillas de *Lupinus pubescens* provenientes de la fase de escarificación, en frascos estériles de 250 ml para el proceso de desinfección,

evaluando diferentes concentraciones y tiempos de inmersión, de hipoclorito de sodio, alcohol y Tween 20 (Tabla 6).

2.5.2.2.2 Factores en estudio

- a) Concentración
- b) Tiempo de inmersión.

Tabla 8. Tratamientos de desinfección usados en las semillas de *Lupinus pubescens*

Trat	Solución 1		Solución 2			Referencia
	Alcohol		NaOCl		Tween 20	
	%	T.I	%	T.I		
P1	96	10 seg	50 v/v	10 min	-	(Santa Cruz M. , 2001, pág. 11)
P2	-	-	50 v/v	15 min	1 gota	(Severín, C. et al., 2002, págs. 70-71)
P3	70	1 min	20 v/v	20 min	1 gota	(Alonso, 2004, pág. 21)

T.I=Tiempo de inmersión; L.A.E=Lavados en agua estéril

Nota: Benavides & Córdova, 2015

2.5.2.2.3 Descripción de los tratamientos de desinfección

- ✓ P1: Inmersión de las semillas en alcohol etílico al 96% durante 10 segundos, posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 50% v/v (3% p.a.) durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril.
- ✓ P2: Se sumergieron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % v/v más una gota de Tween 20 durante 15 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada esterilizada.
- ✓ P3: 1 minuto en etanol al 70% y posteriormente se agitó durante 20 minutos en una solución al 20% v/v (1,2% p.a) de hipoclorito de sodio con una gota de Tween 20. Se realizaron cuatro lavados en agua destilada estéril.

2.5.2.2.4 Variables evaluadas en los protocolos de desinfección

- Porcentaje de contaminación: Se realizó la observación de presencia de colonias bacterianas o fúngicas en el medio de cultivo o/y explante. Se evaluó con cero “0” ausencia y uno “1” presencia de microorganismos (Ecuación 1).
- Porcentaje de sobrevivencia: Se tomaron en cuenta los explantes vivos hasta el final de la fase I, sobre el total de semillas con respecto a los protocolos de desinfección evaluados en la Fase I, se dieron valores cero “0” muerto y uno “1” vivo (Ecuación 5).

2.5.2.2.5 Introducción al medio de cultivo de *Lupinus pubescens*.

En cámara de flujo laminar, las semillas previamente desinfectadas, fueron cortadas transversalmente de manera que se elimine el hilo de la semilla (Figura 5). Posteriormente las semillas fueron introducidas en el medio de cultivo MS (Anexo 3), el cual fue suplementado con sacarosa 30g, agua de coco 150 ml, 5,8 g de agar y pH ajustado a 5,75 - 5,8 con hidróxido de sodio (NaOH;[0,1N]), detallado en la tabla 7. Posteriormente los explantes fueron incubados en el cuarto de incubación a una temperatura de 15-24°C y una humedad relativa del 60%, durante 30 días.

Tabla 9. Composición de sales MS evaluadas en la fase de introducción al medio cultivo de *Lupinus pubescens*.

Trat.	Porcentaje de sales MS	Peso (g) de sales MS	Referencias bibliográficas
T1	100%	4,33	(Alonso, 2004)
T2	50%	2,16	(Ayala A. , 2011, págs. 50-51)
T3	25%	1,08	(Proaño, 2011, pág. 42)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

2.5.2.2.6 Unidad experimental

Se utilizó un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad, con 35 ml de medio de cultivo MS suplementado, con 2 semillas de *Lupinus pubescens*.

2.5.2.2.7 *Diseño*

Diseño completamente al azar (DCA) con 11 repeticiones por tratamiento.

2.5.2.2.8 *Análisis Funcional*

Prueba de significancia de Duncan al 5%, para los factores en estudio que presentaron diferencias significativas, empleando el software InfoStat.

2.5.2.2.9 *Variables valoradas para la introducción al medio de cultivo*

- Porcentaje de germinación: Se determinó como el número de germinados sobre el total de semillas introducidas, en cada medio de cultivo, dando valores de cero “0” para semillas no germinadas y uno “1” semillas germinadas (Ecuación 4).
- Porcentaje de sobrevivencia: Evaluada como durabilidad de los explantes sobre el total de semillas introducidas con respecto a la concentración de sales MS usadas en la Fase I, se dio valores cero “0” muerto y uno “1” vivos (Ecuación 5).
- Porcentaje de presencia de raíces: Determinada mediante la observación de cada explante, otorgando valores de cero “0” ausencia y uno “1” presencia de raíz (Ecuación 6).
- Porcentaje de cotiledones abiertos: Examinada a través de la observación con valores de cero “0” cotiledones cerrados y uno “1” cotiledones abiertos.

$$\% \text{ Cotiledones abiertos} = \frac{\sum \text{No. Explantes con cotiledones abiertos}}{\text{total de explantes}} * 100$$

Ecuación 15. Porcentaje de cotiledones abiertos

- Promedio de longitud: Se evaluó a través de la medición en centímetros (cm), desde la base del explante hasta el ápice del mismo (Ecuación 7).

- Promedio número hojas: Valoradas mediante la observación y conteo por explante en cada frasco (Ecuación 8).
- Color del explante: Evaluada mediante una escala colorimétrica (Figura 6), a cada color se le otorgó un código de acuerdo a la tabla de colores, siendo 5 = verde oscuro (cód. 702), 4 = verde claro (cód. 907), 3 = amarillo (cód. 472), 2 = café oscuro (cód. 829), 1 = café claro (cód. 832), 0 = blanco o crema (Ecuación 9).
- Porcentaje de contaminación: Se realizó la observación de presencia de colonias bacterianas o fúngicas en el medio de cultivo y/o explante, con respecto a la concentración de sales MS. Se evaluó con cero “0” ausencia y uno “1” presencia de microorganismos (Ecuación 1).

Las presentes variables tanto para el protocolo de desinfección como para la introducción al medio de cultivo durante la primera fase, fueron evaluadas durante 15 días, haciendo observaciones cada 7 días.

2.5.2.3 FASE II. Concentración óptima de reguladores de crecimiento para la fase de multiplicación en *Lupinus pubescens*.

Todos los explantes obtenidos de la fase I, se pasaron a un medio de multiplicación al 50% de la solución MS, suplementados con 30 g de sacarosa, 150 ml de agua de coco, 5,8 de agar y pH de 5,75 a 5,80. En esta fase se evaluaron 3 diferentes concentraciones de bencil amino purina (BAP) y tres de ácido indolacético (AIA), que se describen a continuación en la tabla 8. Para el cambio de fase de la especie en mención, se eliminó el material oxidado, necrosado y los cotiledones muy grandes en los explantes con presencia de primordios foliares, además se cortó en secciones de 3 cm de longitud tomando únicamente las secciones que tenían yemas axilares, eliminando raíces y entrenudos, consecuentemente fue introducido en el medio de multiplicación (Figura 10).

Multiplicación de *Lupinus pubescens*

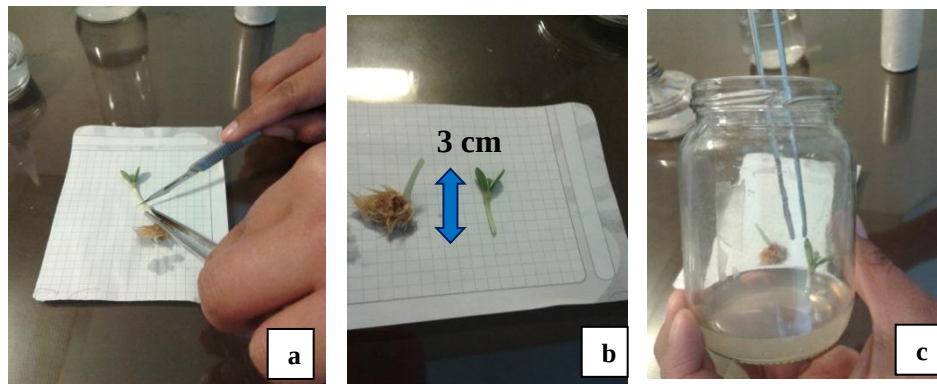


Figura 10. a) Eliminación de material oxidado y raíces en el explante, b) Explante de 3 cm explante, c) Siembra del explante en medio MS para multiplicación.

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015.

2.5.2.3.1 Factores en estudio

- a) Concentración de BAP (0; 0,5 y 1 ppm)
- b) Concentración de AIA (0; 0,5 y 1 ppm)

Tabla 10. Interacción de las concentraciones de bencil amino purina (BAP) y ácido indolacético (AIA), en la fase multiplicación de *Lupinus pubescens*.

Trat.	[BAP] (ppm)	[AIA] (ppm)	Referencias bibliográficas
T1	0	0	(Ruiz G. , 2013, p. 39)
T2	0	0,5	(Paucar, 2011, p. 25)
T3	0	1	(Suarez, 2011, p. 27)
T4	1	0	(Ruiz G. , 2013, p. 39)
T5	1	0,5	(Paucar, 2011, p. 25)
T6	1	1	(Suarez, 2011, p. 27)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

2.5.2.3.2 Unidad experimental

Un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad, con 35 ml de medio de cultivo MS suplementado con 1 explante de *Lupinus pubescens*.

2.5.2.3.3 *Diseño*

Diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial 3x2, con 30 repeticiones.

2.5.2.3.4 *Análisis Funcional*

Prueba de significancia de Duncan al 5%, para los factores en estudio que presentaron diferencias significativas, empleando el software InfoStat.

2.5.2.3.5 *Variables evaluadas en la fase de multiplicación*

- Índice de multiplicación: Apreciada como la sumatoria total de nudos sobre el total de explantes por tratamiento.

$$\text{Índice de multiplicación} = \frac{\sum \text{No. nudos}}{\text{total de explantes}}$$

Ecuación 16. Índice de multiplicación

- Promedio número de hojas: Valorados a través de un conteo del total de hojas por explante sin distinción del tamaño (Ecuación 8).
- Promedio de longitud: Se realizó a través de una medición en centímetros (cm) desde la base del explante hasta el ápice del mismo (Ecuación 7).
- Porcentaje presencia de raíces: Variable descrita mediante la observación dando valores de "0" ausencia y "1" presencia de raíces (Ecuación 6).
- Porcentaje formación de callo: Definida a través de la observación con valores de "0" si hay ausencia y "1" presencia de callo (Ecuación 11).
- Color del explante: Evaluadas mediante una escala colorimétrica (Figura 6), con valores de 5 = verde oscuro, 4 = verde claro, 3 = amarillo, 2 = café oscuro, 1 = café claro, 0 = blanco (Ecuación 9).

- Porcentaje de sobrevivencia: Se evaluó el número de los explantes vivos, sobre el total de introducidos hasta la culminación de la Fase II, se evaluó con valores de cero “0” muerto y uno “1” vivo (Ecuación 5).
- Porcentaje de marchitez: Apariencia vigoroso del explante (color y firmeza), dando valores de cero “0” ausencia y uno “1” presencia de marchitez (Ecuación 12).

Cada variable, fue evaluada cada 7 días durante la fase de multiplicación (30 días).

2.5.2.4 FASE III: Enraizamiento *in vitro*

Para la presente fase se cultivaron los explantes de *L. pubescens*, obtenidos en la fase de multiplicación. Se evaluaron concentraciones de carbón activado y ácido naftalacético se presentan en la Tabla 9.

2.5.2.4.1 Factores en estudio

- Concentración de ANA (0 y 1 ppm)
- Concentración de carbón activado (0 y 1000 ppm)

Tabla 11. Concentraciones de ácido naftalacético y carbón activado, utilizados en la fase de enraizamiento *in vitro* de *L. pubescens*, en medio MS al 50 %.

Trat.	ANA (ppm)	Carbón activado (ppm)	Referencias Bibliográficas
1	0	0	(Soto, Ferreira, Delgado, & Enríquez, 2013, p. 35)
2	1	1000	(Proaño, 2011, p. 42)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

2.5.2.4.2 Unidad experimental

Un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad, con 35 ml de medio de cultivo MS suplementado, con 2 explantes de *Lupinus pubescens*.

2.5.2.4.3 Diseño

Diseño completamente al azar (DCA), con 30 repeticiones.

2.5.2.4.4 *Análisis Funcional*

Prueba de significancia de Duncan al 5%, para los factores en estudio que presentaron diferencias significativas, empleando el software InfoStat.

La evaluación de *L. pubescens* en fase de enraizamiento *in vitro* se realizó cada 7 días durante 3 semanas.

2.5.2.4.5 *Variables evaluadas durante la fase de enraizamiento in vitro de Lupinus pubescens.*

- Porcentaje presencia de raíces: Variable que fue evaluada mediante la observación dando valores de "0" ausencia y "1" presencia de raíces (Ecuación 6).
- Porcentaje formación de callo: Valorada a través de la observación con valores "0" ausencia y "1" presencia de callo (Ecuación 11).
- Promedio número de hojas: Evaluada mediante un conteo por explante sin distinción del tamaño de los folíolos de las hojas (Ecuación 8).
- Promedio de longitud: Medida en centímetros (cm) tomada desde la base del explante hasta el ápice del mismo (Ecuación 7).
- Color del explante: Evaluadas mediante una escala colorimétrica (Figura 6), con valores de 5 = verde oscuro, 4 = verde claro, 3 = amarillo, 2 = café oscuro, 1 = café claro, 0 = blanco (Ecuación 9).
- Porcentaje de sobrevivencia: Se evaluó el número de explantes vivos sobre el total de introducidos hasta el final de la Fase III, con valores de cero "0" muerto y uno "1" vivo (Ecuación 5).

- Porcentaje de contaminación: Se realizó la observación de presencia de colonias bacterianas o fúngicas en el medio de cultivo y/o explante. Se evaluó con cero “0” ausencia y uno “1” presencia de microorganismos (Ecuación 1).
- Porcentaje de Marchitez: Valorada a través de la observación del explante, tomando en cuenta la pérdida de turgencia y color, se dio valores de “0” muerto y “1” vivo (Ecuación 12).

2.5.2.5 Fase IV: Adaptación al sustrato de *Lupinus pubescens*.

Se evaluaron dos tipos de sustratos descrito en la tabla 10, los sustratos fueron remojados en agua destilada para su hidratación (fibra de coco 3 días, y turba 3 horas), posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 25 minutos, cada sustrato fue colocado en una bandeja de germinación, misma que posterior a la siembra fue cubierta con parafilm, obteniendo un ambiente similar a *in vitro* (Figura 8).

La cubierta se mantuvo durante 20 días, con un cambio de plástico por semana, durante la segunda semana el plástico fue perforado con agujeros separados de aproximadamente 0,5 cm para la adaptación paulatina de las plántulas, desde el día 16 hasta 22 se incrementó el diámetro de los agujeros hasta 1,5 cm con poca distancia entre ellos, y desde el día 23 hasta el 30 se retiró completamente el plástico.

2.5.2.5.1 Factores en estudio

a) Sustratos (Fibra de coco y Turba estéril)

Tabla 12. Sustratos utilizados para la fase de adaptación en *Lupinus pubescens*.

Trat	Sustratos	Referencias bibliográficas
T1	Fibra de coco	(Proaño, 2011, pág. 41)
T2	Turba estéril	(Andrade, 2014)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

2.5.2.5.2 Unidad experimental

Se utilizó una bandeja de germinación de 48 alveolos, con una plántula por alveolo, 24 plantas por tratamiento.

2.5.2.5.3 *Diseño*

Diseño completamente al azar (DCA), con 24 repeticiones por tratamiento.

2.5.2.5.4 *Análisis Funcional*

Prueba de significancia de Duncan al 5%, para los factores en estudio que presentaron diferencias significativas, empleando el software InfoStat.

2.5.2.5.5 *Variables valoradas durante las Fase IV en *Lupinus pubescens**

- Porcentaje de marchitez: Valorada mediante la observación de la pérdida de turgencia y color en los órganos de la plántula (tallo y hojas), se otorgó valores de “0” ausencia y uno “1” presencia de marchitez (Ecuación 12).
- Porcentaje de pudrición: Se evaluó mediante la observación del reblandecimiento y necrosamiento de la plántula, dando valores de “0” ausencia y uno “1” presencia (Ecuación 13).
- Porcentaje de prendimiento: Se midió a través del arraigamiento o la dificultad de desprendimiento del explante del sustrato, dando valores de “0” no prendido; “1” prendido (Ecuación 14).
- Promedio número de hojas: Variable evaluada mediante de un conteo numérico sobre el total de hojas por explante (Ecuación 8).
- Promedio número de brotes: Se evaluó por cada explante a través de un conteo numérico de cada brote axila (Ecuación 10).
- Promedio longitud: Valorada mediante la medición en cm desde la base hasta el ápice de cada explante (Ecuación 7).

- Color del explante: Se evaluó a través de la observación del color (Figura 6), cada explante y se comparó con una escala colorimétrica dando valores de 5 = verde oscuro, 4 = verde claro, 3 = amarillo, 2 = café oscuro, 1 = café claro, 0 = blanco (Ecuación 9).
- Porcentaje de sobrevivencia: Se evaluó mediante la observación y conteo de los explantes vivos, sobre el total de introducidos hasta el final de la Fase IV, con valores de cero “0” muerto y uno “1” vivo (Ecuación 5).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 *Geranium chilloense*

3.1.1 FASE 0: Escarificación de las semillas de *Geranium chilloense*

En esta fase, mediante un análisis estadístico ADEVA y la prueba de Duncan, se evaluaron dos tratamientos de escarificación, valorando contaminación microbiana, fenolización, sobrevivencia y germinación con respecto a los días de hidratación y el tiempo de inmersión en una dilución de ácido acético.

Tabla 13. ADEVA para las variables de contaminación bacteriana, contaminación fúngica, fenolización del medio de cultivo, fenolización del explante, sobrevivencia y germinación evaluadas en la fase de escarificación en las semillas de *Geranium chilloense*.

FV	GL	% C.B		% C.F		% F.M		% F.E		% S		% G	
		CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
Trat	1	0,18	0,0379	0,03	0,277	0,48	0,0449	3,32	0,001	0,01	0,7869	0,10	0,4786
Error	210	0,04		0,03		0,12		0,21		0,20		0,21	
Total	211												

C.B=Contaminación bacteriana; **C.F**=Contaminación fúngica; **F.M**=Fenolización del medio **F.E**=Fenolización al explante; **S**=Sobrevivencia; **G**=Germinación; **GL**=Grados de libertad; **CM**= Media cuadrática; **p**=valor de alfa.

Nota: Benavides & Córdova, 2015

Acorde a la tabla 11, se registraron diferencias estadísticamente significativas para ambos tratamientos ($p < 0,05$), para las variables contaminación bacteriana, fenolización del medio de cultivo y explante; mientras que, para las variables contaminación fúngica, sobrevivencia y germinación no se encontraron diferencias significativas para los tratamientos.

Tabla 14. Promedios y pruebas de significación para los porcentajes de contaminación bacteriana y contaminación fúngica, fenolización del medio de cultivo, fenolización del explante, germinación y sobrevivencia para la evaluación de la escarificación en *Geranium chilloense*, evaluados a los 60 días.

Trat	Hidratación	T.I	% C.B	% C.F	% F.M	% F.E	% G	%S
T1	3 días	2 horas	1 ±0,02a	2 ±0,02a	18 ±0,03b	22 ±0,04a	31±0,04a	29±0,04a
T2	5 días	4 horas	7±0,02b	4 ±0,02a	8 ±0,04a	47 ±0,05b	26±0,05a	27±0,05a

T.I=Tiempo de inmersión; C.B=Contaminación bacteriana; C.F=Contaminación fúngica; F.M=Fenolización del medio de cultivo; F.E=Fenolización del explante; G=Germinación; S=Sobrevivencia.

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas (p<0,05)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

3.1.1.1 Porcentaje de contaminación bacteriana

En la tabla 12, se observa el mayor porcentaje de contaminación bacteriana en T2 (5 días de hidratación + 4 horas de inmersión en la dilución de vinagre), con el 7%, mientras que el tratamiento T1 (3 días de hidratación + 2 horas en inmersión en la solución de vinagre) presentó el 1%, indicando que favoreció en la disminución de contaminación bacteriana.

3.1.1.2 Porcentaje de contaminación fúngica

La presente variable no presentó diferencias estadísticamente significativas (Tabla 12), sin embargo, el valor más bajo lo presentó el T1 con un 2%, mientras que T2 presentó un 4% de contaminación fúngica.

3.1.1.3 Porcentaje de fenolización del medio de cultivo

Los resultados de la tabla 12, muestran que el tratamiento T1 obtuvo mayor porcentaje de fenolización del medio de cultivo, con un 18%; mientras que, T2 presentó un menor porcentaje de fenolización con el 8%, lo que demuestra que la oxidación del medio de cultivo disminuye al aumentar los días de hidratación y el número de horas de inmersión en la dilución de ácido acético.

3.1.1.4 Porcentaje de fenolización del explante

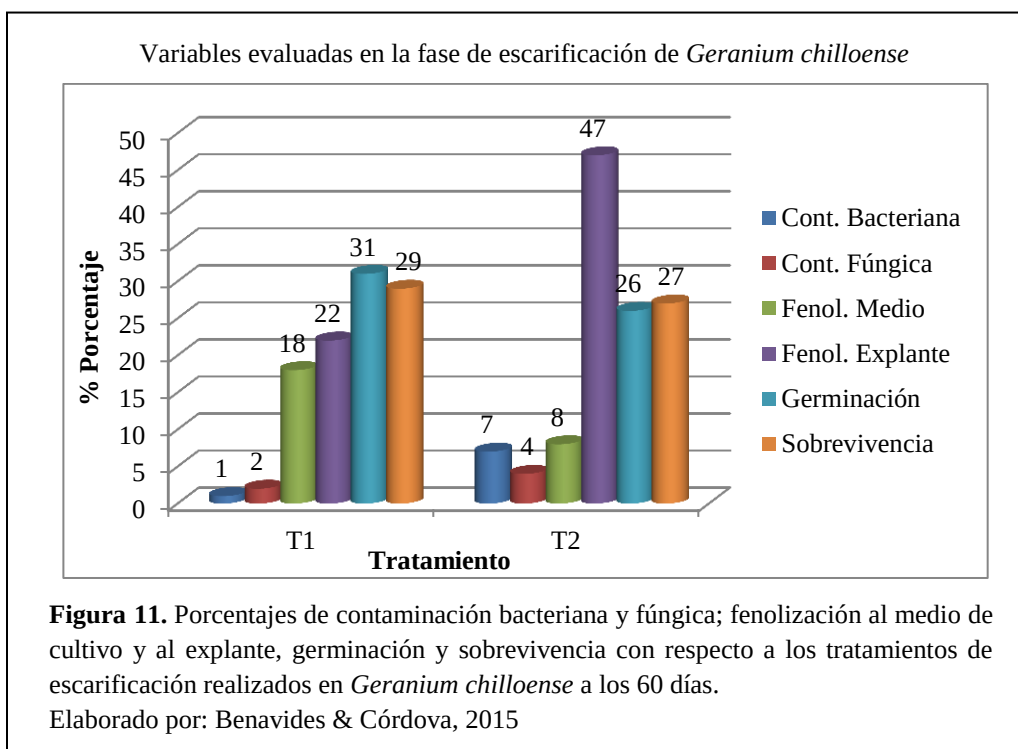
Para la variable fenolización al explante se evidencia que el mayor porcentaje de oxidación presentó el tratamiento T1 con un 22%, frente al tratamiento T2 que presentó una fenolización del 47%, lo que hace presumir que el aumento de días de remojo y horas de inmersión aumenta la fenolización de las semillas y su explante, incidiendo negativamente en la germinación.

3.1.1.5 Porcentaje de germinación

La variable porcentaje de germinación no presentó diferencias significativas para los tratamientos; sin embargo, T1 (3días de remojo y 2 horas en 45 ml agua estéril destilada + 5 ml de ácido acético) obtuvo el mayor porcentaje de germinación con un 31%, frente al T2 que presentó 26%.

3.1.1.6 Porcentaje de Supervivencia

A través de la prueba de Duncan se determinó que para la variable porcentaje de supervivencia, no hubo diferencias estadísticamente significativas, sin embargo T1 obtuvo un mayor porcentaje de supervivencia con el 29%, mientras que T2 presentó 27%.



De acuerdo la figura 11, se escogió al tratamiento T1 como óptimo para la escarificación de las semillas en *Geranium chilloense*, puesto que presenta los menores porcentajes de contaminación bacteriana, contaminación fúngica y fenolización del explante, permitiendo la continuidad de la investigación.

Wright, Sumner, Hackney, Pierson, & Zoecklein (2000, p. 123), demostraron que si sumergían manzanas inoculadas con *Escherichia coli* O157:H7 durante dos minutos en una solución al 5% de ácido acético se lograba una disminución de 59,04% en la carga superficial de esta bacteria. Garmendia & Vero (2006, p. 6), indican que los ácidos orgánicos son muy utilizados para prevenir el desarrollo microbiano, su uso se basa en lograr un bajo pH que impida la proliferación de microorganismos no deseados. Sin embargo también tienen acción antimicrobiana por sí misma.

Kyanko, Russo, Fernández, & Pose (2010, p. 55), usaron ácido peracético al 0,3% durante 30 min, para reducir la carga de esporas de mohos micotoxigénicos, causantes de pudrición de frutas y hortalizas, obteniendo una reducción de 79,02%, en *A. alternata*, *F. graminearum* y *A. ochraceus*, e indican que al contener una combinación de peróxido de hidrógeno y ácido acético, el ácido peracético es un eficaz desinfectante puesto que posee un mayor espectro de acción, siendo efectivo en presencia de materia orgánica y de aguas duras.

Manotoa (2012, pp. 25-28), evaluó tres formas de escarificación mecánica (corte en el endocarpio), en semillas de *Olea europea*, los cortes fueron de un lado, de ambos lados y totalmente, reportando un mayor porcentaje de germinación (36,5%) y de sobrevivencia (53,24%), con el corte de un solo lado, e indica que los tratamientos pre-germinativos son efectivos para reducir el tiempo en la germinación obteniendo un mayor vigor en la plántula. En cuanto a la escarificación química Sanabria, Silva, Oliveros, & Barrios (2001, pp. 119-120), evaluaron dos tipos de escarificación: química y térmica en semillas de *Centrosema rotundifolium*, en la escarificación química utilizaron ácido sulfúrico al 98% en diferentes tiempos (0,2,4,8,16,32 y 64 min), mientras que en la térmica utilizaron agua a 100 °C y 37°C en varios tiempos (0, 5, 10,

20, 40, 80 y 160 segundos), evaluando el porcentaje de germinación y de mortalidad, para lo cual obtuvo el 98% de sobrevivencia al usar 32 min de inmersión en ácido sulfúrico, mientras que, el tratamiento térmico no fue viable para las dos variables en estudio, y sostienen que se obtiene mejores resultados con la utilización de ácidos como tratamientos pre-germinativos, como en el presente estudio que se utilizó ácido acético. Sin embargo Navarro & González (2007, pp. 198-199), indican que al evaluar cuatro tipos de escarificación: ácido sulfúrico, agua a 50°C, ácido giberélico y agua a 4 °C, en semillas de *Ferocactus robustus*, no encontraron diferencias significativas, concluyendo que el tipo de escarificación no afectó a la germinación.

3.2 FASE I. Protocolo de desinfección e introducción al medio de cultivo

3.2.1 Protocolo de desinfección en las semillas de *Geranium chilloense*

En la fase I, se evaluaron los tratamientos de desinfección para las variables contaminación bacteriana, contaminación fúngica, fenolización del medio de cultivo, fenolización del explante y sobrevivencia, todas las variables fueron evaluadas a los 60 días.

Tabla 15. ADEVA para las variables de porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica; fenolización del medio de cultivo y del explante, sobrevivencia y germinación, evaluadas en desinfección de *Geranium chilloense*.

FV	GL	% C.B		% C.F		% F.M		% F.E		% S		% G	
		CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
Trat	2	0,18	0,0121	0,06	0,1281	0,20	0,1844	0,41	0,1603	0,04	0,8202	0,10	0,6236
Error	209	0,04		0,03		0,12		0,22		0,21		0,21	
Total	211												

GL=Grados de libertad; **CM**= Media cuadrática; **p**= valor de alfa **C.B**= Contaminación bacteriana; **C.F**= Contaminación fúngica; **F.M**=Fenolización al medio; **F.E**=Fenolización al explante; **S**= Sobrevivencia, **G**=Germinación

Nota: Benavides & Córdova, 2015.

Según la tabla 13, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las variables de contaminación fúngica, fenolización del medio de cultivo, fenolización del explante, sobrevivencia y germinación, indicando que los protocolos de desinfección utilizados no influenciaron a las variables mencionadas, mientras que, la variable

contaminación bacteriana mostró diferencias significativas con un alfa menor al 0,05 ($p=0,0121$).

Tabla 16. Promedios y pruebas de significancia para el porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica; fenolización del medio y del explante y sobrevivencia evaluadas en los protocolo de desinfección de *Geranium chilloense*, a los 60 días de evaluación.

Trat	Solución 1		Solución 2			% C.B	% C.F	% F.M	% F.E	%S	%G
	Alcohol		NaOCl		Tween						
	%	T.I	%	T.I							
P1	96	10 seg	50 v/v	10 min	-	0 ± 0,02a	6± 0,02a	20 ± 0,04a	37 ± 0,06a	31 ± 0,05a	32±0,05 ^a
P2	-	-	50 v/v	15 min	1 gota	10 ± 0,02b	0± 0,02a	10 ± 0,04a	39 ± 0,06a	26 ± 0,05a	25±0,05 ^a
P3	70	1 min	20 v/v	20 min	1 gota	3 ± 0,02a	3± 0,02a	12 ± 0,04a	25 ± 0,06a	28 ± 0,05a	29±0,05 ^a

T.I=Tiempo de inmersión; C.B=Contaminación bacteriana; C.F=Contaminación fúngica; F.M=Fenolización al medio de cultivo; F.E=Fenolización al explante; S= Sobrevivencia; G=Germinación.

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas ($p<0,05$)

Nota: Benavides & Córdova, 2015.

3.2.1.1 Porcentaje de contaminación bacteriana

En la tabla 14, se determinó a través de una prueba de Duncan, que existe diferencias significativas para la variable contaminación bacteriana. Los tratamientos P1 y P3, presentaron menor porcentaje de contaminación, con el 0% y 3%, respectivamente. Mientras que, el tratamiento P2 indica una mayor contaminación con un 10 %, determinado que la inmersión en alcohol en combinación con el hipoclorito de sodio, es favorable para obtener la menor contaminación bacteriana.

3.2.1.2 Porcentaje de contaminación fúngica

Para esta variable se observó que los tres tratamientos no presentan diferencias estadísticamente significativas (Tabla 14). Sin embargo, se evidencia que hay mayor porcentaje de contaminación fúngica en el tratamiento P1 con 6%, seguido del tratamiento P3 con un 3% y finalmente el P2 el cual no presenta contaminación (0%).

3.2.1.3 Porcentaje de fenolización del medio de cultivo

Se determinó que los tres tratamientos evaluados no presentaron diferencias significativas. El tratamiento P1 presentó 20% de fenolización al medio de cultivo, seguido del tratamiento P3 con un 12% y P2 con el 10%.

3.2.1.4 Porcentaje de fenolización del explante

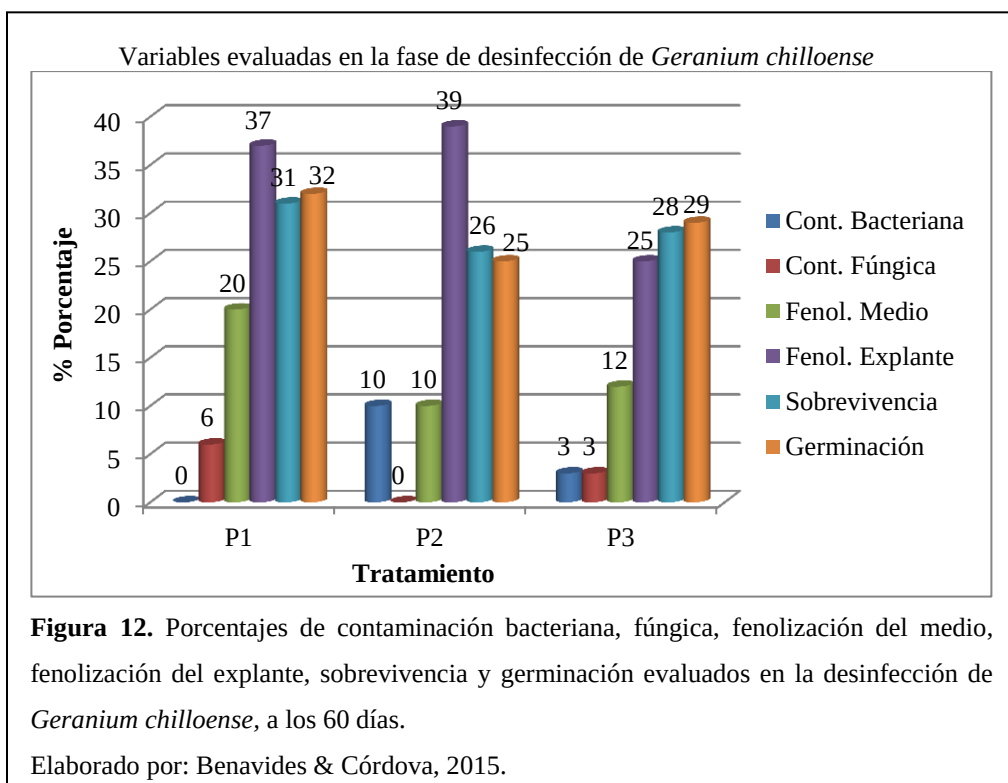
De acuerdo a los resultados obtenidos mediante la prueba de Duncan, no hay diferencias estadísticamente significativas para los tres tratamientos ($p > 0,05$). No obstante el tratamiento P3 es el de menor porcentaje de fenolización con un 25%, seguido de P1 con 37% y finalmente P2 con el 39%.

3.2.1.5 Porcentaje de sobrevivencia

Para esta variable se observó que no existe relación con respecto a los protocolos de desinfección utilizados ya que no se registraron diferencias estadísticamente significativas, el menor porcentaje de sobrevivencia presentó, el tratamiento P2 con un 26%, seguido de P3 con el 28% y P1 con un 31%.

3.2.1.6 Porcentaje de germinación

De acuerdo a la tabla 14, se determinó que no existen diferencias significativas entre tratamientos, para la variable porcentaje de germinación. Sin embargo el tratamiento P1 presentó 32%, seguido de P3 con el 29%, y finalmente P2 con un 25%.



En base a lo observado en la figura 12, se escogieron a los tratamientos P1 y P3 como favorables para la desinfección de *Geranium chilloense*, los cuales contienen: P1, etanol al 96% durante 10 segundos, seguido de hipoclorito de sodio al 50% por 10 minutos, y P3 etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 20% más una gota de Tween por 20 minutos (Tabla 14). A pesar que el protocolo P2 mostró los porcentajes más bajos de contaminación fúngica y fenolización del medio de cultivo, no fue escogido por presentar el mayor porcentaje de contaminación bacteriana, fenolización del explante y menor valor de sobrevivencia y germinación (Figura 12). Esto hace presumir que exposiciones prolongadas de altos porcentajes de hipoclorito de sodio aumentan la fenolización y disminuyen la sobrevivencia del explante, mientras que la combinación de etanol en intervalos cortos, con hipoclorito de sodio favorece la descontaminación microbiana y aumentan la sobrevivencia del explante.

Los tratamientos escogidos concuerdan con lo encontrado por Coba (2009, pág. 40), que al evaluar diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio con respecto a la desinfección en meristemas en *Fragaria chiloensis*, obtuvo mejores resultados de descontaminación (0%), al utilizar concentraciones iguales o mayores a 2,5% en períodos superiores a los 10 minutos, sin embargo altas concentración de cloro fueron causantes de necrosis paulatina en los explantes, mientras que al utilizar hipoclorito de sodio 20%, durante 20 min, obtuvo 80% de descontaminación y el 73.33% de sobrevivencia, Ayala J. (2012, pág. 30), presentó resultados parecidos al anterior estudio puesto que presentó menor contaminación (45%) y mayor porcentaje de sobrevivencia (97%), en hojas de *Gerbera jamesonii* al utilizar 1% de hipoclorito durante 20 minutos de inmersión.

Ayala A. (2011, pág. 62), mostró que al usar 2 % de hipoclorito de sodio durante 20 minutos en yemas axilares de *Schinus molle*, se alcanzan bajos porcentajes de contaminación (18,33%), mientras que, la sobrevivencia se ve afectada (30%), por lo que manifiesta que altas concentraciones de hipoclorito de sodio provocan daños en el explante. Noroña (2010, págs. 42-43), evaluó nueve tratamientos de desinfección en

Myrciaria dubia, siendo las mejores concentraciones de hipoclorito de sodio 1% y 2% durante 15 y 10 minutos respectivamente, obteniendo 0% de contaminación bacteriana y fúngica en ambos casos, mientras que en la sobrevivencia obtuvo 100% en el primer tratamiento y 88% para el segundo, al igual que un alto índice de brotación 68% y 60% respectivamente para cada caso, indicando que la sobrevivencia y brotación de los explantes, disminuyen a medida que se aumentaba la concentración y el tiempo de exposición de hipoclorito de sodio en los tratamientos.

El tener un 0% de contaminación no implica necesariamente el éxito del desarrollo del cultivo, ya que se deben evaluar en conjunto todos los factores como sobrevivencia, contaminación y fenolización.

Resultados de los protocolos de desinfección utilizados en la fase de desinfección de *G. chilloense* a las 21 días.

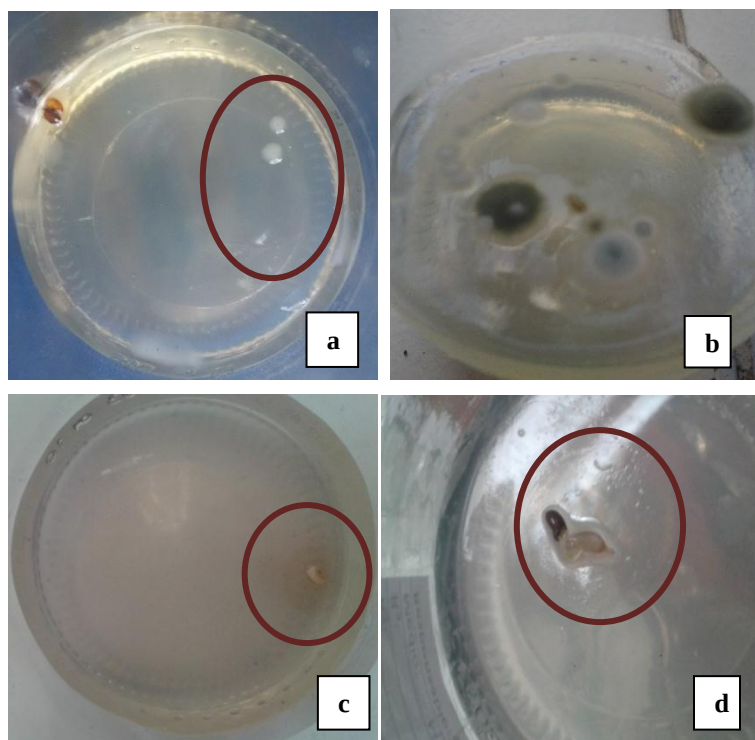


Figura 13. a) Contaminación bacteriana utilizando el protocolo P2; b) Contaminación fúngica presente en protocolo P1; c) Fenolización al medio del protocolo P1; d) Fenolización del explante utilizando el protocolo P1.

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015

3.2.2 Introducción al medio de cultivo en sales MS

En la fase I, se evaluó la concentración de sales MS, para las variables germinación, presencia de raíces, número de hojas, longitud, color y sobrevivencia, a los 60 días de introducidos al medio.

Tabla 17. ADEVA para las variables de porcentaje de germinación, porcentaje de presencia de raíces, promedio del número de hojas, promedio de longitud, color y porcentaje sobrevivencia en la fase de introducción al medio de cultivo en *Geranium chilloense*.

FV	GL	% Germinación		% Sobrevivencia		% Presencia Raíces		No. de hojas		Longitud (cm)		Color	
		CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
Trat	2	0,98	0,0079	0,97	0,0082	1,31	0,0005	13,46	0,015	31,79	0,0143	1,59	0,1717
Error	209	0,2		0,20		0,17		3,14		7,33		0,86	
Total	211												

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa

Nota: Benavides & Córdova, 2015

Acorde a la tabla 15, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las variables porcentaje de germinación, porcentaje de presencia de raíces, promedio de número de hojas y promedio de longitud y sobrevivencia debido a que presentan valores de $p < 0,05$, indicando que la concentración de sales MS están relacionada con los resultados de las variables evaluadas, mientras que color no presenta diferencias significativas.

Tabla 18. Promedios y pruebas de significancia para el porcentaje de germinación, porcentaje de presencia de raíces, promedio del número de hojas, promedio de longitud, color y porcentaje sobrevivencia, con respecto a la concentración de sales MS en *Geranium chilloense*, evaluados a los 60 días.

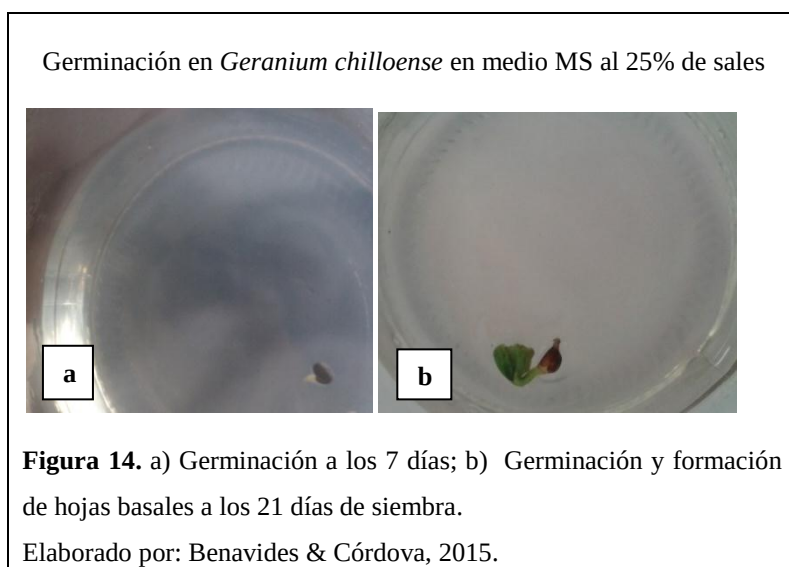
Trat	% sales MS	% Germinación	% Sobrevivencia	% Presencia Raíces	No. de hojas	Longitud (cm)	Color
T1	100	18 $\pm$ 0,05 a	17 $\pm$ 0,05 a	13 $\pm$ 0,05 a	0,58 $\pm$ 0,21 a	0,98 $\pm$ 0,32 a	4,22 $\pm$ 0,28 a
T2	50	27 $\pm$ 0,05 ab	29 $\pm$ 0,05 ab	19 $\pm$ 0,05 a	0,89 $\pm$ 0,21 ab	1,55 $\pm$ 0,32 ab	4,02 $\pm$ 0,22 a
T3	25	41 $\pm$ 0,05 b	40 $\pm$ 0,05 b	39 $\pm$ 0,05 b	1,44 $\pm$ 0,21 b	2,32 $\pm$ 0,32 b	4,58 $\pm$ 0,23 a

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

Nota: Benavides & Córdova, 2015.

3.2.2.1 Porcentaje de germinación

De acuerdo a la tabla 16, se determinó que los tratamientos presentaron diferencias significativas, T3 presentó el 41% (Figura 14), seguido del T2 con el 27% y finalmente T1 con un 18%, indicando que la reducción de sales MS (25%), favorece la germinación de la especie.



3.2.2.2 Porcentaje de sobrevivencia

A través de la prueba de Duncan, se determinó que si hay diferencias significativas, el tratamiento T1 presentó el menor porcentaje de sobrevivencia (17%), mientras que el tratamiento T3 fue el de mayor valor (40%), seguido del tratamiento T2 con el 29% (Tabla 16), demostrando que se obtuvo mayor sobrevivencia a un cuarto de concentración de sales MS en el medio de cultivo.

3.2.2.3 Porcentaje de presencia de raíces

El tratamiento T3 que posee el 25% de concentración de sales MS, obtuvo un mayor porcentaje de presencia de raíces con el 39% (Figura 15a), seguido de T2 que presentó el 19 % y con el menor porcentaje para la presente variable el T1 con un 13%, significando que la presencia de raíces es dependiente de la concentración de sales y que su disminución en el medio de cultivo favorece la presencia de raíces (Tabla 16).

Presencia de raíces y hojas en *Geranium chilloense* en medio MS al 25% de sales evaluados a los 60 días.

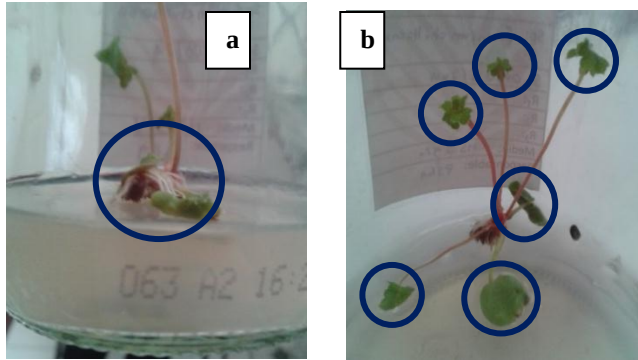


Figura 15. a) Presencia de raíces; b) Hojas totales en el explante
Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015.

3.2.2.4 Promedio de número de hojas

Al evaluar la relación de la concentración de sales con respecto al promedio de número de hojas totales (Tabla 16), se obtuvo que el tratamiento T1 presentó el menor promedio con 0,58 seguido del T2 con 0,89, mientras que tratamiento T3 evidenció el mejor promedio de los tres tratamientos con 1,44 (Figura 15b), por lo tanto se observa que el desarrollo de hojas aumenta a medida que se disminuye la concentración de sales MS.

3.2.2.5 Promedio de longitud

La longitud de los explantes fue mayor a medida que se reducía la concentración de sales MS, siendo el tratamiento T3 (25% de sales) el que presentó un mejor promedio de crecimiento (2,32 cm), mientras que la menor longitud (0,98 cm) obtuvo el tratamiento T1 con sus sales completas, seguido de T2 (50% de sales) con un promedio medio de 1,55 cm (Tabla 16).

3.2.2.6 Color del explante

En la tabla 16, se determinó que no existen diferencias significativas para la variable color. Siendo el tratamiento T3 (25% sales) el que presentó color verde oscuro con un promedio de 4,58, seguido de T1 (100% sales) que presentó un promedio de 4,22 y T2

(50% de sales) con un promedio de 4,02 cuyos explantes mostraron un color verde claro. Lo que significa que a mayor concentración de sales la coloración de explante tiende a ser clorótica, mientras que si la concentración de sales disminuye, el color tiende a ser verde (Figura 16).

Color de explante en *Geranium chilloense* a los 30 días

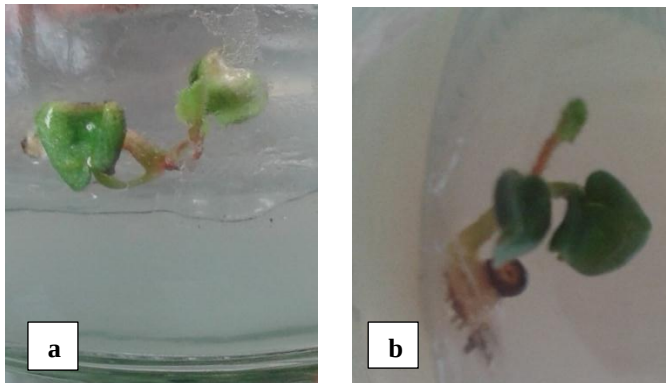


Figura 16. a) Explante verde claro (4), en sales MS al 50%; b) Explante verde oscuro (5), en sales MS al 25%.

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015.

Variables evaluadas en la fase de introducción al medio de cultivo en *Geranium chilloense*

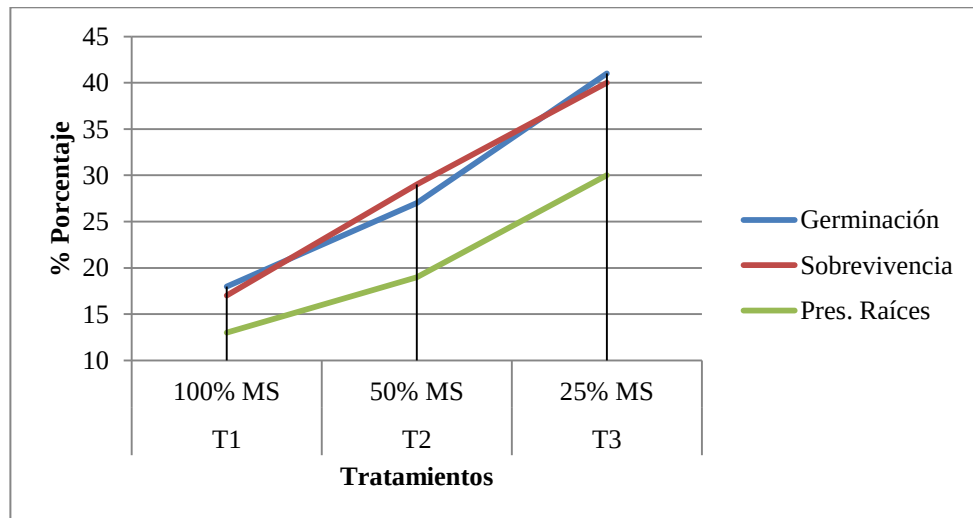
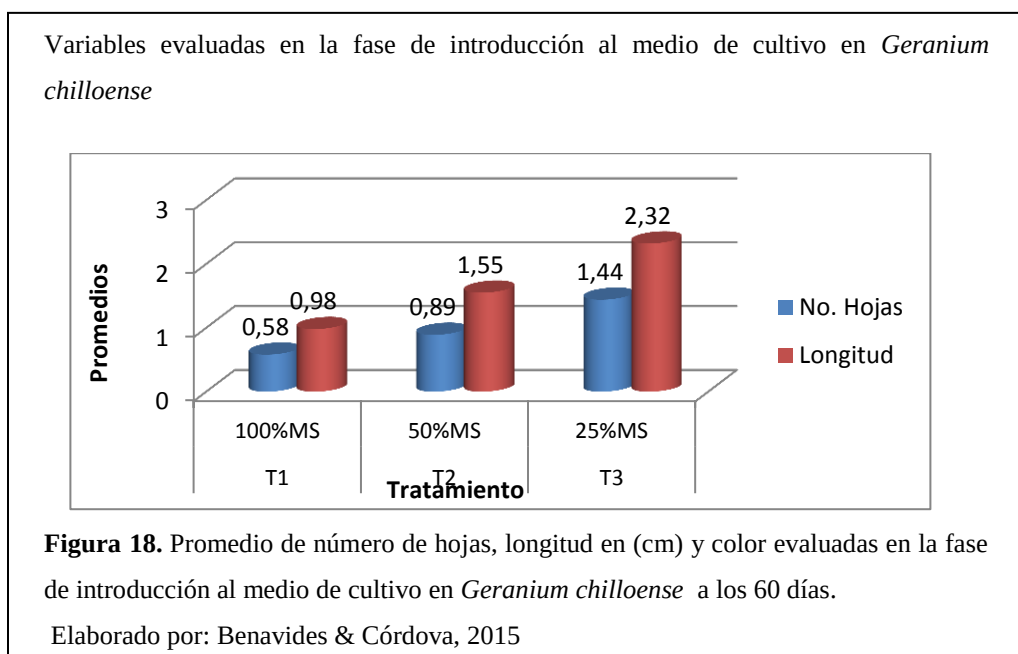


Figura 17. Porcentajes de germinación, presencia de raíces y sobrevivencia, evaluadas en la fase de introducción al medio de cultivo de *Geranium chilloense* a los 60 días.

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015

De acuerdo a las figura 17 y 18, se determinó que a medida que se reduce la concentración de sales MS, la respuesta obtenida para las variables, porcentajes de: germinación, presencia de raíces y sobrevivencia, al igual que promedios de número de hojas, longitud en (cm), es mayor (Figura 19) siendo el tratamiento T3, con un 25% (1/4) de sales de MS, óptimo para la introducción al medio de cultivo en *Geranium chilloense*.



Uribe, Delaveau, Garcés, & Escobar (2008, págs. 58-64), indican que el medio MS presenta un alto contenido de nitrógeno (60 meq/L⁻¹), que en consecuencia puede afectar la sobrevivencia y viabilidad de los explantes, variables que también se pueden ver afectadas por la alta concentración salina del medio, y recalcan que medios ricos en nitrógeno favorecen la necrosis en los tejidos. De esta manera, al diluir la concentración de sales en el medio de cultivo se favorece al desarrollo y vigor de los explantes, obteniendo plántulas más saludables con hojas más verdes y expandidas, lo cual concuerda con el tratamiento escogido en *Geranium chilloense*, puesto que la reducción de sales favoreció a las variables en estudio. Sansberro & Mroginski, (1995 págs. 83-86), revelaron óptimos resultados en la regeneración de segmentos nodales de *Aloysia polystachia* al reducir la concentración de sales MS al 25%, en ausencia de reguladores

de crecimiento, aduciendo que concentraciones mayores de MS (100% y 50%), provocan altos grados de fenolización y necrosamiento del material vegetal. González (2002) citado por Noroña (2010, p. 89), evaluó cuatro medios de cultivo: a) agua destilada, b) MS al 100%, c) MS al 50% y d) MS al 25% en *Myrciaria dubia* obteniendo mayor número de hojas y mejor crecimiento en MS al 25%.

Pedroza & Caballero (2009, p. 93), estudiaron en propágulos de *Marchantia polymorpha* distintas concentraciones de sales MS (100%; 50% y 25%), obteniendo una rápida adaptabilidad al medio, buen desarrollo, rápido crecimiento, buen vigor y alto porcentaje de sobrevivencia, al usar una concentración de 25% de sales MS, indicando que bajas concentraciones de sales minerales provocan un mayor potencial hídrico, que favorece el buen desarrollo vegetativo. Mroginski, Rey & Mroginski (2003, pp. 177-184), trabajaron con segmentos uninodales de *Toona ciliata*, probaron un $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ del medio basal MS, obtuvieron el mayor porcentaje de regeneración de vástagos al utilizar $\frac{1}{4}$ (de sales MS).

Tratamientos T1 y T3 en la fase de introducción al medio de cultivo de *Geranium chilloense* a los 60 días de evaluación.

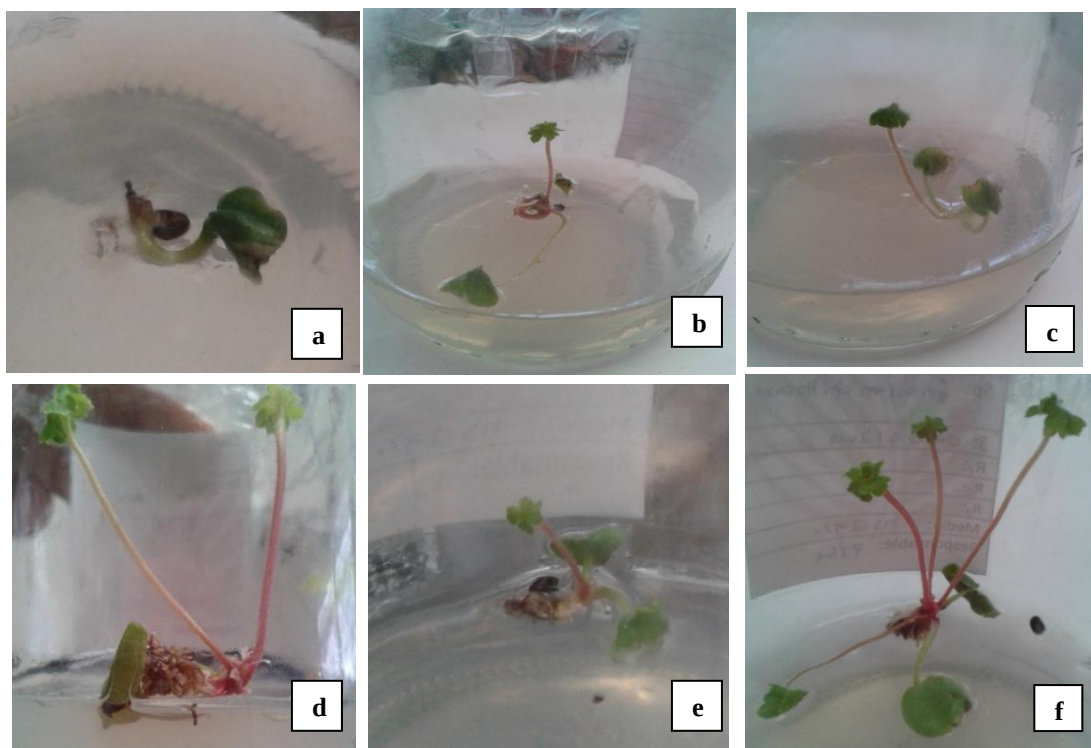


Figura 19. Explantes introducidos en medio MS al 100%, a) Desinfectado con P1, b) Desinfectado con P2 y c) Desinfectado con P3; y explantes introducidos en MS al 25% d) Desinfectados a través de los protocolos P1, b) Desinfectado con P2 y c) Desinfectado con P3 respectivamente.

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015

Tabla 19. ADEVA para porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica, fenolización del medio de cultivo de cultivo y del explante, de acuerdo a la concentración de sales MS en la Fase I evaluados a los 60 días.

FV	GL	C.B		C.F		F.M		F.E	
		CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
Trat	2	0,10	0,0088	0,04	0,2318	0,36	0,0489	0,01	0,9641
Error	209	0,04		0,03		0,12		0,23	
Total	211								

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa, CB=Contaminación bacteriana; CF=Contaminación fúngica; FM=Fenolización al medio de cultivo; FE=Fenolización al explante.

Nota: Benavides & Córdova, 2015.

Según la tabla 17, no se encontraron diferencias significativas en las variables de porcentajes de contaminación fúngica y fenolización del explante puesto que obtuvieron un $p > 0,05$, mientras que para las variables contaminación bacteriana ($p = 0,0088$) y fenolización del medio de cultivo ($p = 0,0489$), presentaron diferencias estadísticamente significativas, demostraron dependencia con respecto a la concentración de sales MS.

Tabla 20. Promedios y pruebas de significancia para los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica; fenolización del medio de cultivo y del explante, de acuerdo a la concentración de sales MS en *Geranium chilloense*, evaluadas a los 60 días del ensayo.

Trat	% Sales MS	% Contaminación Bacteriana	% Contaminación Fúngica	% Fenolización del Medio	% Fenolización del Explante
T1	100	6 ± 0,02 ab	6 ± 0,02 a	19 ± 0,04 b	35 ± 0,06 a
T2	50	0 ± 0,02 a	1 ± 0,02 a	16 ± 0,04 ab	33 ± 0,06 a
T3	25	7 ± 0,02 b	1 ± 0,02 a	6 ± 0,04 a	33 ± 0,06 a

*Medias con letras distintas presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

Nota: Benavides & Córdova, 2015.

3.2.2.7 Porcentaje de contaminación bacteriana

Al analizar la tabla 18, con respecto a la variable de contaminación bacteriana se determinó que el tratamiento T3 con el 25% de sales MS, tuvo el mayor porcentaje de contaminación bacteriana (7%); mientras que, el tratamientos T1 presentó el 6% y T2 un 0% presentaron baja contaminación demostrando que porcentajes mayores al 25% favorecen a la disminución de contaminación bacteriana en los explantes.

3.2.2.8 Porcentaje de contaminación fúngica

Pese a que en esta variable no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos; cabe recalcar que los tratamientos T2 y T3 presentan el mismo valor de contaminación (1%) mientras que el tratamiento T1 presentó el 6% de contaminación fúngica (Tabla 18).

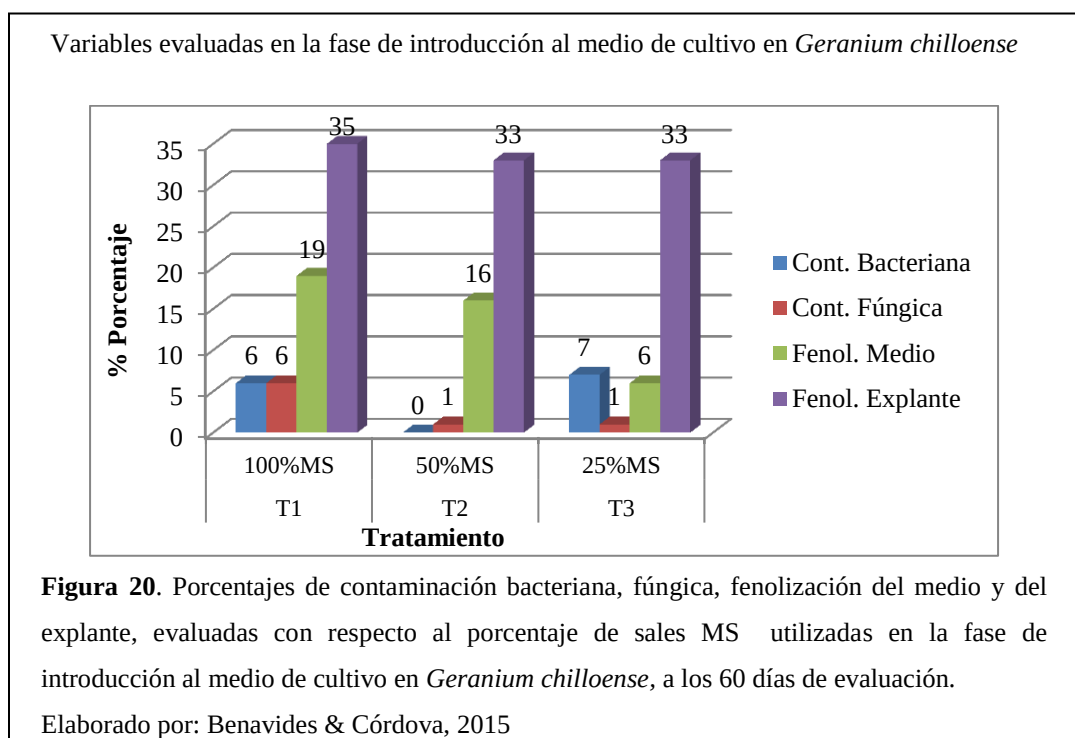
3.2.2.9 Porcentaje de fenolización del medio de cultivo

Con respecto a la variable fenolización al medio de cultivo, el tratamiento T1 (100% MS) obtuvo el mayor porcentaje de fenolización del medio de cultivo con el 19%; T2 (50% MS) con un 16%, seguido finalmente tratamiento T3 (25%) con 6%. Por lo tanto

se demuestra que la reducción de sales permite disminuir la fenolización del medio de cultivo.

3.2.2.10 Porcentaje de fenolización del explante

En la tabla 18, se aprecia que no existen diferencias significativas, lo que indica que la variable no es dependiente de la concentración de sales MS. Sin embargo, el tratamiento T1 con el 35% es el de mayor fenolización, mientras que el tratamiento T2 y T3 obtuvieron igual porcentaje de fenolización (33%).



De acuerdo a la figura 20, se determinó que para las variables porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica, fenolización del medio y del explante, las concentraciones de sales MS al 25% y 50% presentaron menores porcentajes en el establecimiento *in vitro* de *Geranium chilloense*.

Olivera, Tamariz, & Gutierrez (2010, pp. 120-123), evaluó la concentración de sales MS (100% y 50%) en yemas de *Perezia coerulescenas*, con respecto a la fenolización, encontrando que el medio MS con sales completas presentó problemas de fenolización en aproximadamente un 90%, a diferencia de las yemas sembradas en medio MS a la

mitad (MS/2) donde no se observó este problema, y explica que esto podría deberse a que los medios ricos en nitrógeno pueden favorecer la necrosis de los tejidos. Parreño, (2012, p. 15), encontró resultados similares, trabajando en brotes de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), al diluir la concentración de sales a mitad para evitar la fenolización, indicando que la fenolización es menor en un medio diluido que en uno alto en sales. Contrario a lo encontrado en este estudio Cárdenas (2011, pág. 110), observó que la contaminación microbiana con respecto a la concentración de sales en el medio de cultivo, es menor cuando no presenta dilución de sales, obteniendo 6,63% en MSVG completo, mientras que en MSVG/2 presentó 9,91%, estudio realizado en yemas axilares de *Buddleja incana*, expresando que la adición completa de sales inorgánicas en el medio de cultivo podría disminuir los índices de contaminación.

3.3 FASE II. Multiplicación *in vitro* de los explantes de *Geranium chilloense*.

Para la etapa de multiplicación *in vitro* a partir de explantes obtenidos de la fase anterior, se evaluaron los promedios de las variables número de brotes, número de hojas, longitud del explante y los porcentajes de presencia de raíces y sobrevivencia, con respecto a la interacción entre BAP y AIA, en tres diferentes concentraciones (0; 0,5 y 1 ppm) para ambos, durante 30 días.

Tabla 21. ADEVA para los promedios de número de brotes; número de hojas y longitud, porcentajes de raíces y sobrevivencia evaluados en la fase de multiplicación de *Geranium chilloense*, a los 30 días.

FV	GL	Número de Brotes		Número de hojas		Longitud (cm)		Presencia Raíces		% Sobrevivencia	
		CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
Trat	5	4,14	0,4667	3,92	0,4660	3,78	0,8115	0,26	0,3747	0,03	0,9605
Error	45	4,42		4,18		8,42		0,24		0,16	
Total	50										

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa

Nota: Benavides & Córdova, 2015

Según la tabla 19, no se encontraron diferencias significativas en todas las variables, por consiguiente se toman como variables no dependientes de concentración de BAP y AIA en el medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de la especie.

Tabla 22. Promedios y pruebas de significancia de las variables evaluadas en la interacción de AIA y BAP en la fase de multiplicación *in vitro* de *Geranium chilloense*, a los 30 días.

Trat	[BAP] (ppm)	[AIA] (ppm)	No. de brotes	No. de hojas	Longitud (cm)	Presencia de raíces	% Supervivencia
T1	0	0	2,0 ± 0,70 a	2,0±0,68 a	4,22±0,97 a	78 ±0,16 a	78 ±0,13 a
T2	0	0,5	3,88 ± 0,74 a	3,88 ±0,72 a	4,98±1,03 a	88±0,17 a	88±0,14 a
T3	0	1	2,88 ± 0,74 a	2,38 ±0,72 a	4 ±1,03 a	63 ±0,17 a	88 ±0,14 a
T4	1	0	3,78 ± 0,70 a	3,33 ±0,68 a	4,81±0,97 a	56 ±0,16 a	89 ±0,13 a
T5	1	0,5	3,22 ± 0,70 a	3,22 ±0,68 a	4,76± 0,97a	56 ±0,16 a	78 ±0,13 a
T6	1	1	3,38 ± 0,74 a	3,0± 0,72 a	3,16±1,03 a	38 ±0,17 a	75 ±0,14 a

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

3.3.1.1 Promedio número de brotes

En la tabla 20, se puede apreciar que la interacción de BAP 0,0 ppm y AIA 0,5 ppm (T2), presentó el mayor promedio de número de brotes (3,88), mientras que el tratamiento, T1 en ausencia de reguladores de crecimiento, fue el que menor media obtuvo (2,0). Sin embargo, cabe mencionar que los tratamientos no presentaron diferencias significativas.

3.3.1.2 Promedio número de hojas

Según la prueba de Duncan se demostró que los resultados de la tabla 20, con respecto al promedio de número de hojas no presentaron diferencias estadísticamente significativas para la presente variable. Sin embargo, se observa que el tratamiento T2 obtuvo 3,88, seguido del T4 con 3,33; T5 con 3,22; T6 con 3,0; T3 con 2,38 y T1 con 2,0.

3.3.1.3 Promedio de longitud

El tratamiento T2 presentó mayor promedio de crecimiento (4,98 cm) y el menor promedio de crecimiento fue el tratamiento T6 (3,16 cm) (Tabla 20). Las interacciones evaluadas para la variable longitud, no demostraron diferencias significativas entre sí.

3.3.1.4 Porcentaje de presencia de raíces

De acuerdo a la tabla 20, se evidenció el mayor porcentaje de presencia de raíces en el tratamiento T2 con 88% en ausencia de BAP en el medio de cultivo, seguido por T1 78% y T3 63%. Sin embargo, cabe recalcar que no hay diferencias significativas para los tratamientos evaluados.

3.3.1.5 Porcentaje de sobrevivencia

La variable sobrevivencia muestra que los resultados obtenidos mediante la prueba de Duncan no presentan diferencias significativas. A pesar de ello, se observó que los tratamientos T2 (88%), T3 (88%) y T4 (89%), presentaron los mayores porcentajes. Mientras que los, tratamientos T1 (78%), T5 (78%) y T6 (75%) son los de menor porcentaje para esta variable.

De acuerdo a la tabla 20, se puede recomendar la interacción de 0 ppm BAP y 0,5 ppm AIA presentes en el tratamiento T2, ya que presentó los mayores valores promedio de número de brotes (3,88), número de hojas (3,88) y longitud (4,98 cm), al igual que altos porcentajes de presencia de raíces (88%) y sobrevivencia (88%), de entre los seis tratamientos evaluados en la fase de multiplicación de *Geranium chilloense* (Figura 21).

Lozada (2010, pp. 81-83), durante la fase de multiplicación *in vitro* de *Solanum batavea* evaluó tres reguladores de crecimiento: ácido indolacético (AIA), bencil amino purina (BAP), brasinoesteroides (BRA), de manera individual y su interacción en conjunto. Al valorar diferentes concentraciones de AIA (0; 0,5; 1 mg /L) obtuvo mayor generación de brotes (12,49) al usar 0,5 mg/L; sin embargo, recalca que la interacción entre BAP y AIA le proporcionó mejores resultados (17,57), no obstante para la variable longitud fue mejor únicamente 0,5 mg/L de AIA sin interacción de las otras hormonas, obteniendo un promedio de altura de 52,17 mm, resultados similares a los obtenidos en la presente investigación.

Lozano (2011, pág. 67), indica que a pesar que el BAP puede tener efectividad para promover la división celular causa también algunos inconvenientes en el cultivo *in vitro*, entre los que se incluye problemas de heterogeneidad en el crecimiento así como

también inhibición en la formación de raíces, es por ello que, es necesario controlar cuidadosamente la concentración de esta hormona en el medio de multiplicación.

Pedroza (2009, pág. 23), afirma que las auxinas o cualquier otro tipo de fitorregulador, son fisiológicamente funcionales cuando se encuentran en pequeñas cantidades, y que una alta concentración de estas sustancias ejercen un efecto negativo sobre las plantas, porque su exceso en lugar de inducir una respuesta específica por parte del tejido vegetal produce toxicidad en el mismo, mostrando que 0,5 mg/L es una concentración óptima para el desarrollo del explante.

Rozo (2014, pág. 60), obtuvo altos porcentajes de enraizamiento y mayor vigor con 0,5 mg/ L de AIA en explantes de *Acacia mangium*, indicando que concentraciones mínimas (0,10 mg/L) y máximas (2 mg/L) provocan la caída de hojas y clorosis en los explantes.

Interacciones de BAP y AIA evaluadas en la fase de multiplicación en *Geranium chilloense*, a los 30 días.

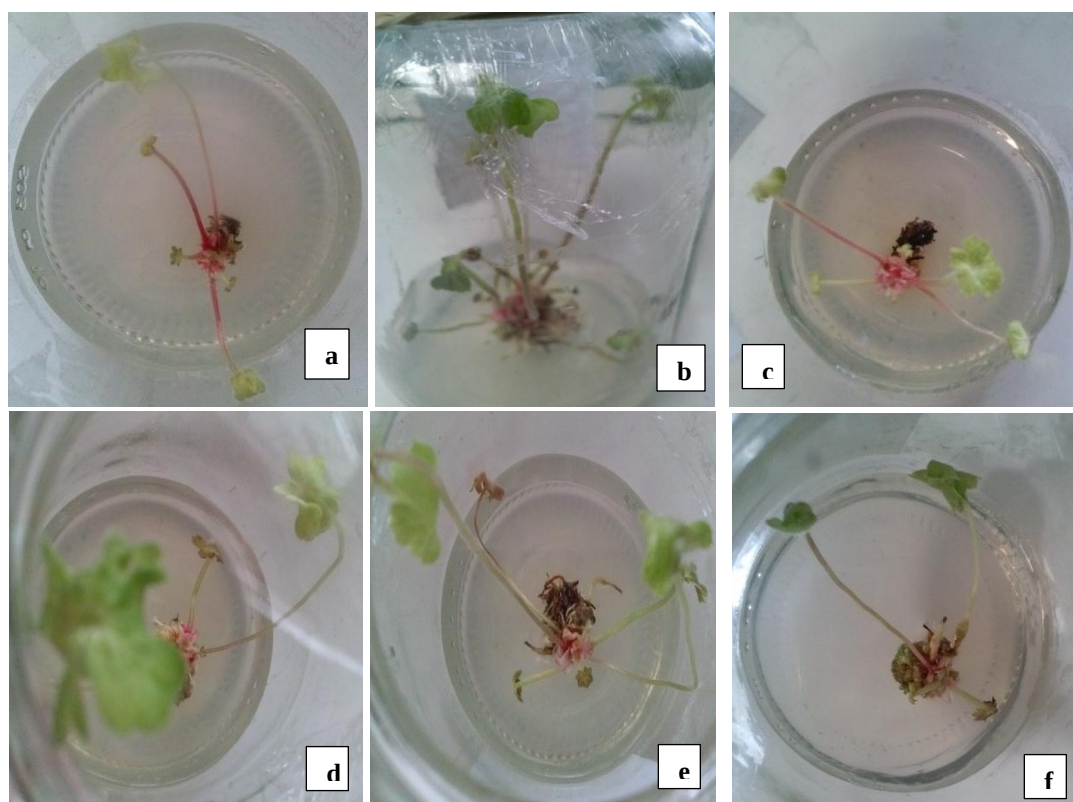


Figura 21. Interacción BAP: AIA en ppm de cada tratamiento, a) T1 (0:0), b) T2 (0:0.5), c) T3 (0:1), d) T4 (1:0), e) T5 (1:0.5), f) T6 (1:1).

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015

Tabla 23. ADEVA para porcentaje de callo, porcentaje de marchitez y color en la fase de multiplicación de *Geranium chilloense* a los 30 días.

FV	GL	% Callo		% Marchitez		Color	
		CM	p	CM	p	CM	p
Trat	5	0,11	0,4848	0,05	0,8106	0,06	0,3909
Error	45	0,12		0,11		0,05	
Total	50						

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa

Nota: Benavides & Córdova, 2015.

Según la tabla 21, no se encontraron diferencias significativas en las variables porcentaje de callo, porcentaje de marchitez y color debido a que las tres variables presentan un $p > 0,05$.

Tabla 24. Promedios y pruebas de significancia para los porcentajes de las variables presencia de callo, marchitez y color en la fase de multiplicación de *Geranium chilloense*, evaluadas a los 30 días.

Trat	[BAP] (ppm)	[AIA] (ppm)	% Callo	% Marchitez	Color
T1	0	0	0 ± 0,12 a	11 ± 0,11 a	3,86 ± 0,09 a
T2	0	0,5	0 ± 0,12 a	0 ± 0,12 a	4,00 ± 0,09 ab
T3	0	1	13 ± 0,12 a	13 ± 0,12 a	4,00 ± 0,09 ab
T4	1	0	22 ± 0,12 a	11 ± 0,11 a	4,00 ± 0,08 ab
T5	1	0,5	22 ± 0,12 a	11 ± 0,11 a	4,15 ± 0,09 b
T6	1	1	25 ± 0,12 a	25 ± 0,12 a	4,00 ± 0,09 ab

*Medias con letras distintas presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

3.3.1.6 Porcentaje de callo

En el caso de callogénesis se pudo observar que el tratamiento T6 presentó un mayor porcentaje (25%), seguido de T4 y T5 que presentaron un 22%, mientras T3 presentó 13% y los tratamientos T1 y T2 presentaron ausencia de callo. Sin embargo, dentro de los tratamientos no hay diferencias significativas para esta variable.

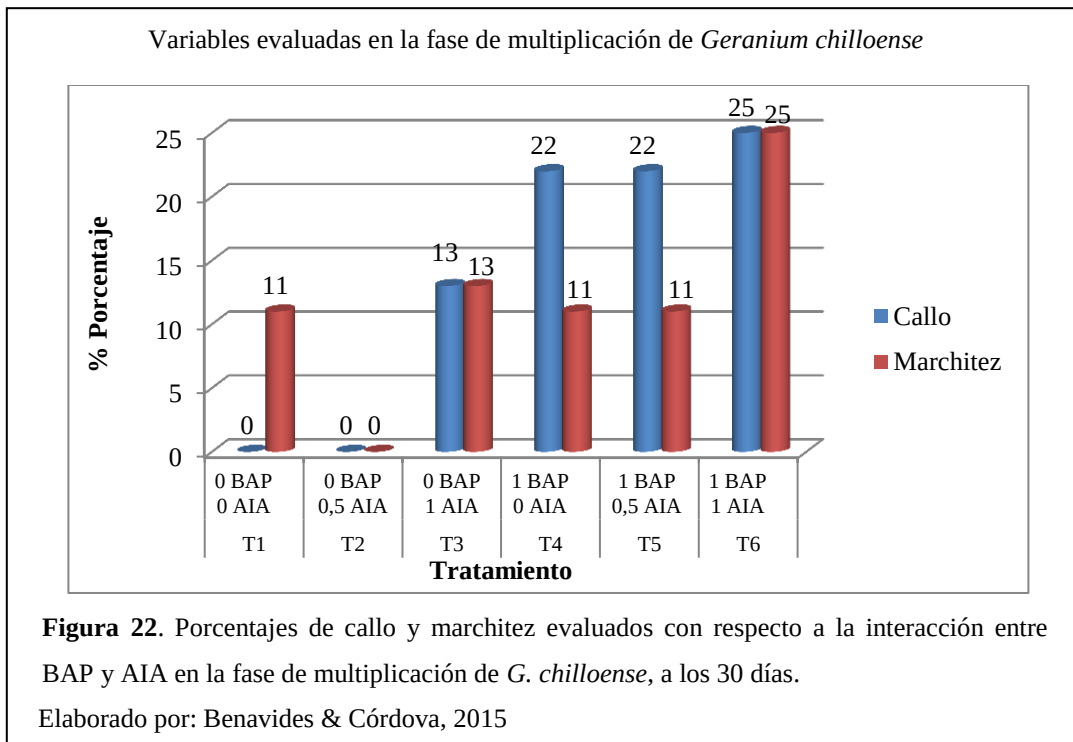
3.3.1.7 Porcentaje de marchitez

Mediante la prueba de Duncan se determinó que la variable porcentaje de marchitez, no presentó diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos. No obstante se enfatiza que el tratamiento T2, no presentó marchitez en sus explantes, mientras que el tratamiento T6 obtuvo el mayor porcentaje de marchitez con un 25%.

3.3.1.8 Color del explante

Los resultados de la tabla 22, no se encontraron diferencias significativas para los tratamientos. Los tratamientos T2 (4,00), T3 (4,00), T4 (4,00), T5 (4,15) y T6 (4,00) son los que presentaron color verde claro. Mientras que, T1 (3,86) presentó un valor más bajo entre amarillo y verde claro. Sin embargo cabe recalcar que la evaluación de la presente variable fue calificada con valores de 0 = blanco, 1 = café claro, 2 = café

oscuro, 3 = amarillo, 4 = verde claro y 5 = verde oscuro (Figura 6). Por lo tanto se debe tomar en cuenta que la mayoría de explantes presentaron un color de 3 y 4, motivo por el cual se obtuvieron los promedios mencionados de color.



De acuerdo a las figura 22 y 23, se recomienda como tratamiento al T2 (0,0 ppm BAP y 0,5 ppm AIA), puesto que no presentó presencia de callo y marchitez, y presenta un color más cercano a verde oscuro (4), lo cual favorece la continuidad de la investigación.

Ayala J. (2012, p. 34), explica que en ausencia de reguladores de crecimiento, muy pocos explantes forman callo, puesto que al usar un medio desprovisto de reguladores de crecimiento no presentó callo, mientras que al usar 0,5 mg de AIA y 1 mg de BAP obtuvo un 68% de callo, indica que los explantes jóvenes poseen gran cantidad de auxina endógena encargada de la formación de callo.

Marchitez y formación de callo, evaluados en la Fase de Multiplicación de *Geranium chilloense*

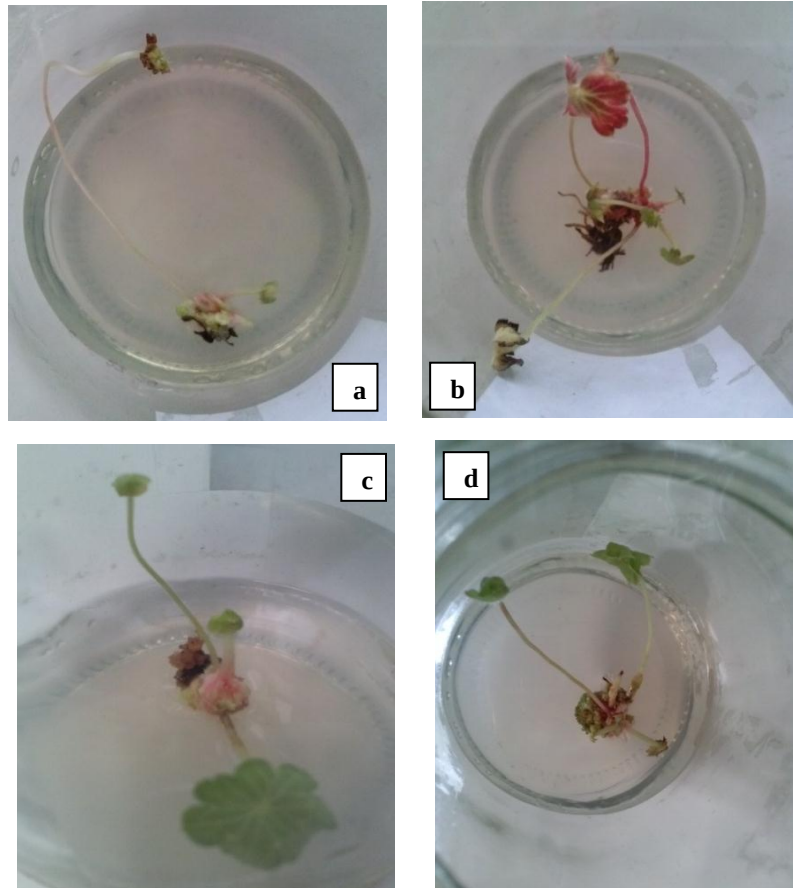


Figura 23. a) Marchitez T3; b) Marchitez T6; c) Presencia de Callo T4; d) Presencia de callo T6.

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015

3.4 Fase IV. Adaptación al sustrato de *Geranium chilloense*

En la fase de adaptación al sustrato se evaluó a partir de vitroplantas, obtenidas de la fase anterior, se evaluaron las variables promedio número de hojas, promedio de longitud, y los porcentajes de prendimiento y sobrevivencia, con respecto al sustrato utilizado, evaluados durante 30 días.

Tabla 25. ADEVA para el porcentaje de prendimiento, promedio número de hojas, promedio de longitud, color y porcentaje de sobrevivencia para la fase de adaptación al sustrato en *Geranium chilloense*.

		% Prendimiento		% Sobrevivencia		Número de hojas		Longitud (cm)		Color	
FV	GL	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
Trat	1	0,38	0,1802	0,21	0,3040	34,38	0,0843	23,93	0,1669	3,81	0,85
Error	40	0,20		0,20		10,97		12,07		4,49	
Total	41										

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa

Nota: Benavides & Córdova, 2015

Según la tabla 23, no se encontraron diferencias significativas para las variables evaluadas puesto que presentan valores de $p > 0,05$.

Tabla 26. Promedios y pruebas de significancia de las variables evaluadas en la fase de adaptación al sustrato de *Geranium chilloense*.

Trat	Sustrato	% Prendimiento	% Sobrevivencia	Número de hojas	Longitud (cm)	Color
T1	Fibra de Coco	62 a $\pm 0,10$	67 $\pm 0,10$ a	2,95 $\pm 0,72$ a	4,74 $\pm 0,76$ a	2,91 $\pm 0,64$ a
T2	Turba	81 a $\pm 0,10$	81 $\pm 0,10$ a	4,76 $\pm 0,72$ a	5,85 $\pm 0,76$ a	3,65 $\pm 0,48$ a

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

Nota: Benavides & Córdova, 2015.

3.4.1.1 Porcentaje de prendimiento

Se observó que la turba presentó el 81% de prendimiento, mientras que la fibra de coco presentó el 62% (Tabla 24). No obstante no existieron diferencias significativas entre los dos sustratos evaluados, mostrando que ambos pueden ser favorables para la fase de adaptación.

3.4.1.2 Porcentaje de sobrevivencia

Según la prueba de Duncan los dos tratamientos analizados no presentaron diferencias significativas con respecto a la variable sobrevivencia (Tabla 24). Sin embargo, el tratamiento T1 (fibra de coco) presenta un porcentaje del 67% inferior al presentado por el tratamiento T2 (turba) con un 81%.

3.4.1.3 Promedio número de hojas

Los datos estadísticos de la variable promedio de número de hojas obtenidas mediante la prueba de Duncan, no demuestran diferencias significativas. Sin embargo el tratamiento

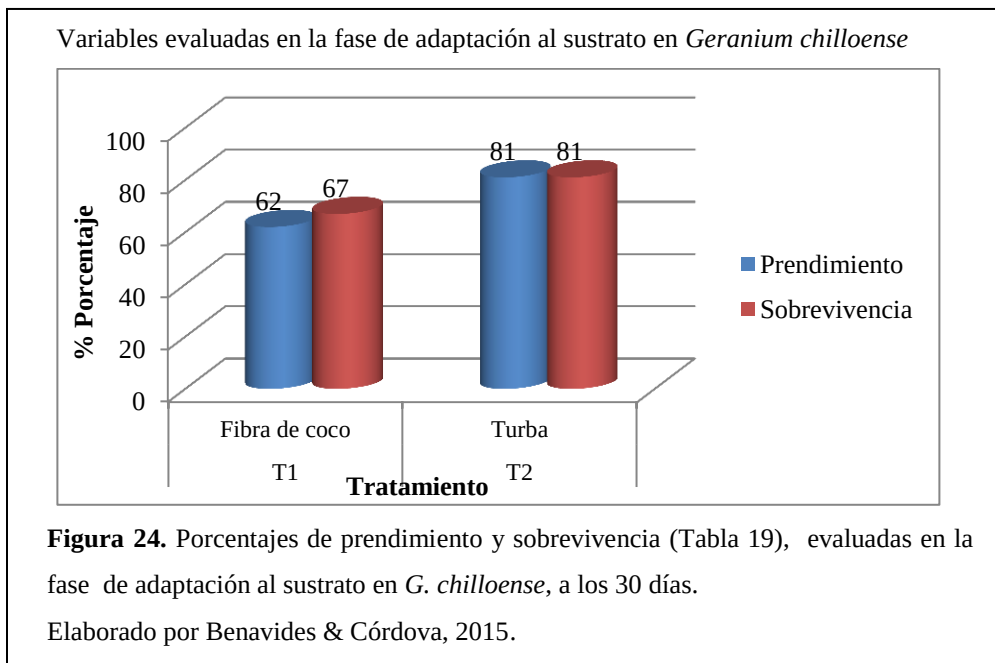
T2 (turba) obtuvo mayor promedio con 4,76, mientras que el tratamiento T1 (fibra de coco) obtuvo 2,95 (Tabla 24).

3.4.1.4 Promedio de longitud

T2 (Turba) presentó mayor promedio de longitud con un 5,85 cm, con respecto a T1 (Fibra de coco) el cual presentó un promedio inferior de 4,34 cm. Tomado como resultado favorable a la turba para la evaluación de la presente variable, a pesar de no presentar diferencias significativas.

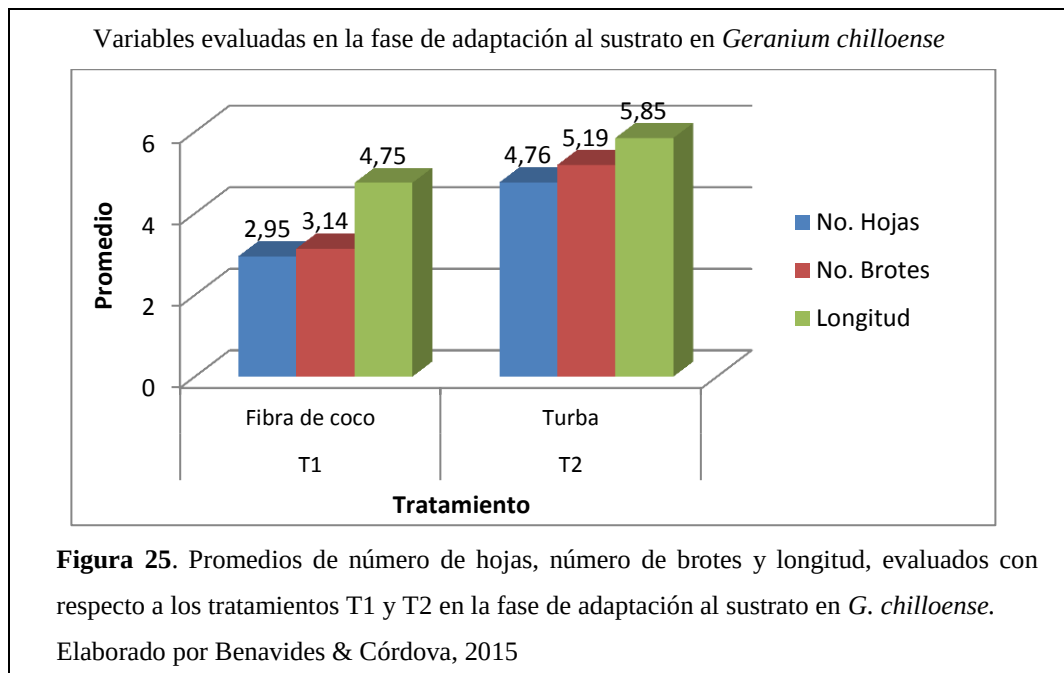
3.4.1.5 Color de la plántula

Referente a la variable color no se encontraron diferencias significativas, el tratamiento T2 (turba) para la fase de adaptación al sustrato, mostró un color más cercano al óptimo (5) de 3,65, mientras que, T1 (fibra de coco) presentó 2,91. Sin embargo cabe recalcar que la evaluación de la presente variable fue calificada con valores de 0 = blanco, 1 = café claro, 2 = café oscuro, 3 = amarillo, 4 = verde claro y 5 = verde oscuro (Figura 6).



Para la fase de adaptación al sustrato en *Geranium chilloense*, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas, se recomienda a la Turba (T2), ya que presentó mayores porcentajes de prendimiento y sobrevivencia (Figura 24), al igual que mejores

promedios para número de hojas, número de brotes y longitud (Figura 25), un color más cercano al óptimo en su follaje, frente a la Fibra de coco (T1) (Figura 26).



Rozo (2014, pág. 70), evaluó tres combinaciones de sustratos (suelo, cascarilla de arroz, arena y turba) en diferentes relaciones, obteniendo un mayor porcentaje de sobrevivencia (80%), debido al alto porcentaje de prendimiento, al combinar suelo+turba en una relación 1:1; Debió a que las plántulas tuvieron un porcentaje alto de prendimiento, en el mencionado sustratos.

González (2013, págs. 31-32), analizó dos sustratos (arena: turba y perlita: vermiculita) para las fases de pre-aclimatación y aclimatación en el invernadero, en plántulas de *Rosa canina*, obteniendo mayor tasa de sobrevivencia (51%) en el proceso de pre-aclimatación y en aclimatación en el invernadero, alcanzando el 95% de sobrevivencia con la mezcla turba:arena. Ginderdeuren (2009, págs. 25-26), estudió las variables número de hojas, número de raíces, altura y sobrevivencia en plántulas de *Chlorea virescens*, con tres tipos de sustratos turba+ perlita (1:1), turba+arena (1:1) y sphagnum, para la fase de aclimatación, evidenciando que el sustrato adecuado fue turba+perlita, obteniendo los mejores resultados en las variables mencionadas anteriormente. Explica que la turba, tiene mayor cantidad de nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio y azufre

disponible, comparativamente con otros sustratos, lo cual lo hace un sustrato favorable para la fase de aclimatación ya sea solo o en combinación.

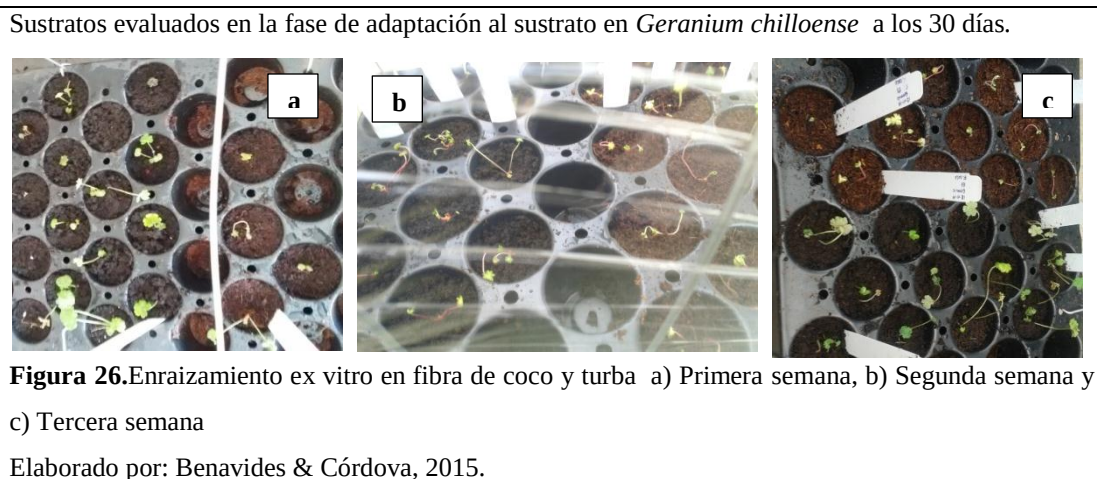


Tabla 27. ADEVA para porcentaje de marchitez, pudrición y promedio número de brotes en las fase de adaptación al sustrato de *Geranium chilloense*.

FV	GL	% Marchitez		% Pudrición		No. de brotes	
		CM	p	CM	p	CM	p
Trat	1	0,10	0,4809	0,02	0,3233	44,02	0,0600
Error	40	0,19		0,02		11,75	
Total	41						

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa

Nota: Benavides & Córdova, 2015

Según la tabla 25, no se encuentran diferencias significativas en la variable marchitez ($p=0,4809$), pudrimiento ($p=0,3233$) y sobrevivencia ($p=0,0600$), indicando que las variables analizadas en la tabla no son dependientes del sustrato utilizado en la Fase de adaptación.

Tabla 28. Promedios y pruebas de significancia para los porcentajes de marchitez y pudrimiento, el número de brotes evaluadas en la fase de adaptación al sustrato de *Geranium chilloense*, a los 30 días.

Trat.	Sustrato	% Marchitez	% Pudrimiento	Promedio No. de brotes
T1	Fibra de Coco	29 $\pm$ 0,09 a	5 $\pm$ 0,03 a	3,14 $\pm$ 0,75 a
T2	Turba	19 $\pm$ 0,09 a	0 $\pm$ 0,03 a	5,19 $\pm$ 0,75 a

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas ($p<0,05$)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

3.4.1.6 Porcentaje de marchitez

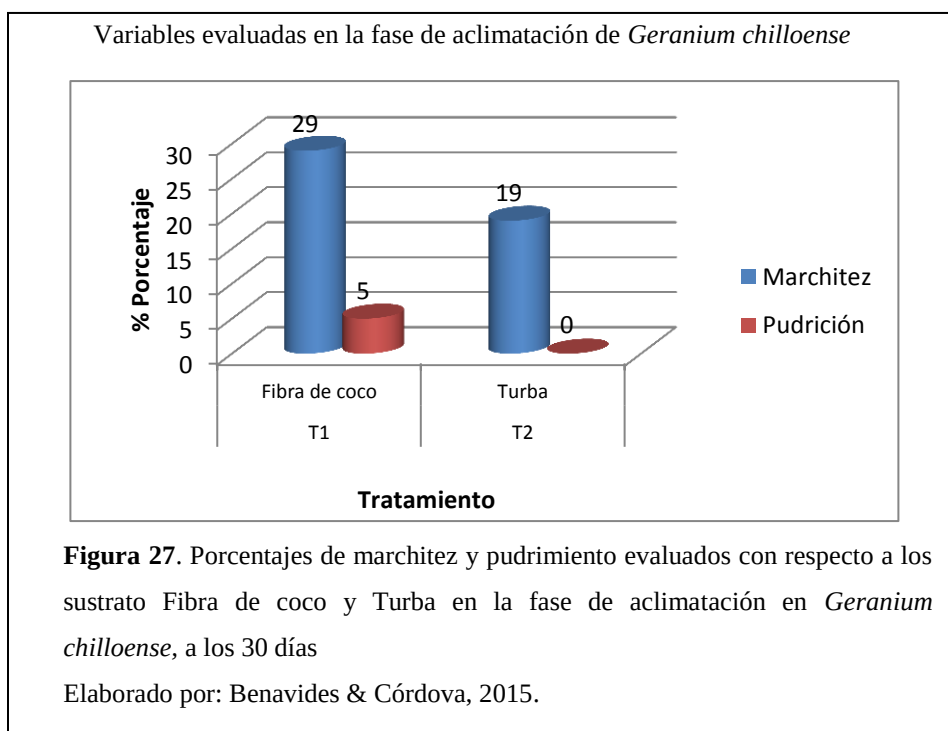
Delos dos tratamientos se estableció que la fibra de coco obtuvo mayor marchitez (29%), frente a la turba que presentó un 19%.

3.4.1.7 Porcentaje de pudrición

Al evaluar la relación de pudrimiento con respecto a los dos sustratos se determinó que la variable no presenta diferencias significativas. No obstante se evidencia que el tratamiento T1 (fibra de coco) presentó mayor porcentaje de pudrimiento (5%) frente al tratamiento T2 (turba) el cual presentó el 0% de afectación por la variable analizada.

3.4.1.8 Promedio número de brotes.

Con respecto al promedio del número de brotes, en turba se observó mayor valor (5,19), que el obtenido por la fibra de coco (3,14). Cabe recalcar que ambos sustratos para esta variable no presentaron diferencias significativas.



De acuerdo a la figura 27, respecto a los sustratos utilizados en la fase de adaptación, determinó que el tratamiento T2 (Turba), fue favorable, puesto que tiene menor incidencia de marchitez y pudrimiento en las plántulas de *Geranium chilloense*, pese a

que no se presentaron diferencias significativas. Esto puede deberse al hecho de que la turba, tiene un buen nivel de retención de agua y de aireación, lo cual permite la hidratación del explante pero no en exceso, evitando su pudrición. La turba al estar compuesta por carbono, oxígeno y nitrógeno constituye el sustrato por excelencia para soportar con alta viabilidad la flora microbiana Nuñez (2009, págs. 26-27).

3.5 *Lupinus pubescens*

FASE I. Protocolo de desinfección e introducción al medio de cultivo

En la fase I, se evaluaron los resultados en dos partes, en la primera se valoró los protocolos de desinfección para las variables contaminación bacteriana, contaminación fúngica, y sobrevivencia, mientras que en la segunda parte se evaluó la concentración de sales MS, para las variables germinación, presencia de raíces, cotiledones abiertos, número de hojas, longitud, color y sobrevivencia. Ambas partes de la fase I mencionadas anteriormente, se evaluaron a los 15 días.

3.5.1 Protocolo de desinfección de *Lupinus pubescens*

En la fase I, se evaluaron los tratamientos de desinfección para las variables contaminación bacteriana, contaminación fúngica y sobrevivencia, todas las variables fueron evaluadas a los 15 días.

Tabla 29. ADEVA para contaminación bacteriana y fúngica para el protocolo de desinfección de *Lupinus pubescens*.

FV	GL	% CB		% CF		% S	
		CM	p	CM	p	CM	p
Trat	2	1,16	0,0001	0,02	0,7414	2,11	0,0001
Error	249	0,08		0,05		0,11	
Total	251						

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa; CB=Contaminación bacteriana; CF= Contaminación fúngica; S= Sobrevivencia

Nota: Benavides & Córdova, 2015.

Según la Tabla 27, se encontraron diferencias significativas para las variables porcentaje de contaminación bacteriana y sobrevivencia; mientras que, para la variable porcentaje de contaminación fúngica no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 30. Promedios y pruebas de significancia para las variables porcentaje de contaminación bacteriana, fúngica y sobrevivencia, evaluadas en los tratamientos de desinfección de *Lupinus pubescens*, a los 15 días.

Trat	Solución 1		Solución 2			% C.B	% C.F	%S
	Alcohol		NaOCl		Tween			
	%	TI	%	TI				
P1	96	10seg	50 v/v	10 min	-	2 ± 0,03 a	5 ± 0,03 a	95±0,04b
P2	-	-	50 v/v	15 min	1 gota	5± 0,03 a	5 ± 0,03 a	67±0,04a
P3	70	1 min	20 v/v	20 min	1 gota	24 ±0,03b	7 ± 0,03 a	93±0,04b

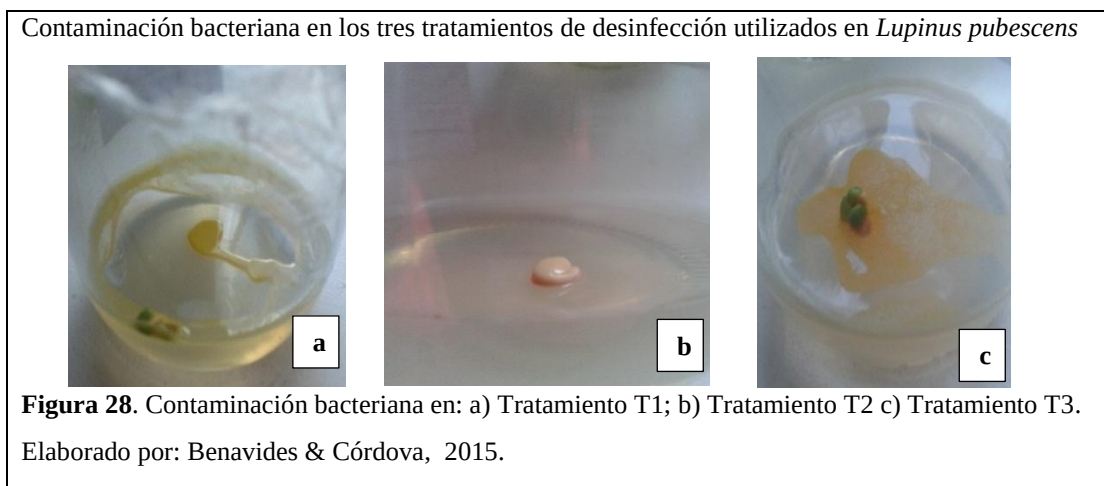
TI=Tiempo de inmersión; CB=Contaminación bacteriana; CF=Contaminación fúngica; S=Sobrevivencia

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas (p<0,05)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

3.5.1.1 Porcentaje de contaminación bacteriana

Se obtuvieron diferencias significativas para los tratamientos. El protocolo P3 presentó el 24% de contaminación, utilizando un 70 % de alcohol y un 20% de hipoclorito de sodio (1,2% p.a). Se observó que el protocolo P1 con el 50% de hipoclorito de sodio (3% p.a) y 96% de alcohol, obtuvo la menor contaminación con un 2%; seguido del protocolo P2 (hipoclorito de sodio al 50%, sin alcohol) con un 5% (Figura 28).



3.5.1.2 Contaminación fúngica

Para la variable porcentaje de contaminación fúngica no existieron diferencias significativas. Los porcentajes van en un rango de 5 a 7% lo que demuestra baja contaminación (Figura 29).

Contaminación fúngica en los tres tratamientos de desinfección utilizados en *Lupinus pubescens*

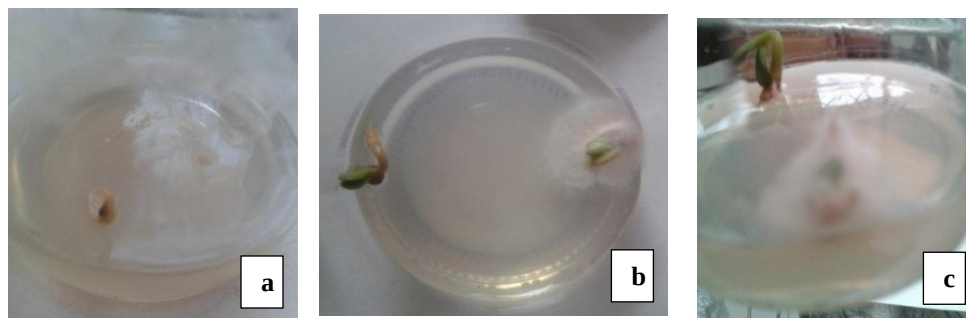


Figura 29.Contaminación fúngica en: a) Tratamiento P1; b) Tratamiento P2; c) Tratamiento P3

Elaborado por: Benavides & Córdova 2015

3.5.1.3 Sobrevivencia

En esta variable se presentaron diferencias significativas en cuanto a los tratamientos de desinfección, se determinó que el protocolo P1 fue el que obtuvo el mayor porcentaje de sobrevivencia con un 95%, seguido del protocolo P3 con un 93% y finalmente el protocolo P2 con el 67%.

3.5.1.4 Fenolización

Se evaluaron las variables de fenolización del medio de cultivo y fenolización del explante, ambas presentaron 0%, por lo que no representan variables significativas para el estudio

Variables evaluadas en la fase de desinfección de *Lupinus pubescens*

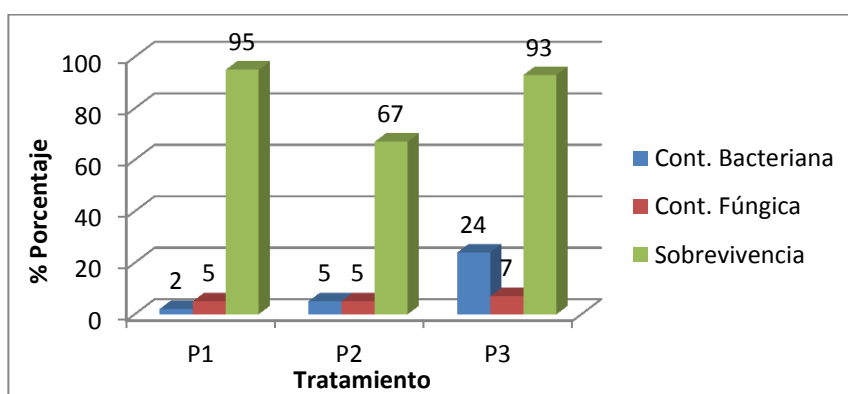


Figura 30. Porcentajes de contaminación bacteriana, fúngica y sobrevivencia con respecto a los protocolos de desinfección evaluados en la fase I en *Lupinus pubescens*, a los 15 días.

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015

Se escogió como protocolo óptimo de desinfección al tratamiento P1 (alcohol etílico al 96% durante 10 segundos, seguido de hipoclorito de sodio al 50% (3% p.a) durante 10 minutos), debido a que presentó el menor porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica y alto porcentaje de sobrevivencia (Figura 30).

Suárez, Jarma, & Avila (2006, págs. 55-56), evaluaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio (1%, 2%, 3%) y tres tiempos de inmersión (5, 10, 15 minutos) en yemas axilares de Roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC), siendo el tratamiento con 3% de hipoclorito de sodio y 10 minutos de exposición, el que permitió obtener el mayor porcentaje de explantes libres de contaminación (72%), resultados similares a los obtenidos en la presente investigación.

Albany, Vilchez, León de Sierralta, Molina, & Chacín (2006, págs. 213-222), estudiaron tres concentraciones (1%, 2%, 3%) de hipoclorito de sodio para la fase de desinfección en hijuelos de plantas jóvenes de Sábila (*Aloe vera* L.), determinando que a medida que aumentó la concentración de hipoclorito de sodio, disminuyó la incidencia de contaminación, obteniendo el 9,09% de contaminación al utilizar el 3% de hipoclorito de sodio; mientras que, hipoclorito al 1% incrementó la contaminación al 20%.

Arcos (2010, págs. 129-130), indica que los mejores tratamientos de desinfección estudiados en semillas de trigo (*Triticum aestivum*), son los que tuvieron una concentración de 2,5% de hipoclorito de sodio con 15 minutos de inmersión, previa inmersión en alcohol al 70% por 5 minutos (contaminación 5%), recalca que, a mayor tiempo de contacto de las semillas en hipoclorito de sodio, disminuye la sobrevivencia, indicando resultados favorables cuando hay exposición de 5, 10, 15 minutos.

Santamaría (2012, págs. 32-33), probó diferentes concentraciones de alcohol (30%, 70% y 90% v/v) por 30 segundos en embriones maduros de *Cedrela montana*, obteniendo bajos porcentajes de contaminación al usar el alcohol etílico al 90% y; explica que, el tiempo de inmersión no debe ser superior a 30 segundos, porque puede causar necrosis provocando la pérdida del material de estudio. Ruiz B., (2000, pág. 30), afirma que el alcohol no destruye todos los microorganismos, por ello es necesario tratar los tejidos

vegetales con una solución desinfectante, conteniendo hipoclorito de sodio como ingrediente activo después del tratamiento con alcohol.

3.5.2 Introducción al medio de cultivo MS

En la fase I, se evaluó la concentración de sales MS, para las variables germinación, sobrevivencia, presencia de raíces, número de hojas, longitud y color, a los 15 días de introducidos al medio.

Tabla 31. ADEVA para germinación, sobrevivencia, presencia de raíces, cotiledones abiertos, número de hojas, longitud y color en la fase de introducción al medio de cultivo MS.

FV	GL	% Germinación		% Sobrevivencia		% Presencia Raíces		% Cotiledones Abiertos		No. Hojas		Longitud		Color	
		CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
Trat	2	0,1	0,0451	0,49	0,021	0,19	0,0246	0,54	0,0482	0,19	0,5152	148,9	0,0001	0,21	0,3681
Error	184	0,04		0,13		0,05		0,18		0,28		7,27		0,21	
Total	213														

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa

Nota: Benavides & Córdova, 2015

Según la tabla 29, se encontraron diferencias significativas para las variables germinación, sobrevivencia, presencia de raíces, cotiledones abiertos y longitud; mientras que, para las variables número de hojas y color no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 32. Promedios y pruebas de significancia para las variables porcentaje de germinación, sobrevivencia, presencia de raíces y cotiledones abiertos y promedio de número de hojas, longitud y color evaluadas en la introducción al medio de cultivo en *Lupinus pubescens* a los 15 días.

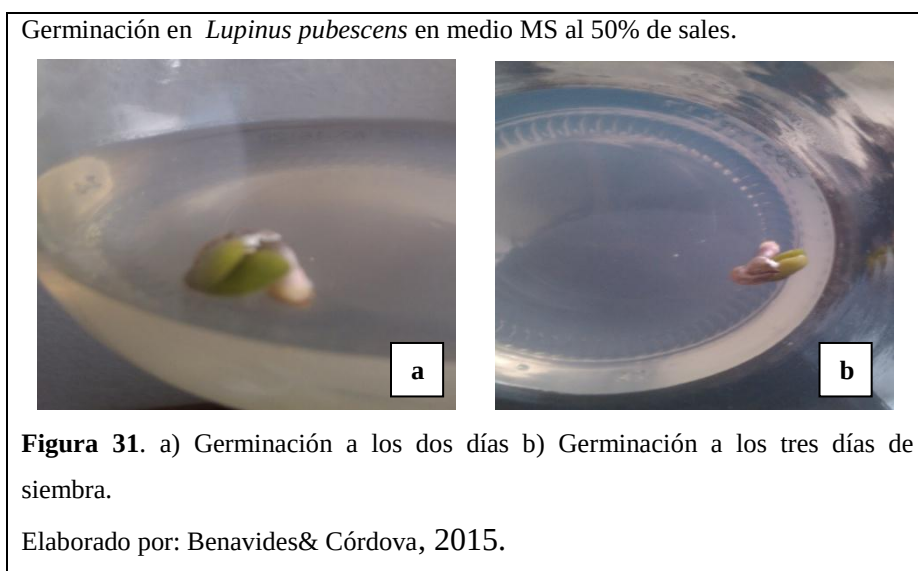
Trat	% sales MS	% Germinación	%Sobrevivencia	%Presencia Raíces	% Cotiledones abiertos	No. Hojas	Longitud	Color
T1	100	96 ±0,02 ab	90 ±0,04 b	94± 0,03 ab	78 ± 0,05 ab	0,22±0,06 a	6,54±0,31 b	4,99±0,05 a
T2	50	100 ±0,02 b	76 ±0,04 a	99 ± 0,03 b	86 ± 0,05 b	0,26±0,07 a	7,10± 0,34 b	4,91±0,06 a
T3	25	92 ±0,02 a	88 ±0,04 b	89 ± 0,03 a	68 ± 0,05 a	0,16±0,06 a	4,35± 0,32 a	4,88±0,06 a

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas (p<0,05)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

3.5.2.1 Porcentaje de germinación

En cuanto a la concentración de sales, para la variable porcentaje de germinación se encontraron dos grupos diferentes (Tabla 30); evidenciando como tratamiento óptimo al T2 (50% MS) con un 100% de germinación, seguido por T1 (100%MS) con un 96% y finalmente T3 (25% MS) con un 92%. Demostrando que altas y bajas concentraciones de sales MS no son adecuadas para el desarrollo inicial de *Lupinus pubescens* (Figura 31).



3.5.2.2 Porcentaje de sobrevivencia

De acuerdo a la tabla 30, se observó que el tratamiento T1 obtuvo el mayor porcentaje de sobrevivencia con un 90%, seguido del T3 con un 88%. El tratamiento obtuvo el menor porcentaje de sobrevivencia (76%), éste resultado se debe en gran parte a que el tratamiento T2, fue el que presentó una mayor contaminación bacteriana (Tabla 32).

3.5.2.3 Porcentaje presencia de raíces

Se realizó una prueba de Duncan para la variable presencia de raíces con respecto a la concentración de sales del medio MS, donde se demuestra la existencia de dos rangos diferentes. El mayor porcentaje de presencia de raíces se da en el T2 con un 99%, mientras que el tratamiento T1 presenta 94% seguido del tratamiento T3 con el 89% (Figura 32).

Presencia de raíces en *Lupinus pubescens* en MS al 50%

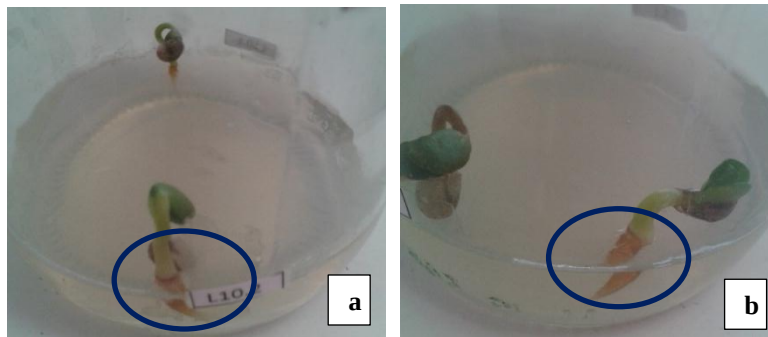


Figura 32. Presencia de raíces a los 6 días de evaluación.

Elaborado por: Benavides& Córdova, 2015.

3.5.2.4 Porcentaje de cotiledones abiertos

En la tabla 30 se observó, significancia en el tratamiento T3 que presentó 68%, mientras que el T2 presentó el 86%, seguido del T1 con un 78% (Figura 33).

Presencia de cotiledones abiertos y cerrados en el medio MS al 50%

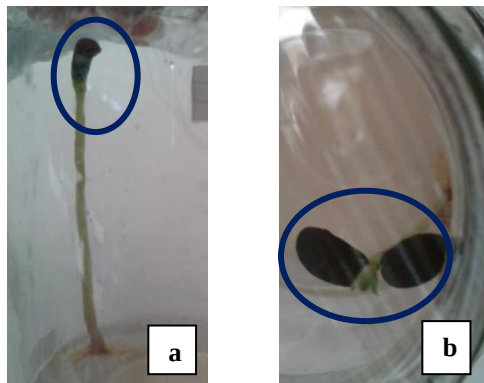


Figura 33. a) Cotiledón cerrado; b) Cotiledón abierto.

Elaborado por: Benavides& Córdova, 2015.

3.5.2.5 Promedio número de hojas

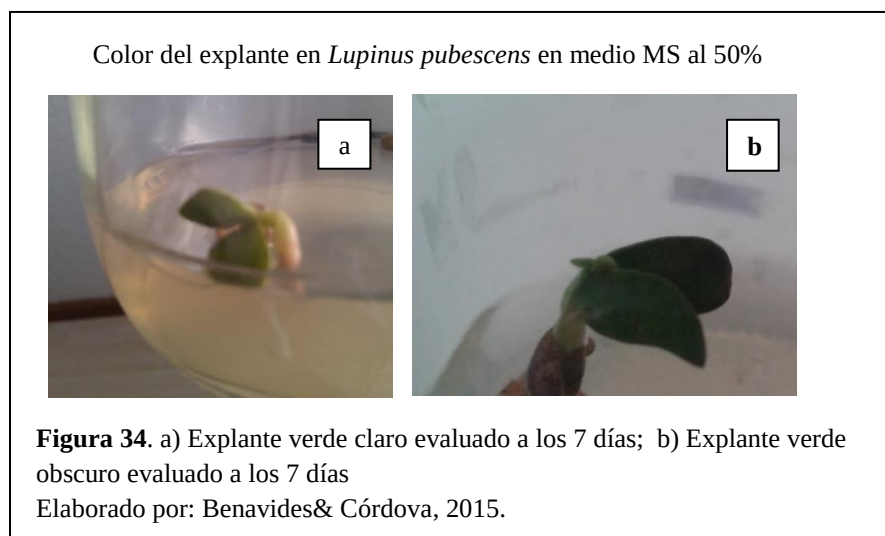
La evaluación de la variable número de hojas mediante la prueba de Duncan (Tabla 30), no presenta diferencias significativas. Sin embargo, el tratamiento T2 presenta el mayor promedio con un 0,26; T1 con un 0,22 y el menor promedio fue T3 con el 0,16.

3.5.2.6 Promedio de longitud

La prueba de Duncan para la variable longitud diferenció dos rangos (Tabla 30). El primer rango lo presentó T2 con 7,10 cm; seguido del T1 con el 6,54 cm y finalmente el T3 con un 4,35 cm. Evidenciando a T2 (MS 50%) como medio favorable para la presente variable.

3.5.2.7 Color del explante

En la tabla 30, se determinó que no existen diferencias significativas para la variable color. Todos los tratamientos presentaron color verde oscuro en la mayoría de sus explantes (Figura 34); obteniendo mayoritariamente el color verde oscuro en T1 (4,99), seguido por T2 (4,91) y finalmente T3 (4,88) (Figura 6).



Variables evaluadas en la fase de introducción al medio de cultivo de *Lupinus pubescens*

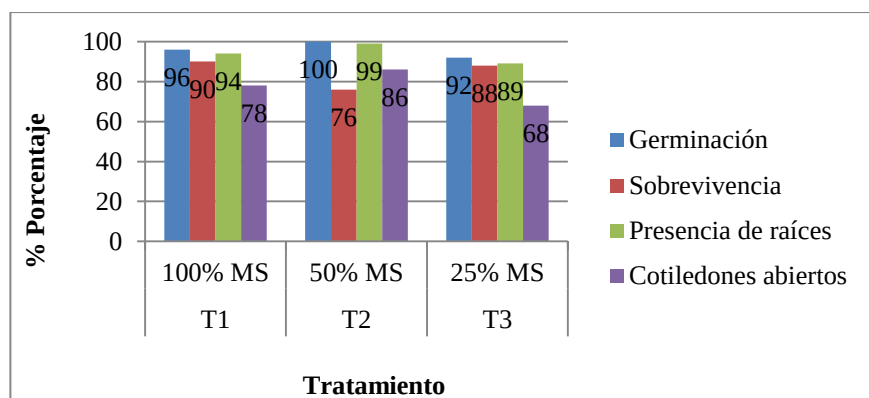


Figura 35. Porcentajes evaluados para las variables germinación, presencia de raíces, cotiledones abiertos y sobrevivencia en la fase de introducción al medio de cultivo en *Lupinus pubescens* a los 15 días.

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015.

Para la fase de introducción al medio de cultivo de *Lupinus pubescens* se tomó como concentración óptima el 50% de sales MS presentes en el tratamiento T2 (Figura 35 y 36), pese a que este tratamiento obtuvo el menor porcentaje de sobrevivencia debido a que la contaminación bacteriana fue más pronunciada (Tabla 32), fue escogido por presentar los mayores valores de porcentaje de germinación, presencia de raíces y cotiledones abiertos; al igual que, altos promedios en número de hojas y longitud, frente a los demás tratamientos (Figura 37).

Variables evaluadas en la fase de introducción al medio de cultivo en *Lupinus pubescens*

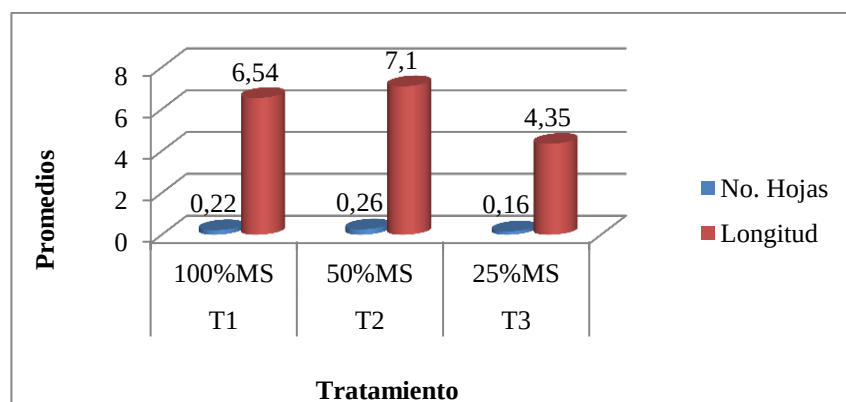


Figura 36. Evaluación de los promedios en las variables número de hojas y longitud (cm) con respecto a la concentración de sales MS utilizadas en la fase de introducción al medio de cultivo en *Lupinus pubescens* a los 15 días.

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015.

Cárdenas (2011, pág. 110), evaluó MSVG y MSVG/2 en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de quishuar (*Buddlejaincana*), en cuanto a la longitud de brote obtuvo mejor promedio con MSVG/2 (11,03mm) en comparación con el MSVG normal, indicando que la reducción de sales inorgánicas en el medio de cultivo favorece el crecimiento vegetativo de los explantes.

Billard, Dalzotto, & Lallana, (2013, pág. 10), durante la fase de introducción de las semillas de *Bletilla striata* (Thunb) ensayaron en dos medios de cultivo (agua destilada y MS/2) para la valoración del porcentaje de germinación y longitud, obteniendo mayores resultados en el ensayo 50% de sales MS, con un 100% de germinación y con el mayor promedio de longitud (12,9 mm).

Cruz, Brenes, Abdelonour, & Alvarenga (2011, págs. 19-29), valoraron concentraciones de sales MS (100 y 50%), con diferentes concentraciones de sacarosa (30, 40,60 g/L) y manitol (40 y 60g/L) en microestacas de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) evaluando longitud, sobrevivencia, presencia de raíces y oxidación. Obteniendo 3,1 cm de altura; 1,3% de oxidación y 98,5% de sobrevivencia en el medio MS a la mitad de su concentración de sales y 30 g de sacarosa. Indicando que esta concentración permite el rápido crecimiento longitudinal y desarrollo de raíces al igual que altos porcentajes de sobrevivencia.

Thomas y Ravindra (1997) citado por Ayala A. (2011, pág. 120), indican que se observó menos exudación de fenoles en el medio de cultivo Murashige y Skoog, MS (1962) a mitad de su concentración en sales por lo que tuvieron explantes con mejor coloración y mayor sobrevivencia de explantes.

Chung & Basilio (1998, pág. 68), probaron tres diluciones del medio basal MS (100%, 50% y 25%) en explantes de *Sáliz spp*, dónde se mostró un mejor desarrollo de explantes en cuanto a elongación y enraizamiento al utilizar la concentración del 50%

Introducción al medio de cultivo, tratamientos T2 y T3 en *Lupinus pubescens*

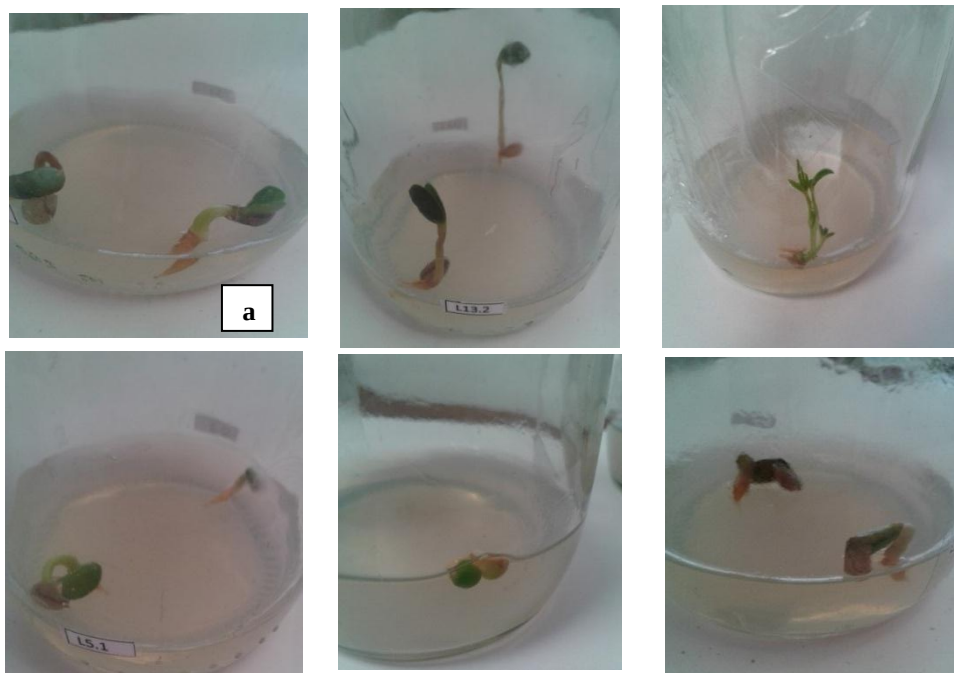


Figura 37.Explantos en sales MS al 50% a) Desinfectado con el protocolo P1, b) Desinfectado con el protocolo P2, y c) Desinfectado con el protocolo P3, Explantes en sales MS al 25% d) Desinfectado con el protocolo P1, e) Desinfectado con el protocolo P2 y f) Desinfectado con el protocolo P3.

Elaborado por: Benavides& Córdova, 2015.

Tabla 33.ADEVA para contaminación bacteriana y contaminación fúngica en relación con MS sigma

FV	GL	%Contaminación Bacteriana		%Contaminación fúngica	
		CM	p	CM	p
Trat	2	0,49	0,00047	0,02	0,7414
Error	249	0,9		0,05	
Total	251				

GL=Grados de libertad; **CM**= Media cuadrática; **p**= valor de alfa

Nota: Benavides & Córdova, 2015

Según la tabla 31, se encontraron diferencias significativas para la variable contaminación bacteriana; mientras que, para la variable contaminación fúngica no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 34. Promedios y pruebas de significancia de los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica relacionado con la concentración de sales MS a los 15 días de evaluación.

Trat.	% Sales MS	% Contaminación Bacteriana	% Contaminación fúngica
T1	100	5 ± 0,02 a	7 ± 0,01 a
T2	50	19 ± 0,02 b	5 ± 0,01 a
T3	25	7 ± 0,02 a	5 ± 0,01 a

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

3.5.2.8 Porcentaje de contaminación bacteriana

Para conocer el comportamiento de esta variable con respecto a las diferentes concentraciones de sales MS el resultado determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa, siendo el tratamiento T2 el que presentó la media más alta de contaminación con el 19%, seguida por el tratamiento T3 con un 7% y el T1 con un 5% .

3.5.2.9 Porcentaje de contaminación fúngica

En esta variable se puede observar que los tratamientos no presentan diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, los tratamientos T2 y T3 presentaron un 5% de contaminación fúngica inferior a T1 que presentó un 7 %.

Cárdenas (2011, pág. 110), en su evaluación en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de quishuar (*Buddleja incana*), a partir de yemas axilares, en dos medios de cultivo (MSVG y MSVG/2), evidenció que el menor porcentaje de contaminación lo obtuvo MSVG (6,63%), mientras que, MSVG/2 obtuvo (9,91%), deduciendo así que la adición completa de sales inorgánicas en el medio de cultivo disminuye los índices de contaminación similar a lo obtenido con el presente estudio en *Lupinus pubescens*.

3.6 FASE II. Interacción entre AIA y BAP evaluados en la fase de multiplicación *in vitro* de *Lupinus pubescens*

Para la etapa de multiplicación *in vitro*, se utilizaron los explantes provenientes de la fase anterior (Fase I: Desinfección e introducción al medio de cultivo). Se evaluaron los promedios de las variables índice de multiplicación, número de hojas totales, longitud del explante, color y el porcentaje de sobrevivencia, con respecto a la interacción entre BAP y AIA, en tres diferentes concentraciones (0; 0,5 y 1 ppm), durante 30 días.

Tabla 35. ADEVA para índice de multiplicación, promedio de número de hojas, longitud, color y porcentaje de sobrevivencia en la fase de multiplicación de *Lupinus pubescens*.

FV	GL	Índice de multiplicación		Promedio No. Hojas		Longitud		Color		% Sobrevivencia	
		CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
Trat	5	15,22	0,0001	15,02	0,0001	34,13	0,036	1,06	00007	0,04	0,8467
Error	199	0,51		2,79		14,03		0,23		0,09	
Total	204										

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa.

Nota: Benavides & Córdova, 2015

Según la tabla 33, se encontraron diferencias significativas en las variables índice de multiplicación, promedio del número de hojas, longitud y color; mientras que, la variable sobrevivencia no presentó diferencias significativas.

Tabla 36. Promedio y pruebas de significancia para índice de multiplicación, número de hojas, longitud, color y sobrevivencia, en la fase de multiplicación de *Lupinus pubescens* a los 30 días.

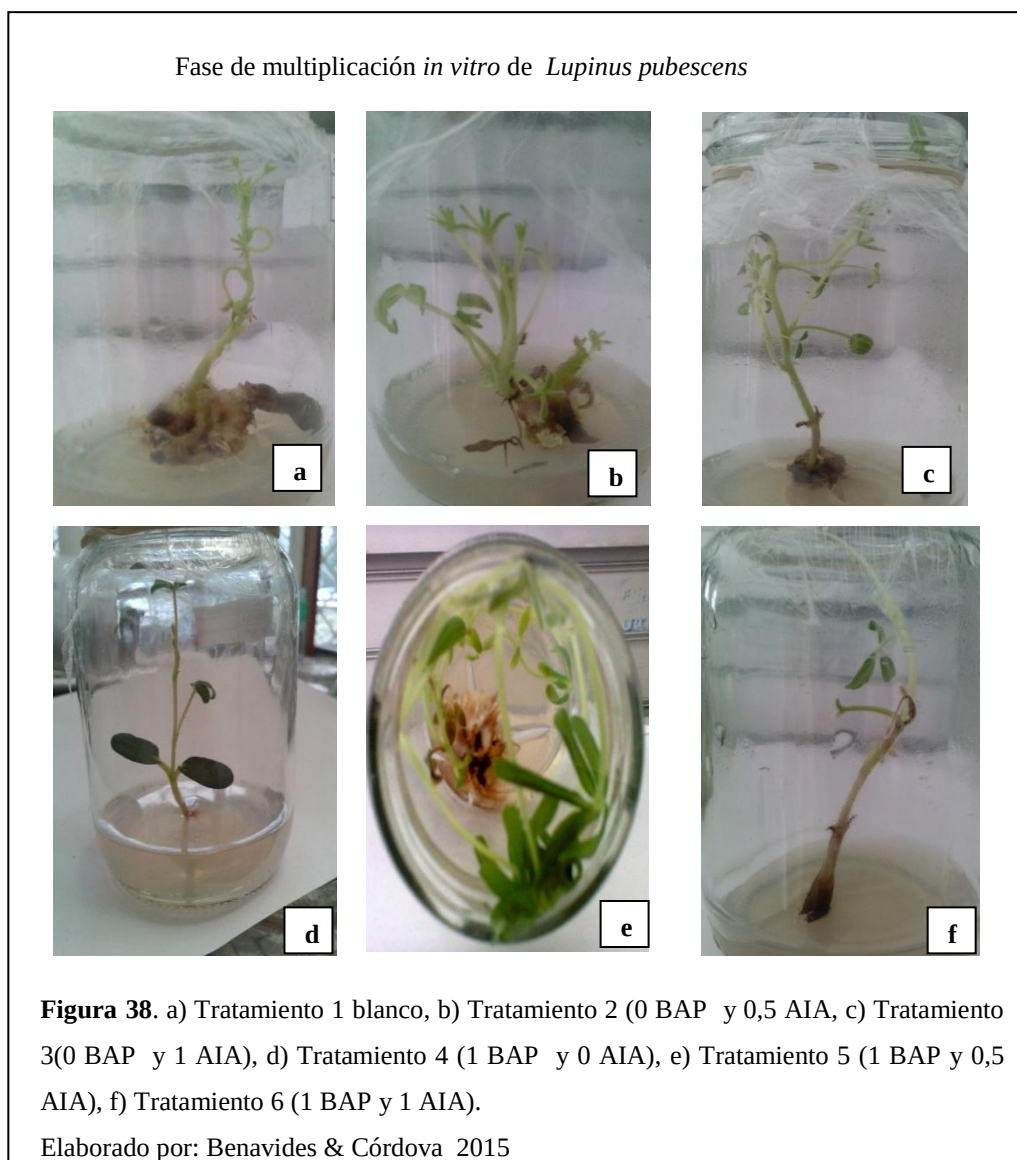
Trat	[BAP] (ppm)	[AIA] (ppm)	Índice de multiplicación (IM)	No. hojas	Longitud (cm)	Color	% Sobrevivencia
T1	0	0	1,99 ±0,11 b	2,26 ±0,26 abc	8,20 ± 0,58 ab	4,51±0,08 bc	88 ± 0,05 a
T2	0	0,5	2,71 ±0,13 c	3 ± 0,30 cd	7,78 ± 0,67 ab	4,71±0,09 c	90 ±0,05 a
T3	0	1	2,14 ± 0,11 b	2,43 ±0,25 bc	8,92 ± 0,56 b	4,31±0,08 ab	89 ± 0,05 a
T4	1	0	1,58 ±0,13 a	1,83±0,31 ab	6,53 ±0,70 a	4,36±0,10 ab	86 ± 0,06 a
T5	1	0,5	3,22 ±0,13 d	3,34 ±0,31 d	6,52 ±0,70 a	4,18±0,09 a	97 ± 0,06 a
T6	1	1	1,29 ±0,13 a	1,43 ± 0,30 a	6,99 ±0,68 ab	4,30±0,09 ab	90 ±0,06 a

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas (p<0,05)

Nota: Benavides & Córdova, 2015.

3.6.1.1 Índice de multiplicación

Para analizar la interacción óptima entre las diferentes concentraciones de BAP y AIA con respecto al índice de multiplicación, se empleó la prueba de Duncan, donde se observó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Figura 34). Se diferenciaron cuatro rangos, siendo el mejor el tratamiento T5 con un promedio de 3,22, seguido de T2 con 2,71; T3 con 2,14; T1 con 1,99; T4 con 1,58 y finalmente T6 con 1,29. Por lo tanto, se puede evidenciar que la interacción óptima para la variable de índice de multiplicación de AIA:BAP es de 0,5:1 ppm, evaluada en el tratamiento T5.



3.6.1.2 Promedio número de hojas

Se observa que el tratamiento T5 (1 ppm de BAP y 0,5 ppm de AIA) presentó un promedio de 3,34 al generar un mayor número de hojas por explante; mientras que T6 (1 ppm de BAP y 1 ppm de AIA) con una media de 1,43 generó la menor cantidad de hojas por explante.

3.6.1.3 Promedio de longitud

La tabla 34, señala que existen dos rangos para la variable longitud en relación a la concentración optima de BAP y AIA, obteniendo una mayor longitud por explante con el tratamiento T3 (8,92 cm), seguido de T1 (8,20 cm), T2 (7,78 cm), T6 (6,99 cm), T4 (6,53 cm), y T5 (6,52 cm), demostrando que la ausencia de BAP favorece el crecimiento en longitud del explante.

3.6.1.4 Color del explante

En la tabla 34, se determinó que existen diferencias significativas para la variable color. Siendo el tratamiento T1 (4,51) y T2 (4,71) los que presentaron color verde oscuro. Mientras que, T3 (4,31), T4 (4,36), T5 (4,18) y T6 (4,30) presentaron color verde claro.

3.6.1.5 Porcentaje de sobrevivencia

La interacción del tratamiento T2 mostró mayor porcentaje de sobrevivencia (97%), mientras que el tratamiento T4 (86%) presentó el menor porcentaje de sobrevivencia, dentro de los seis tratamientos evaluados en la Fase II. Sin embargo, no presentaron diferencias significativas.

Variables evaluadas en la fase de multiplicación de *Lupinus pubescens*

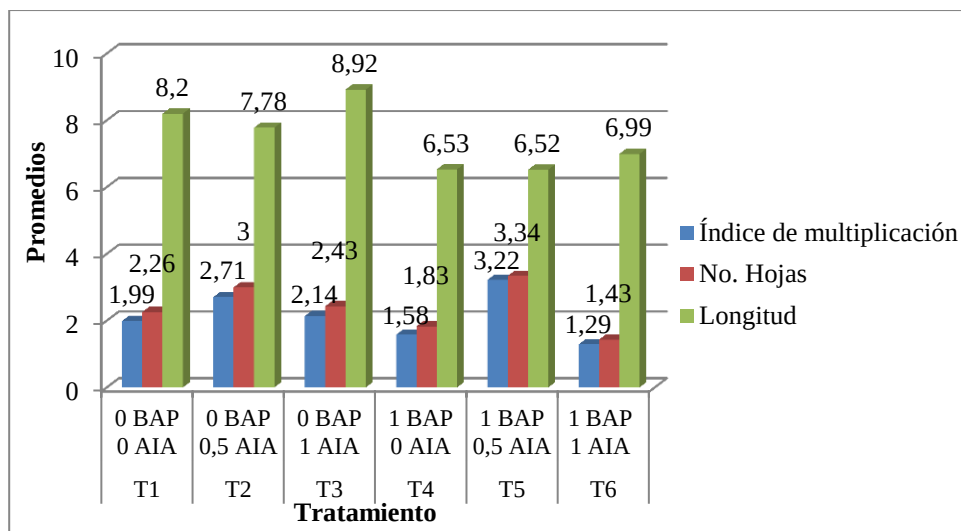


Figura 39. Promedios de índice de multiplicación, número de hojas, longitud y color evaluadas en la fase de multiplicación *in vitro* con respecto a las diferentes concentraciones de BAP y AIA en *Lupinus pubescens* a los 30 días.

Elaborado por: Benavides& Córdoba, 2015.

De acuerdo a la tabla 34 y a la figura 39, se determinó como tratamiento óptimo a la interacción de BAP (1ppm) y AIA (0,5 ppm) presentes en el tratamiento T5, el cual presentó mayor índice de multiplicación, promedio de número de hojas, al igual que un alto porcentaje de sobrevivencia de entre los tratamientos utilizados en la fase de multiplicación de *Lupinus pubescens*.

Los resultados del presente estudio se asemejan con Roza (2014, págs. 55-56), que al usar una interacción de 1,5 de BAP y 0,5 de AIA en explantes de *Acacia mangium*, mostró mayores resultados para las variables índice de multiplicación con 3 a 6 brotes por explante, mayor número de hojas, apariencia vigorosa y coloración verde intensa.

Lozada (2010, p.89), en la fase de multiplicación en *Solanum batacea* obtuvo el mejor resultado para la generación de brotes al utilizar 2mg/Lde BAP y 0,5mg/L AIA, afirmando que la interacción hormonal BAP:AIA estimula tanto la división como la elongación celular, obteniendo la formación de yemas y la diferenciación de brotes.

Peña (2009, pp. 170-171), en la fase de multiplicación *in vitro* de *Jatropha curcas* establece que se puede lograr un buen porcentaje de inducción de brotes al utilizar concentraciones de BAP que van de 0,5 a 1 mg/L, en su estudio obtuvo un 63,33% de brotes en yemas de piñón (*Jatropha curcas*), e indica que concentraciones muy altas o nulas de BAP no favorecen la inducción brotes.

Ayala A. (2011, pág. 120), indica que concentraciones de 0,5 a 1 mg/ L de BAP usados en la fase de multiplicación de yemas axilares de *Schinus molle*, fueron óptimas para obtener el mayor promedio de nuevos brotes y longitud; mientras que, concentraciones menores o mayores a las indicadas causan disminución en las variables mencionadas. Contrario a lo encontrado por Recalde (2007, pág. 67), que indica que al usar 2ppm de BAP combinado con 0,1 ppm de ANA logró triplicar la respuesta de brotación, explicando que a medida que aumentaba la concentración de la citoquinina aumentaba el número de brotes, sin embargo también recalca que el tamaño de los explantes disminuía.

Tabla 37. ADEVA para presencia de callo, presencia de raíces y fenolización del explante en la fase de multiplicación de *Lupinus pubescens*

FV	GL	% Callo		% Raíces		% Fenolización explante	
		CM	p	CM	p	CM	p
Trat	5	2,20	0,0001	2,20	<0,0001	0,06	0,5867
Error	199	0,2		0,17		0,08	
Total	204						

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa

Nota: Benavides & Córdova, 2015

Según la tabla 35, se encontraron diferencias significativas en las variables presencia de callo y raíces; mientras que, la variable fenolización al explante no presentó diferencias significativas.

Tabla 38. Promedios y pruebas de significancia para las variables porcentaje de callo, presencia de raíces y fenolización del explante con respecto a las diferentes interacciones entre BAP y AIA en *Lupinus pubescens* a los 30 días.

Trat	[BAP] (ppm)	[AIA] (ppm)	% Callo	% Raíces	% Fenolización del explante
T1	0	0	31±0,07 ab	57 ± 0,06c	12 ± 0,04 a
T2	0	0,5	23± 0,08 a	65 ± 0,07 c	6 ± 0,05 a
T3	0	1	52± 0,07 b	36 ± 0,06 b	9 ± 0,04 a
T4	1	0	79± 0,08 c	7 ± 0,08 a	10 ± 0,05 a
T5	1	0,5	79± 0,08 c	7 ± 0,08 a	0 ± 0,05 a
T6	1	1	80± 0,08 c	10 ± 0,08 a	10 ± 0,05 a

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas ($p < 0,05$)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

3.6.1.6 Porcentaje de callo

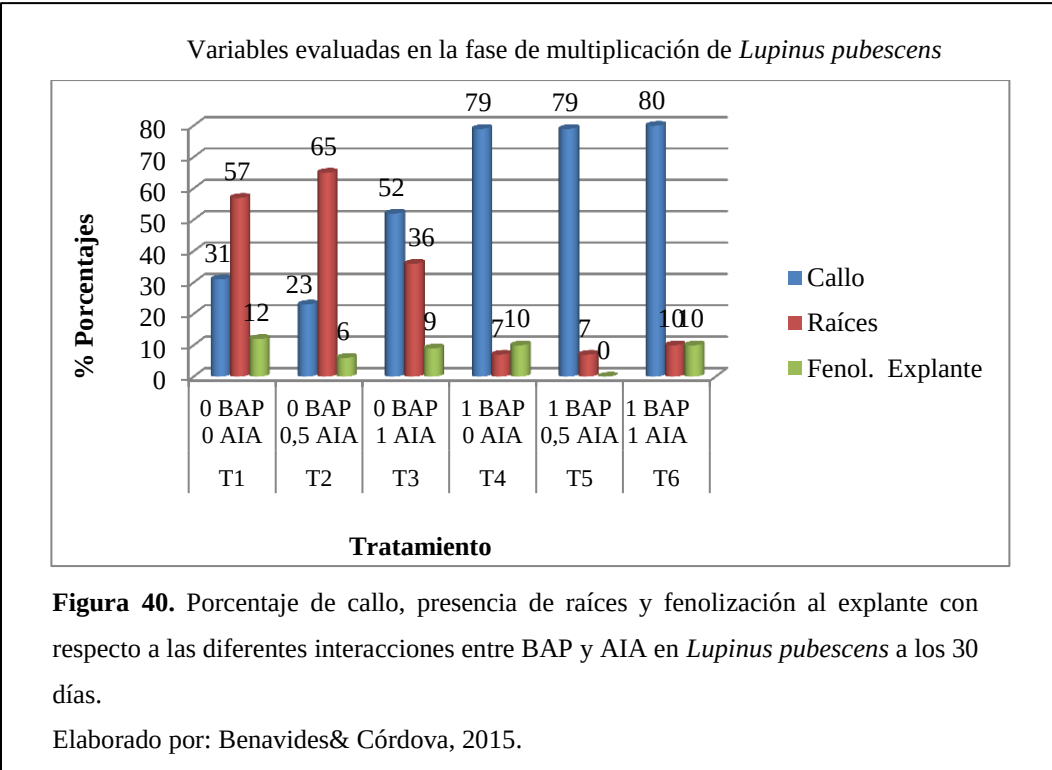
El tratamiento T2 es el que presentó menor formación de callo (23%) seguido del tratamiento T1 (31%), el T3 (52) y T4 y T5 con un valor del 79% y finalmente se encuentra el tratamiento T6 con el 80% (Figura 40).

3.6.1.7 Porcentaje de raíces

Para el porcentaje de raíces (Tabla 36) se pueden distinguir tres grupos. Siendo el tratamiento T2 el que presenta mayor porcentaje de raíces (65%), seguido del tratamiento T1 (57%), T3 (36%) y T6 (10%) y finalmente T4 y T5 con 7%. Se puede mencionar que los explantes que presentaron mayor número de raíces generaron menor callogénesis (Figura 40).

3.6.1.8 Fenolización del explante

En la tabla 36, se observa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, ya que todos pertenecen al mismo grupo y sus medias poseen valores aproximados (Figura 40).



Recalde (2007, pág. 67), resalta que mientras menor sea la concentración de BAP que tenga el medio de cultivo mayor presencia de raíces se manifestará, como se observa en la figura 40, los tratamientos T1, T2 y T3 con ausencia de BAP, presentan los mayores porcentajes de enraizamiento.

Peña (2009, págs. 170-171), señala que a mayor concentración de BAP utilizada en el medio, los explantes presentaron una mayor formación de callo. Lo cual concuerda con Lee, et al. (2007, pág. 65), señalando que en la regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii* al utilizar 2mg/L ANA, 2mg/L AIA y 2mg/L BAP se logró un mayor índice de multiplicación de los callos embriogénicos en el medio de cultivo MS (Figura 40).

Katil & García (2011, pág. 350), evaluaron tres concentraciones de reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación *in vitro*: 1 mg/L BAP:0,5 mg/L AG3 y 1 mg/L BAP:0,5 mg/L AIA, en su estudio a partir de ápices meristemáticos de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) obteniendo una fenolización baja en la interacción BAP:AIA (6,6%), mientras que, en la interacción BAP:AG3 la fenolización fue mayor (16,6%).

3.7 FASE III. Enraizamiento *in vitro* de *Lupinus pubescens*

Para esta etapa los explantes obtenidos de la fase de multiplicación fueron cultivados en medio de enraizamiento. Se evaluaron los promedios de las variables, número de hojas, longitud del explante y los porcentajes enraizamiento, callogénesis y sobrevivencia con respecto a la interacción ANA y CA en dos concentraciones (Tabla 38), a los 21 días de evaluación.

Tabla 39. ADEVA para enraizamiento, sobrevivencia, callogénesis, número de hojas, longitud y color mediante la evaluación de un medio con carbón activado combinado con ANA en *Lupinus pubescens*.

FV	GL	% Enraizamiento		% Sobrevivencia		% Callogénesis		No. Hojas		Longitud		Color	
		CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
Trat	1	3,05	0,0004	1,05	0,00084	3,53	0,001	14,32	0,0811	32,11	0,1208	0,04	0,4706
Error	179	0,24		0,15		0,17		4,65		13,22		0,08	
Total	180												

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa

Nota: Benavides & Córdova, 2015

Según la tabla 37, se encontraron diferencias significativas en las variables porcentaje de enraizamiento, sobrevivencia y callogénesis, mientras que las variables número de hojas, longitud y color no presentaron diferencias significativas.

Tabla 40. Promedios y pruebas de significancia para porcentaje de enraizamiento, sobrevivencia y callogénesis, promedios de número de hojas, longitud mediante la evaluación de carbón activado combinado con ANA en *Lupinus pubescens* a los 21 días.

Trat	ANA (ppm)	CA (ppm)	% Enraizamiento	% Sobrevivencia	% Callogénesis	No. Hojas	Longitud (cm)	Color
T1	0	0	38 ± 0,05 a	74 ± 0,04 a	12 ± 0,04 a	2,19±0,23 a	5,11 ± 0,38 a	4,03±0,03 a
T2	1	1000	64 ± 0,05 b	89 ± 0,04 b	40 ± 0,04 b	1,73±0,23 a	5,96 ± 0,38a	4,06±0,04a

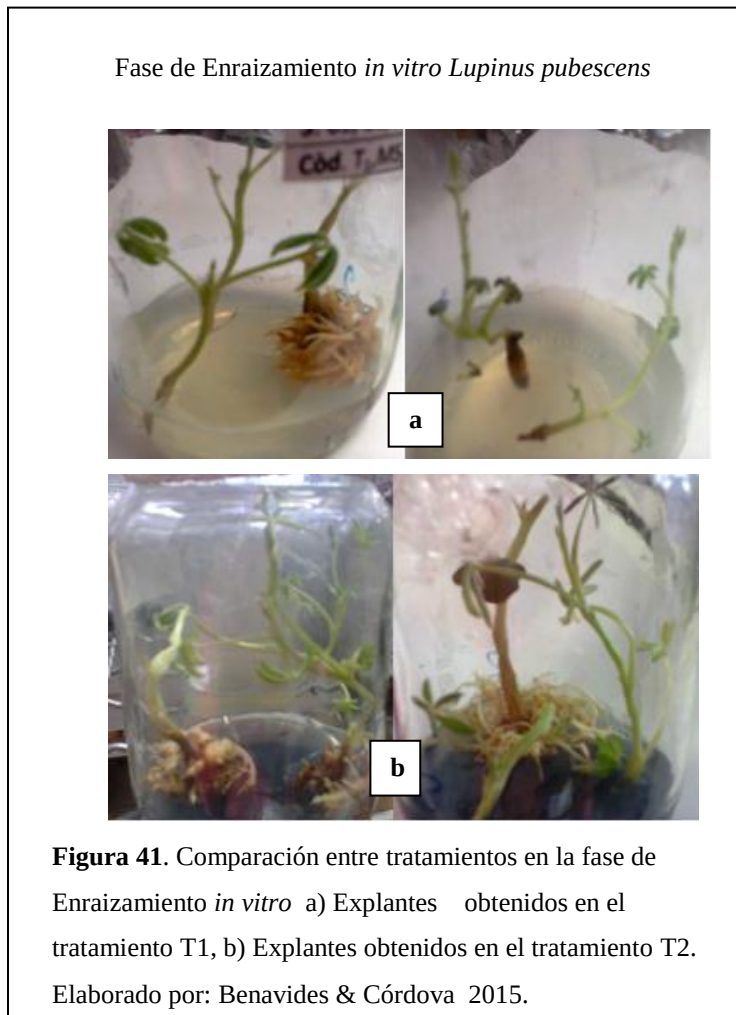
Medias con letras distintas presentan diferencias significativas (p<0,05)

Nota: Benavides & Córdova, 2015

3.7.1.1 Porcentaje de enraizamiento

En la tabla 38, se puede apreciar que la mayor cantidad de raíces se obtuvo en el tratamiento T2 (ANA 1 ppm + CA 1000 ppm) con un 64%, mientras que la menor

cantidad la obtuvo el tratamiento T1 (Testigo) con un 38%, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Figura 41 y 42).

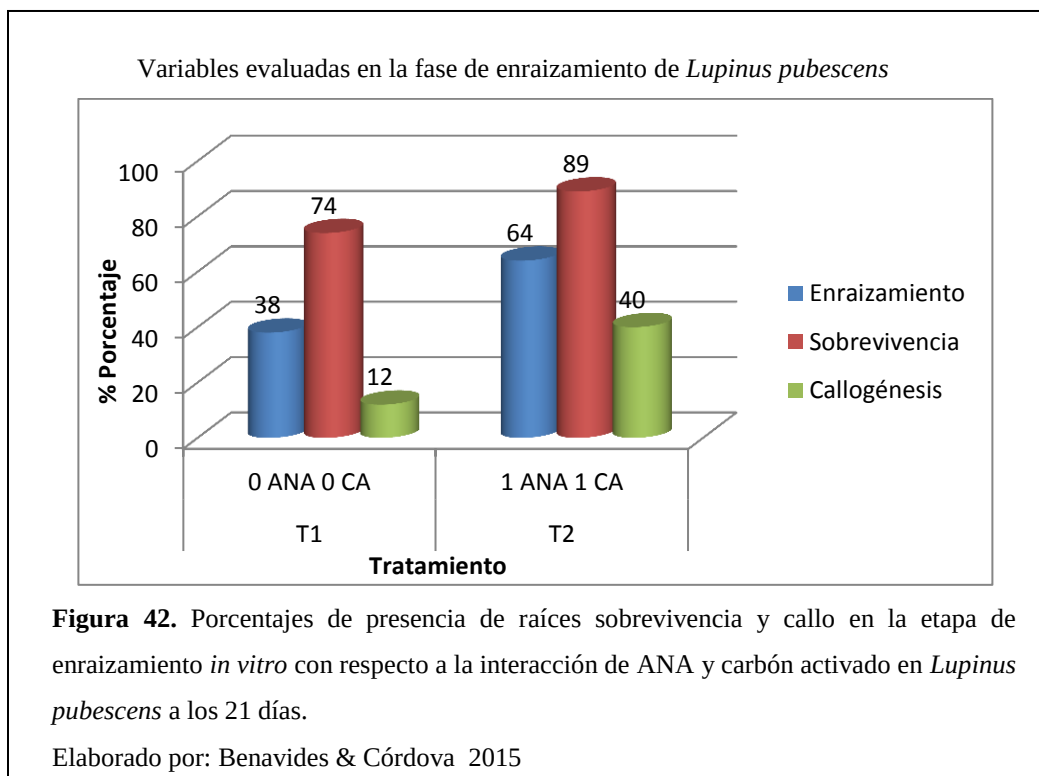


3.7.1.2 Porcentaje de sobrevivencia

De acuerdo a la prueba de Duncan en esta variable se observa que existen diferencias significativas. El tratamiento T1 presentó el 74% de sobrevivencia, mientras que el tratamiento T2 presentó el 89 % (Figura 42).

3.7.1.3 Porcentaje de callogénesis

Para el porcentaje de callogénesis con respecto a la concentración de carbón activado y ANA, se observaron diferencias estadísticamente significativas. La presencia de callos en el tratamiento T2 es mayor (40%) con respecto a T1 (12%) (Figura 42).



3.7.1.4 Promedio número de hojas

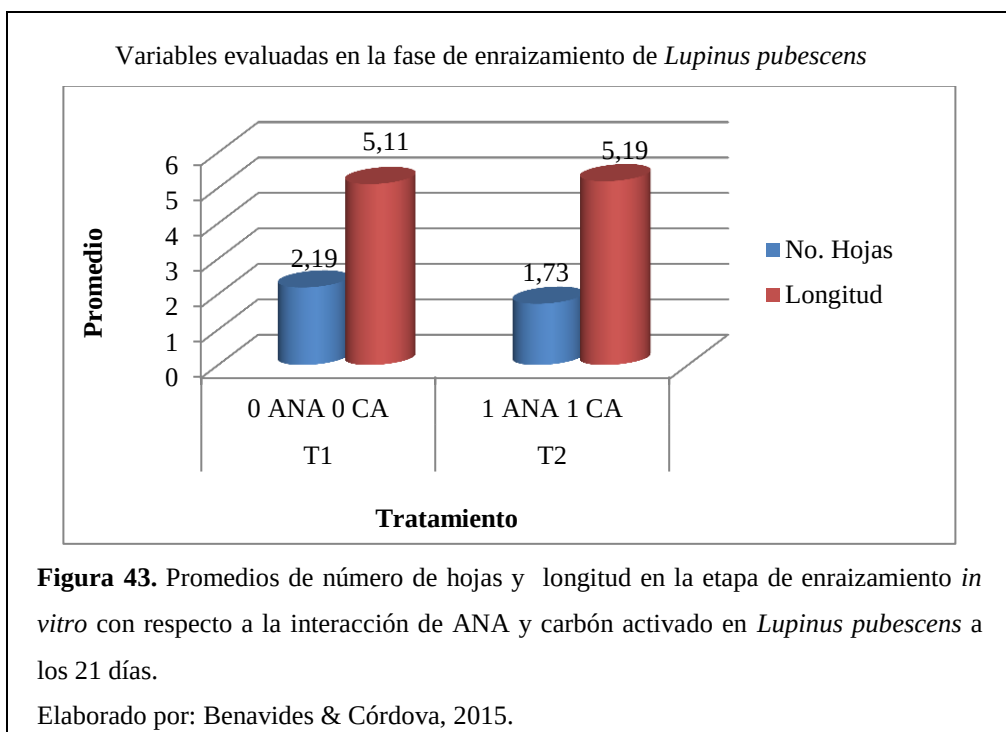
Según la prueba de Duncan se observó que en esta variable no existieron diferencias significativas para los tratamientos, sin embargo el tratamiento T1 presentó el mayor promedio de número de hojas (2,19).

3.7.1.5 Promedio longitud

En cuanto a la variable longitud, el tratamiento T2 (ANA 1 ppm+ CA 1000ppm) presentó un mayor promedio de crecimiento (5,96 cm), mientras que T1 (testigo) presentó menor promedio de crecimiento (5,11 cm). Cabe recalcar que los tratamientos no presentan diferencias significativas para esta variable.

3.7.1.6 Color del explante

De acuerdo a la tabla 38, se determinó que no existen diferencias significativas para la variable color. Los dos tratamientos presentan color verde claro, tanto T1 (4,03) como T2 (4,06).



De acuerdo a la Figuras 42 y 43 se eligió el tratamiento T2 (ANA 1 ppm + CA 1000 ppm) como óptimo, ya que presentó el mejor porcentaje de enraizamiento (64%), el mejor porcentaje de sobrevivencia (89%) y mayor promedio en longitud 5,96 cm.

Pedroza (2009, págs. 17-32), encontró que la utilización del carbón activado en concentraciones del 0,5 al 1%, mostraron una tasa media de crecimiento mucho mayor que en los tratamientos que no tenían carbón activado, ayudando al desarrollo caulinar, foliar y sobre todo favorece la estimulación del desarrollo del sistema radicular en orquídeas, aludiendo que el oscurecimiento del medio de cultivo gracias a la acción del carbón activado, favorece la formación de un mayor número de raíces.

Suárez, Jarma, & Avila (2006, págs. 55-56), probaron en la fase de enraizamiento *in vitro* diferentes concentraciones (0, 0,25, 0,5, 0,75 y 1 mg/L) de Ácido naftalacético

(ANA) en tallos de roble (*Tabebuia rosea*), durante 4 semanas evaluando el porcentaje de enraizamiento, el número promedio de raíces y la longitud de raíces. Encontraron que la presencia de ANA en el medio de cultivo, incrementa el porcentaje de enraizamiento al compararse con el tratamiento control, obteniendo óptimos resultados al incrementar la concentración de ANA. Contrario a lo evaluado por Weldt (2008, pág. 45), el cual obtiene un porcentaje de enraizamiento del 92% con 4,2 raíces por planta de *Rosa canina* al usar 0,1 ppm de ANA en el medio de cultivo.

Ponce, Guiñazú, Cirrincione, Videla, & Arancibia (2011, págs. 235-243), evaluaron dos concentraciones de ácido naftalacético (ANA), dos concentraciones de ácido indol butírico (AIB) y un testigo sin auxina con 1 g/L de carbón activado, en brotes de *Mutsia subspinoso*, los resultados obtenidos reflejaron que ANA fue más efectivo en promover el enraizamiento que AIB, ya que este último no se diferenció del testigo. El mejor enraizamiento se obtuvo con 0,5 ppm de ANA con un 64%. Explican que la presencia de carbón activado aumentó el promedio de crecimiento de raíces y porcentaje de enraizamiento, debido a que absorbe las sustancias exudadas del medio, causante en algunos casos de muerte por oxidación.

Quintero, Polo, Jarma, & Espitia (2003, págs. 51-56), mostraron el efecto del ácido naftalacético (ANA) con respecto al enraizamiento en diferentes dosis (0; 0,3; 0,6; 0,9 mg/L), obteniendo el mayor porcentaje de enraizamiento a una concentración de 0,9 mg/L, aunque también evidenciaron que a esa concentración de ANA aumentaba la formación de callo; por lo que, no es conveniente usar niveles más altos del regulador de crecimiento. Contrario a lo encontrado por Mogollon, Díaz, & Hernández (2004, págs. 15-51), quienes para la fase de enraizamiento en brotes de *Ananas comosus* obtuvieron mayor número de raíces al usar 2mg/L de ANA, mientras que la longitud máxima de raíces tuvo mejores resultados en dosis menores.

Sotolongo, y otros (2003, págs. 245-250), mostraron un alto porcentaje de enraizamiento en explantes nodales de *Psidium salutare* al usar 1g/L de carbón activado y un 0,2 mg/L de ácido naftalacético ANA.

3.8 FASE IV: Adaptación al sustrato en *Lupinus pubescens*

Las vitroplantas obtenidas de la fase de enraizamiento, fueron adaptadas a sustrato. Se evaluaron los promedios de las variables número de hojas totales, número de brotes, longitud del explante, color y los porcentajes de prendimiento y sobrevivencia, con respecto a dos sustratos, fibra de coco y turba, evaluados a los 30 días.

Tabla 41. ADEVA para prendimiento, sobrevivencia, promedio del número de hojas totales, promedio del número de brotes, longitud y color para la fase de adaptación al sustrato de *Lupinus pubescens*.

FV	GL	% Prendimiento		%Sobrevivencia		No. Hojas		No. de brotes		Longitud		Color	
		CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p	CM	p
Trat	1	0,19	0,376	0,33	0,2123	105,02	0,0108	67,69	0,0582	336,55	0,0087	0,17	0,3759
Error	46	0,23		0,21		14,87		17,93		44,87		0,21	
Total	47												

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa

Nota: Benavides & Córdova, 2015

Según la tabla 39, se encontraron diferencias significativas en las variables promedio del número de hojas y longitud, mientras que las variables prendimiento, sobrevivencia promedio de número de brotes y color no presentaron diferencias significativas.

Tabla 42. Promedios y pruebas de significancia para porcentajes de prendimiento y sobrevivencia y promedios de número de hojas, número de brotes, longitud y color para la fase de adaptación al sustrato en *Lupinus pubescens* a los 30 días.

Trat.	Sustrato	%Prendimiento	%Sobrevivencia	No. hojas	No. de brotes	Longitud (cm)	Color
T1	Fibra de coco	71 ± 0,10 a	79 ± 0,09 a	5,54 ± 0,79 b	6,29±0,86 a	9,64± 1,37 b	4,21±0,10a
T2	Turba	58 ± 0,10 a	63 ± 0,09 a	2,58 ± 0,79 a	3,92±0,86 a	4,34 ± 1,37 a	4,07± 0,12a

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas (p<0,05)

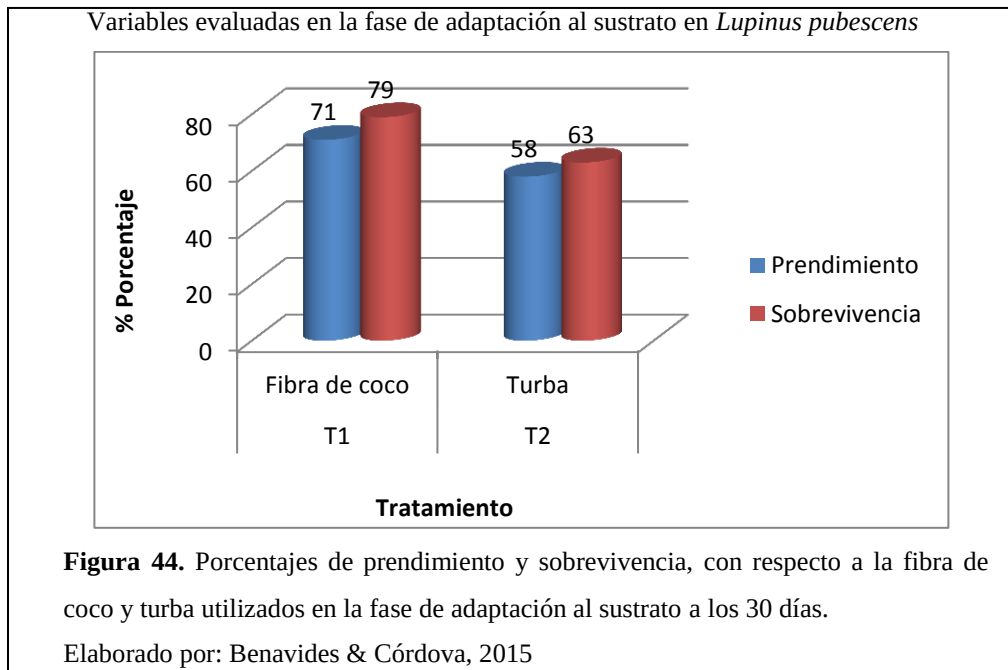
Nota: Benavides & Córdova, 2015

3.8.1.1 Porcentaje de prendimiento

En cuanto a la variable prendimiento no se observaron diferencias significativas en cuanto a los tratamientos, no obstante el tratamiento T1 (fibra de coco) presentó un porcentaje mayor (71%) con respecto al tratamiento T2 (58%) (Figura 44).

3.8.1.2 Porcentaje de sobrevivencia

En cuanto a la sobrevivencia se pudo evidenciar la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, la fibra de coco, presenta un mayor valor con 79%, mientras que, la turba alcanza 63% de sobrevivencia (Figura 44).



3.8.1.3 Promedio número de hojas

Según Duncan se observa que en la variable promedio de hojas existieron diferencias estadísticamente significativas, el mayor promedio lo obtuvo la fibra de coco con un 5,54; mientras que, la turba obtuvo un promedio inferior de 2,58.

3.8.1.4 Promedio número de brotes

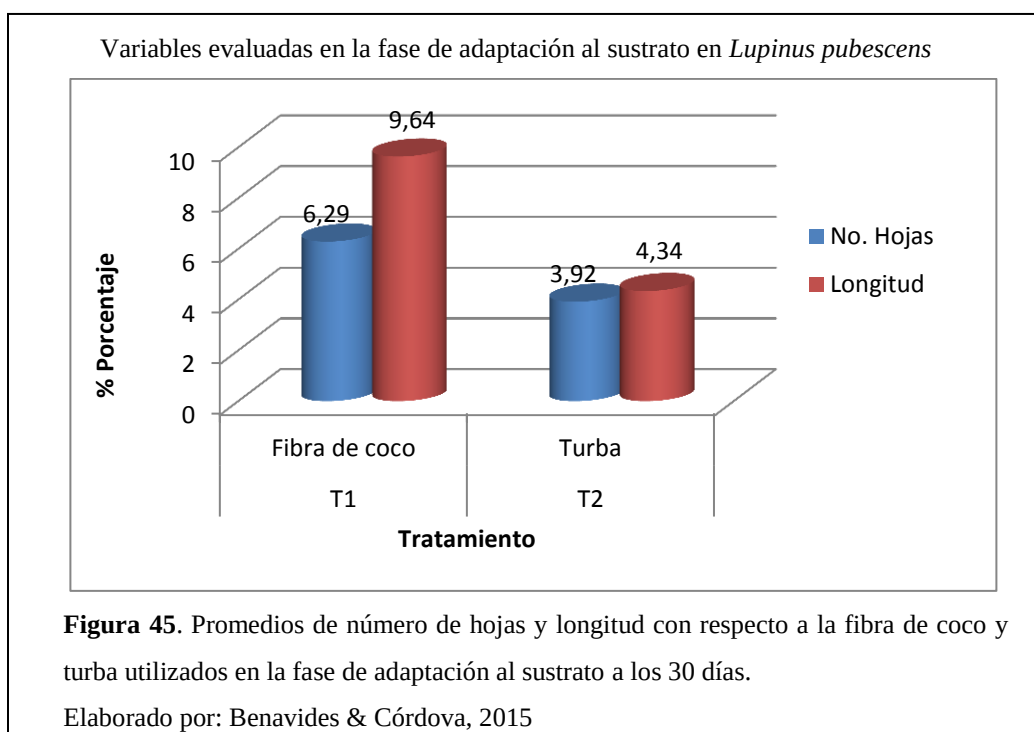
En cuanto al número de brotes no se observaron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo la fibra de coco presenta un promedio superior (6,29) al de la turba (3,92) (Figura 45).

3.8.1.5 Promedio de longitud

Se evidenció en esta variable la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Presentando la fibra de coco un promedio de longitud de 9,64 cm; mientras que, la turba presentó el 4,34 cm (Figura 45).

3.8.1.6 Color de la plántula

En la tabla 40, se determinó que no existen diferencias significativas para la variable color. Las plántulas de los dos sustratos presentaron color verde claro, en la fibra de coco con un promedio de 4,21 y en la turba con un promedio de 4,07.



De acuerdo a la tabla 40 y figuras 44 y 45, se escogió para *Lupinus pubescens* como sustrato óptimo la fibra de coco (T1), al presentar el mayor valor de prendimiento (71%), sobrevivencia (79%) y el mayor promedio de hojas (5,54), promedio de brotes (6,29) y longitud (9,64).

Garita & Gómez (2000, págs. 63-73), evaluaron el efecto de tres sustratos :fibra de coco, suelo y arena (1:1:1), turba sola, turba y fibra de coco (1:1) para las variables sobrevivencia y longitud, en la fase de adaptación al sustrato en plántulas de piña Champaka F-153, obteniendo mayor sobrevivencia (50%), longitud de raíz (2,06) y porcentaje de enraizamiento (2,89), al utilizar fibra de coco, sin embargo, recalcan que para la fase de aclimatación la sobrevivencia de las plántulas en general depende de la vigorosidad y tamaño.

Bustamante A. (2014, págs. 6-7), probó cuatro sustratos: oasis (espuma floral), fibra de coco, cascarilla de arroz y jiffy (discos compactos de turba); obteniendo mayor porcentaje de sobrevivencia en la fibra de coco (87%), debido a que crea un microclima ideal para el desarrollo de las raíces, mientras que para la variable número de raíces, tanto jiffy como fibra de coco fueron favorables.

Cabrera (2011, págs. 62-64), analizó el porcentaje de prendimiento, número de brotes, sobrevivencia y longitud en tres sustratos: fibra de coco; fibra de coco y tierra negra (1:1); y fibra de coco y cascarilla de arroz (1:1) en tres variedades de *Hypericum*, para lo cual se obtuvo el 100% de prendimiento, alto promedio de número de brotes, mayor porcentaje de sobrevivencia con fibra de coco, mientras que, un mejor promedio de longitud se obtuvo con los otros sustratos.

Tabla 43. ADEVA para marchitez, pudrición y contaminación fúngica en la fase de adaptación al sustrato en *Lupinus pubescens* a los 30 días.

FV	GL	% Marchitez		% Pudrición		% Contaminación fúngica	
		CM	p	CM	p	CM	p
Trat	1	0,52	0,0177	0,33	0,0373	0,52	0,0177
Error	46	0,09		0,07		0,09	
Total	47						

GL=Grados de libertad; CM= Media cuadrática; p= valor de alfa

Nota: Benavides & Córdova

Según la tabla 41, se encontraron diferencias significativas para las variables marchitez, pudrición y contaminación fúngica ya que el valor de p fue menor a 0,05.

Tabla 44. Promedios y pruebas de significancia para porcentaje de marchitez, pudrición y contaminación fúngica evaluados en la fase de adaptación al sustrato de *Lupinus pubescens* a los 30 días.

Trat	Sustrato	% Marchitez	% Pudrición	% Contaminación fúngica
T1	Fibra de coco	21 ± 0,06 b	0 ± 0,05 a	0 ± 0,06 a
T2	Turba	0 ± 0,06 a	17 ± 0,05 b	21 ± 0,06 b

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas (p<0,05)

Nota: Benavides & Córdova

3.8.1.7 Porcentaje de marchitez

Según Duncan se observaron diferencias significativas en los tratamientos. La fibra de coco obtuvo un 21%, mientras que la turba presentó un 0% de marchitez.

3.8.1.8 Porcentaje de pudrición

En cuanto a esta variable se observaron diferencias significativas ya que la fibra de coco no presentó pudrimiento, mientras que, la turba presentó un 17%.

3.8.1.9 Porcentaje de contaminación fúngica

Se observó en la tabla 42, la existencia de diferencias estadísticamente significativas en cuanto a esta variable, obteniendo la turba un mayor porcentaje de contaminación fúngica (21%) mientras que la fibra de coco obtuvo un valor nulo.

Variables evaluadas en la fase de adaptación al sustrato de *Lupinus pubescens*

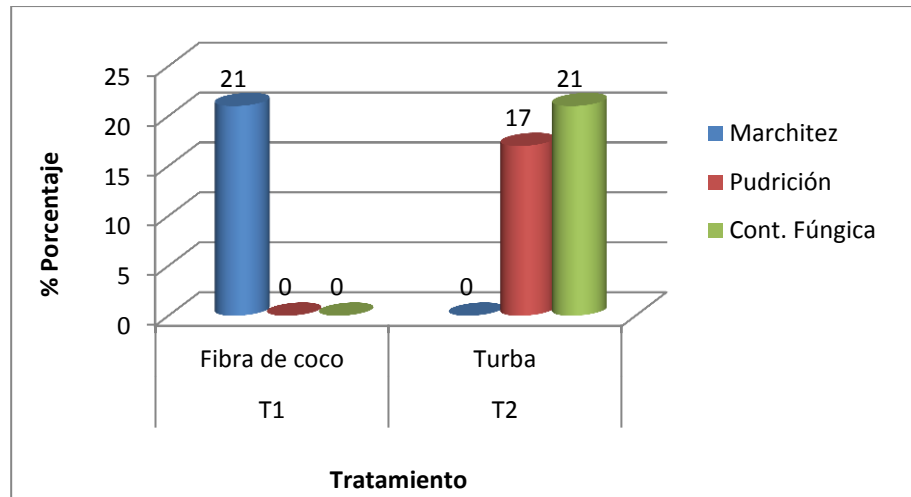


Figura 46. Porcentajes de marchitez, pudrición y contaminación fúngica evaluados en la fase de adaptación al sustrato en *Lupinus pubescens* a los 30 días.

Elaborado por: Benavides & Córdova, 2015

De acuerdo a la figura 46, respecto a los sustratos utilizados en la fase de adaptación, se determinó que el tratamiento T1 (Fibra de coco), fue favorable, no presenta pudrición ni contaminación fúngica en las plántulas de *Lupinus pubescens*. Esto se puede dar debido a que la fibra de coco es resistente a la degradación proveniente de microorganismos, es capaz de retener una gran cantidad de humedad sin llegar a saturarse, drenando los excesos y manteniendo una adecuada relación aire- agua. Evita el estrés sobre todo hídrico Reckmann (2011, pág. 80). Este sustrato permite una alta germinación, enraizamiento y un óptimo desarrollo de las plántulas Zita (2007, págs. 6-7).

CONCLUSIONES

Se aprueba la hipótesis alternativa, puesto que para *Geranium chilloense* y *Lupinus pubescens* se pudo obtener plantas completas a partir del cultivo *in vitro*.

El mejor tratamiento para la fase de escarificación en *Geranium chilloense*, fue T1 que consistió en tres días de remojo, inmersión en una solución de ácido acético (5ml) + agua destilada (45ml), durante dos horas; presentó un porcentaje de contaminación bacteriana del 1% y contaminación fúngica del 2%; el menor porcentaje de fenolización del explante (22%) y los mayores porcentajes de germinación (31%) y sobrevivencia (29%).

Los tratamientos de desinfección con mejor respuesta para las semillas de *Geranium chilloense* fueron el tratamiento P1 (alcohol al 96% (10 seg) + hipoclorito de sodio 50% v/v (3% p.a)), sin contaminación bacteriana, con una germinación de 32% y con 31% de sobrevivencia; y el tratamiento P3 (etanol al 70% (1 min) + hipoclorito de sodio 20%v/v (1,2 % p.a) y Tween 20 por 20 minutos), obteniendo una contaminación bacteriana y fúngica del 3% y, baja fenolización del medio (12%), y del explante (25%), alto porcentaje de sobrevivencia (28%) y 29% de germinación.

En la fase de introducción al medio de cultivo en semillas de *Geranium chilloense* el tratamiento T3 con el 25% de concentración de sales MS permitió obtener mayor porcentaje de germinación (41%), presencia de raíces (39%), sobrevivencia (40%) mayores promedios en número de hojas (1,44); longitud (2,32 cm) y color (4,58) entre verde claro y verde oscuro.

En los ensayos de multiplicación *in vitro* de *Geranium chilloense* el tratamiento T2 (0 ppm BAP y 0,5 ppm AIA) presentó los mejores resultados para las variables número de brotes (3,88); número de hojas (3,88); longitud (4,98 cm); y altos porcentajes en presencia de raíces (88%) y sobrevivencia (88%).

En *Geranium chilloense* el sustrato turba (T2) presente en el tratamiento T2 obtuvo mayor porcentaje de prendimiento (81%); sobrevivencia (81%) y mejores promedios de número de hojas (4,76); promedio de longitud (5,85 cm) y color (3,65).

El mejor protocolo de desinfección en las semillas de *Lupinus pubescens* fue el tratamiento P1 (alcohol al 96% por 10 seg + hipoclorito de sodio 50% v/v (3% p.a) por 10 min), que presentó 2% de contaminación bacteriana ,5% de contaminación fúngica y una sobrevivencia del 95%.

En la fase de introducción al medio de cultivo en semillas de *Lupinus pubescens* el tratamiento T2 (50% de sales MS) alcanzó los mejores porcentajes de germinación (100%); presencia de raíces (99%); cotiledones abiertos (86%) y altos promedios de longitud (7,10cm); número de hojas (0,26) y porcentaje aceptable de sobrevivencia (76%). Y el color de sus explantes es verde oscuro (4,91).

La mejor interacción citoquinina: auxina la presentó el tratamiento T5 (1 ppm BAP y 0,5 ppm AIA), en la fase de multiplicación *in vitro* en *Lupinus pubescens*, con el mayor índice de multiplicación (3,22), número de hojas (3,34), el mayor porcentaje de sobrevivencia (97%) y un color verde claro en los explantes.

En la fase de enraizamiento el uso de 1 ppm de ácido indolacético (ANA) y 1 g/L de carbón activado (T2), fue la mejor combinación para los explantes de *Lupinus pubescens*, al presentar el 64% de enraizamiento, 89% de sobrevivencia, el mejor promedio de longitud (5,96cm) y color verde claro.

Para la fase de adaptación al sustrato en *Lupinus pubescens* el tratamiento T1 con fibra de coco obtuvo mayores porcentajes de prendimiento (71%); sobrevivencia (79%) y mejores promedios de número de hojas (5,54); longitud (9,64 cm); promedio de número de brotes (6,29) y color verde claro en sus explantes (4,21).

RECOMENDACIONES

- Para el cultivo de tejidos de *Geranium chilloense* se recomienda una escarificación basada en hidratación (3 días) luego una inmersión en una solución de ácido acético al 10% (2 horas), desinfectar con los tratamientos P1y P3, en la introducción al medio de cultivo utilizar sales de MS al 25%, para la fase de multiplicación adicionar 0,5 ppm de AIA y en la fase de adaptación al sustrato usar turba estéril.
- Para la desinfección en semillas de *Lupinus pubescens* se sugiere utilizar el tratamiento P1, y en la fase de introducción al medio de cultivo utilizar el tratamiento T2 (50% de sales MS), en la fase de multiplicación *in vitro* usar el tratamiento T5 (1 ppm BAP- 0,5 AIA), para la fase de enraizamiento el uso de 1 ppm de ácido naftalacético (ANA) y 1 g/L de carbón activado y en la fase de adaptación al sustrato se recomienda el uso del tratamiento T1 con fibra de coco.
- Se debe adicionar antioxidantes al medio de cultivo para la introducción en *Geranium chilloense* ya que en el presente estudio se obtuvo altos porcentajes de fenolización tanto en el medio de cultivo como el explante.
- Evaluar otros reguladores de crecimiento, dosis e interacción para evitar la formación de callos en *Lupinus pubescens*.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ANA	Ácido naftalenacético
ADEVA	Análisis de varianza
AIA	Ácido indolacético
BAP	6-Bencilaminopurina
CA	Carbón activado
DCA	Diseño completamente al azar
mg/L	Miligramo sobre litro
MS	Medio Murashige & Skoog
NaClO	Hipoclorito de sodio
pH	Potencial hidrógeno
Ppm	Partes por millón
%v/v	Porcentaje de concentración volumen/volumen

LISTA DE REFERENCIAS

Aedo, C. (2005). Taxonomic revision of *Geranium* sections Andina and Chilensia (Geraniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1-3.

Aedo, C. (2012). *Systematic Botany Monographs Revision of Geranium (Geraneaceae) in the New World*.

Aguayo, E., Díaz, Rodrigo, Silveira, A., Tarazona, M., & Escalona, V. (2012). Agentes químicos emergentes para el control microbiológico de brotes de Tatsoi. *Agrociencia Uruguay*, 61.

Aguilar, Z., Ulloa, C., & Hidalgo, P. (2001). *Guía de Plantas Útiles de los páramos Zuleta, Ecuador*.

Aguirre, X. (2008). *Evaluacion de un sistema de produccion in vitro y en invernadero de plantas de Stevia rebaudiana bertonii*. Espe. Sede Sangolqui

Albany, N., Vilchez, J., León de Sierralta, S., Molina, M., & Chacín, P. (2006). Una metodología para la propagación in vitro de Aloe vera L. *Facultad agronómica(Luz)*, 213-222.

Albarracín, C. (abril de 2012). *Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación in vitro de Cilantro cimarrón (Eryngium foetidum) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales*. Departamento de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología - ESPE -Sede Sangolqui.

Alonso, M. (2002). *Biotechnología aplicada a la mejora de Pelargonium*. Departamento de Genética de la Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

Alvarado, C. (2012). *TEC- Digital*. Recuperado el 16 de Octubre de 2014, de Produccion de Plantas Via Microinjerto: http://www.tec-digital.itcr.ac.cr/file/5176160/microinjerto_teor

Andrade, F. (26 de Febrero de 2014). Ing. Biotecnología. (B. Thaly, & A. Córdova, Entrevistadores)

Arcos, A. (2010). *Obtención y aislamiento de protoplastos de trigo (Triticum aestivum), variedad cojitambo mediante el establecimiento de hojas y callos in vitro proveniente de semillas*. Departamento de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí.

Argüello, A., Arboleda, D., Menoscal, J., Maldonado, D., & Urresta, S. (2012). Monitoreo de la reforestación en las quebradas en el Norte de Quito. *Enfoque UTE*, V.3-N.2, 42-63.

Armendáris, K. (2014). *Establecimiento de un protocolo de desinfección, introducción y multiplicación in vitro a partir apicales de las plantula juveniles de Magnolia (Magnolia grandiflora) para la producción masiva, repoblación y preservación de esta especie en el DMQ* . Facultad de Ingeniería en Biotecnología. Espe. Sede Sangolquí.

Ayala, A. (2011). *Establecimiento de cultivo in vitro de Molle (Schinus molle) a partir de yemas axilares tomadas de plantas madre como una herramienta para la propagación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito*. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí.

Ayala, J. (2012). *Evaluacion de un protocolo de desinfección y de cuatro reguladores de crecimiento en el medio Murashige Skoog (1962), para la generación in vitro de callo a partir de hoja de gerbera (Gerbera jamesonii)*. Guatemala.

Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana*, 153.

Batancourt, J., & Oliva, B. (2012). Encuentro y fusión de dos culturas, una medicina llena de mitologías, naturaleza nativa, conocimiento y ciencia del viejo mundo. *Historias Hoy*, 18.

Billard, C., Dalzotto, C., & Lallana, V. (2013). *Germinación de Bletilla striata(Thunb.)Rchb.f.en medio líquido y evolución de plantas en medio semisólido*. UNER. Argentina

Burbano, D., & Herdoíza, N. (2009). *Biodiversidad del Distrito Metropolitano de Quito, un tesoro por explorar*. Secretaria de Ambiente del DMQ, Universidad San Fransisco de Quito Colegio de Ciencias Biologicas y Ambientales. Quito- Ecuador.

Bustamante, A. (2014). *Enraizamiento de Euphorbia pulcherrima en cuatro sustratos y dos concentraciones del ácido indol-3-butírico*. Escuela Agrícola Panamericana Honduras.

Bustamante, M. (2012). *Quito Habitat Silvestre*. Recuperado el 12 de septiembre de 09, de Quito Habitat Silvestre: <http://quitohabitatsilvestre.wordpress.com/2012/02/15/las-quebradas-de-quito/>

Cabrera, M. (2011). *Propagación vegeativa de tres variedades de(Hypericum sp) con tres enraizadores y tres sustratos orgánicos en dos sistemas de cultivo*. Espe.Sangolquí.

Caicedo, C., Peralta, E., & Rivera, M. (2001). *El cultivo de chocho Lupinus mutabilis Sweet: Fitonutrición, Enfermedades y Plagas, en el Ecuador*. Pichincha, Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigacion es Agropecuarias (INIAP).

Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro . *Universidad Nacional Autónoma de México, Revista Digital Universitaria* , 3.

Calzada, F., Cervantes, A., & Yépez, L. (2005). *In vitro antiprotozoal activity from the roots of Geranium mexicanum and its constituents on Entamoeba histolytica and*

Giardia lamblia. Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales. México.

Cárdenas, M. J. (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*. Espe.Sangolquí.

Castanon, G. (2002). La biotecnología y el mejoramiento genetico vegetal. *Kuxulkab*, 4.

Catillo, G., Romano, M. N., Norega, G., Franco, S., Meier, A., & Vega, M. (2010). *Desarrollo in vitro de embriones cigóticos de Mboyacá*. Laboratorio de Biotecnología de plantas. Universidad Nacional de Formosa. Argentina.

Chung, P., & Basilio, C. (1998). *Micropropagación de Salix spp a través de meristemas foliares*. Ciencias e investigación forestal- Instituto Forestal. Chile,

Coba, M. (marzo de 2009). *Rescate (Fragaria chiloensis) var.Huachi especie de frutilla en especie de extinción, a través de la técnica cultivo in vitro utilizando meristemas y hojas*. Facultad de Ingenieria en Biotecnologia. ESPE. Sede Sangolquí.

Colores HTLM. (2012). *Tabla-codigo-colores-HTML-verdes*. Recuperado el 14 de enero de 2015, de <http://coloreshtml.org/tablas-codigos-colores-html/tabla-codigo-colores-html-verdes/>

Contreras, R. (2013). *La Guía*. Recuperado el 29 de mayo de 2014, de Biología: <http://biologia.laguia2000.com/botanica/la-totipotencia-en-cultivos-de-tejido-vegetales>

Couselo, J., Corredoira, E., Vieitez, A., & Ballester, A. (2010). Aplicación del cultivo in vitro de tejidos vegetales en estudios de fitorremediación. *Revista Real Academia de Gálaga de Ciencias*, 77-87.

Cruz, M., Melgarejo, L., & Romero, M. (2010). *Fitohormonas*. Colombia.

Cruz, N., Brenes, M., Abdelonour, A., & Alvarenga, S. (octubre-diciembre de 2011). Establecimiento de un protocolo para la conservación in vitro a mediano plazo de uña de gato (*Uncaria tomentosa* Wild. DC). *Tecnología en Marcha*, 19-29.

El Comercio. (2009). *El comercio.com*. Recuperado el Agosto de 2014, de 25 plantas nativas se estudian en Quito: <http://www.elcomercio.com/actualidad/25-plantas-nativas-estudian-quito.html>

El Telégrafo. (8 de junio de 2014). Las quebradas preservan el patrimonio natural de la ciudad.

Esquivel, A., & Escalant, J. (1994). *Conceptos Basicos del Cultivo de Tejidos vegetales*. CATIE. Turraiba.

Estrada, N. (2000). *La biodiversidad y mejoramiento genético de la papa*. Plural editores. Bolivia

Garita, H., & Gómez, L. (2000). Micropropagación de la variedad de piña Champaka F-153. *Agronomía Costarricense*, 63-73.

Garmendia, G., & Vero, S. (2006). *Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas*. Facultad de Química. UDELAR.

Ginderdeuren, V. (2009). *Aclimatación de plántulas de Chlorea virescens*(Wild). *Lindi. cultivadas in vitro*. Universidad Austral de Chile- Escuela de Agronomía. Valdivia, Chile:

González, P. (2013). *Enraizamiento in vitro y ex vitro y aclimatación de Rosa canina L.* Universidad Austral de Chile- Facultad de Ciencias Agrarias- Escuela de Agronomía. Valdivia, Chile:

Gordón, J. (2012). *Establecimiento de un protocolo de propagación in vitro a partir de segmentos nodales de Cucarda (Hibiscis rosa-sinensis), como estrategia de reforestación del espacio público del Distrito Metropolitano de Quito*. ESPE. Sangolquí

Hortmann, H., & Kester, D. (1968). *Propagacion de Plantas Principios y Practicas* . Prentice- Hall, Inc., Englewood Cliffs. N.J. Mexico DF.

Jácome, J. C. (agosto de 2012). *Establecimiento, introducción y evaluación a callogénesis in vitro de meristemas apicales de árboles jóvenes de Romerrillo (Podocarpus oleifolius) como estrategia de conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito*. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí.

Jaramillo, T. (2013). *Plantas Nativas de la Hoya de Quito*. Quito: Fundación Botánica de los Andes.

Jaramillo, T. (2014, Junio 8). Las quebradas preservan el patrimonio natural de la ciudad. *El Telégrafo*.

Jiménez, S., Tiburzi, M., Salsi, M., Moguilevsky, M., & Pirovani, M. (2008). Tratamientos con ácido acético en cultivos de E. coli y Salmonella in vitro y en líquidos escurridos de lavado de canales de pollo. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 90-91.

Katil, A., & García, C. (2011). *Establecimiento y multiplicación in vitro de mora de castilla (Rubus glaucus Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos*, 350. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente.Colombia.

Kyanko, M., Russo, M., Fernandez, M., & Pose, G. (2010). Efectividad del ácido paracético sobre la reducción de carga de esporas de mohos causantes de la pudrición poscosecha de frutas y hortalizas. *Información Tecnológica Vol. 21(4)*, 125-130.

Lee, H., Laguna, A., Murguía, J., Elorza, P., Iglesias, L., García, B., & Barredo, F. B. (2007). Regeneración in vitro de Laelia anceps ssp. dawsonii. *Revista UDO Agrícola* 7, 65.

Lozada, P. (2010). *Evaluación del efecto de auxinas, citoquininas y brasioesteriodes sobre las fases de establecimiento y multiplicación del cultivo in vitro del tomate de*

árbol (*Solanum bataceae*). Quito, Pichincha, Ecuador: Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí.

Lozano, Z. (2011). *Establecimiento de un protocolo para la propagación in vitro de guarango Caesalpinia spinosa(Molina) Kuntze, a partir de plántulas como herramienta para la preservación de esta especie*. ESPE. Sangolquí.

M. Zia, Z. F.-u.-R. (2010). Short communication. Micropropagation of two Pakistani soybean (*Glycine max* L.) cultivars from cotyledonary nodes. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8(2), 448-453.

Manotoa, S. (2012). *Escarificación mecánica y química como tratamientos pregerminativos en semillas de Olivo (Olea europea)*. Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Ambato. Ambato

Martínez, J. (2013, Diciembre 3). Por la construcción de "Jardines Patrimoniales" . *La Hora*, pág. 1.

Mogollon, N., Díaz, J., & Hernández, N. (2004). Multiplicación clonal y enraizamiento in vitro de Ananas comosus L " Queen Australia". *Revista Facultad Agronómica(LUZ)*, 15-51.

Mosquera, G. (15 de octubre de 2014). Resolucion C 350. (T. Benavides, & C. Adriana, Entrevistadores)

Mosquera, N. (2007). *Cultivo vegetal* . Recuperado el 16 de Octubre de 2014, de <http://natalymosquera.blogspot.com/>

Mroginski, E., Rey, H., & Mroginski, L. (2003). In vitro plantlet regeneration from Australian Red Cedar (*Toona ciliada*, Meliaceae). *New Forests*, 177-184.

Mroginski, L., Sansberro, P., & Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. En *Biotecnología y mejoramiento vegetal II* (pág. 38). Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias.

Navarro, M., & González, E. (2007). Efecto de la escarificación de semillas en la germinación y crecimiento de *Ferocactus robustus* (Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae). *Zonas Áridas*, 195-205.

Noroña, A. (2010). *Determinación de un método de desinfección y un medio de cultivo in vitro de camu camu (Myrciaria dubia H.B.K Mc Vaugh) Cutuglagua Pichincha*. Quito.

Núñez, A. (2009). Turba y zeolita como soportes de inoculantes microbianos con acción fertilizante. *Redalyc*, 26-27.

Olivera, P., Tamariz, C., & Gutierrez, M. (2010). Desinfección e influencia del bencil aminopurina (BAP) y ácido naftalén acético (ANA) en la multiplicación in vitro de *Perezia coerulescens* Wedd, planta medicinal altoandina. *Aporte Santiaguino Vol. 3 (1)*, 117-124.

Orozco, W. (2012). *Establecimiento del protocolo de micropropagación de hortensia (Hydrangea macrophylla) a partir de segmentos nodales, como estrategia de producción a gran escala, para su utilización ornamental en los espacios públicos del Distrito Metropolitano de Quito. Ecuador*.

Ortiz, P. (noviembre de 2003). *Efecto del Acido Giberélico, el Acido Clorhídrico y la estratificación, sobre la germinación de semillas de pinabete (Abies guatemalensis Rehder)*. Facultad de Agronomía. Instituto de Investigaciones Agronomicas. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Parreño, J. (noviembre de 2012). *Establecimiento in vitro de caña de azúcar (Saccharum officinarum) -variedad CP 72-2086-*. Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria. Honduras

Paucar, M. (2011). *Organogénesis directa in vitro a partir de explantes de hojas de mora (Rubus glaucus Benth)*. Carrera de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias. ESPE-IASA I. Sede El Prado.

Pavón, C. (2002). *Evaluación del uso de ápices meristemáticos y explantes cotiledonares e hipocotiledonares en el establecimiento in vitro de Tabebuia rosea (Bertol) DC (macuelizo)*. Escuela Agrícola Panamericana - Carrera de Ciencias y Producción Agrícola. Honduras

Pedroza, J. (julio de 2009). Efecto del carbón activado, ácido indol acético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajos condiciones in vitro. *Revista Colombia Biotecnológica*, 17-32.

Pedroza, J., & Caballero, M. (2009). Evaluación del efecto del medio MS y la temperatura en el desarrollo de propágulos de *Marchantia polymorpha* L. (Marchantiaceae) bajos condiciones in vitro y ex vitro. *Revista colombiana de biotecnología Scielo*.

Pender, K., & Szcześniak, E. (2011). *Geranium dissectum* (Geraniaceae) in Lower Silesia -distribution and category of threat-. *Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski*, 138-140.

Peña, C. (2009). *Establecimiento y evaluación de protocolos de desinfección, introducción y multiplicación in vitro de piñón (jatropha curcas) a partir de semillas y yemas apicales obtenidas de plantas adultas con miras a una propagación masiva de plantas elite*. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí.

Ponce, M., Guiñazú, M., Cirrincione, M., Videla, M., & Arancibia, C. (2011). *Micropropagación de la enredadera nativa Mutsia subspinoso*. Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo. Mendoza Argentina.

Proaño, A. (2011). *Regeneración y conservación mediante la técnica de crecimiento mínimo de lupinus mutabilis (chocho andino) in vitro*. Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias. ESPE-IASA I. Sede El Prado.

Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., & Espitia, A. (2003, Diciembre). Enraizamiento in vitro de *Dioscoreas* sp. *Revista Colombiana de Bioecnología*, 51-56.

Ramirez, S. (2012). *Capacidad germinativa de semillas de Taxus globosa Schltl*, 26.: Instituto de Enseñanza e Investigacion en Ciencias Agrícolas . Montecillo Mexico.

Recalde, C. (2007). *Establecimiento del cultivo in vitro y aclimatacion en invernadero de Nepeta hederacea variegata*. Espe. Sede Sangolquí.

Reckmann, O. (2011). Fibra de coco un sustrato con grandes ventajas. *Redagrícola*, 80.

Roca & Mroginski. (1993). *Cultivo de tejidos en la agricultura fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Cali - Colombia:

Rozo, G. (2014). *Multiplicación clonal in vitro de Acacia mangium Wild., como estrategia para la recuperación de suelos deprimidos.*: Universidad de Tolima Facultad de Ciencias. Ibagúe.

Ruales, C. (2007). *Estudios para la recuperación de la flora nativa del valle de Tumbaco-Distrito Metropolitano de Quito: Inventario florístico y ensayo de propagación vegetativa. 1*. Universidad San Fransisco de Quito . Quito, Pichincha, Ecuador.

Ruales, C., & Guevara, J. (2010). La flora patrimonial de Quito descubierta por la expedición de Humboldt y Bonpland en el año 1802. *Avances en Ciencias e Ingenierías*, B54-B55.

Ruiz, B. (2000). *Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta in vitro de Anthurium andraeanum L*. Honduras.

Ruiz, G. (2013). *Micropropagación in vitro de Floripondio blanco (Brugmansia candida) como estrategia de los programas de arborización para el Distrito Metropolitano de Quito*. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí.

Sanabria, D., Silva, R., Oliveros, M., & Barrios, R. (2001). Escarificación química y térmica de semillas subterráneas de *Centrosema rotundifolium*. *Bioagro*, 117-124.

Sandra Alva, M. O. (2006). Organogénesis de raíces en geranio. *Agronomía Tropical* vol.56, No 4, 571-576.

Sansberro, P., & Mroginski, L. (1995). Micropropagación de *Aloysia polystachia*(Verbenaceae). *Agriscientia*, 83-86.

Santa Cruz, E. (2001). *Propagación y regeneración in vitro de Lupinus stipulatus*. México.

Santa Cruz, M. (2001). *Distribución, Abundancia y Regeneración in vitro de Lupinus stipulatus J. Agardh (Leguminosae) del Nevado de Colima*. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Guadalajara, México.

Santamaría, A. (2012). *Establecimiento de un protocolo para la germinación in vitro e inducción a callo embriogénico de cedro(Cedrela montana) a partir de embriones zigóticos*. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE.Sede Sangolquí.

Seguí, J. M. (2010). *Biología y Biotecnología reproductiva de las plantas*. Universitat Politècnica de Valencia. Valencia.

Severín, C. et al. (2002). Rasgado del tegumento e inducción de la germinación in vitro de semillas de soja (glycine max) en etapas tempranas del desarrollo. *Revista FAVE - Ciencias Agrarias*, 71 - 79.

Sokmen, et al. (2005). *In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from Geranium sanguineum L.* Departament of Biology. Turkey.

Soto, N., Ferreira, A., Delgado, C., & Enríquez, G. (2013). Regeneración in vitro de soya variedad Incasoy-36. *Biotecnología Aplicada*, 34-38.

Sotolongo, R., García, M., Junco, L., López, G., García, & Esteban. (2003). Micropropagación de *Psidium salutare*(Myrtaceae). *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 245-250.

Stevens, P. (2001). *Angiosperm Phylogeny Website*.

Suarez, F. (2011). *Micropropagación de Piña (Ananas comosus L. Merrill) Híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas apicales y laterales*. Carrera de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias. ESPE-IASA I. Sede El Prado.

Suárez, I., Jarma, A., & Avila, M. (2006). *Desarrollo de un protocolo para la propagación in vitro de roble (Tabebuia rosea Bertol DC)*. Universidad de Colombia. Colombia

Swoboda, J. (1998). *Caracterización de Bradyrhizobium aislada del callejón interandino y su interacción con Lupinus mutabilis Sweet y Lupinus albus L.* Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales . Ecuador.

Tarragó, J., Fernández, F., Marinich, M. J., & Lilles, L. (2005). *Estudio comparativo de la volatilidad de dos formulaciones del herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)*. UNNE. Argentina.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. (2015). *Tropicos*. Recuperado el 15 de enero de 2015, de <http://www.tropicos.org/Name/13900068>

Uribe, M., Delaveau, C., Garcés, M., & Escobar, R. (2008). Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento in vitro de Berberidopsis corallina, a partir de segmentos nodales. *Bosque (Valdivia)*, 58-64.

USFQ. (2012). *Quito declara su flora y fauna patrimoniales y emblemáticas con colaboración de Profesores USFQ*.

Vallejo, R. (2012). *Estrategia de propagación in vitro de Aechmea fasciata para la regeneración de plantas completas* . Espe. Sangolquí.

Vargas, J. (noviembre de 2006). *Relación entre el Pinchaflor negro (Diglossa humeralis) y la vegetación nativa en el parque Metropolitano de Quito, Ecuador: Un aporte para la conservación y manejo de la vida silvestre del Parque Metropolitano de Quito*. Universidad San Francisco de Quito. Ecuador

Vásquez, V. (2008). *Vida para Quito*. Recuperado el 03 de enero de 2015, de Vida para Quito:http://viniciovasquez.com/vida/index.php?option=com_content&task=view&id=63&Itemid=50

Villafuerte, K. (2014). *Estudios de pasivos ambientales en el tramo medio de la quebrada Santa Ana del barrio San Fransisco en la parroquia San Antonio del Distrito Metropolitano de Quito*. Universidad Tecnologica Equinoccial. Ecuador.

Villalobos, I., & Arias, O. (1987). Inducción y multiplicación de callos in vitro en tres cultivares comerciales de caña de azúcar *saccharum* sp. *Agronomía Costaricense*, 39-44.

Weldt, E. (2008). *Establecimiento, multiplicación y enraizamiento in vitro de Rosa canina L.* Universidad Austral de Chile. Chile.

Wright, L., Sumner, S., Hackney, C., Pierson, M., & Zoecklein, B. (2000). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 on apples using wash and chemical Sanitizer treatments. *Dairy Food Environment Sanitization* 20, 120-126.

www.codeso.com. (s.f.). www.codeso.com. Recuperado el 03 de enero de 2015, de www.codeso.com: <http://www.codeso.com/turismoecuador/jardinbotanicoquito.html>

Zeiger, E., & Taíz, L. (2006). *Fisiología Vegetal. I*. Castello de la Plana. Universidad de Jaume.

Zita, M. (2007). *Comparación del sustrato de fibra de coco con los sustratos de corteza de pino compostada, perlita y vermiculita en la producción de plantas de Eucalyptus globulus (Labill)*. Universidad Austral de Chile. Chile.

ANEXOS

Anexo 1. Resolución No. 350, Resuelve Declarar Patrimonio Natural, Histórico, Cultural y paisajístico al Sistema de Quebradas del Distrito Metropolitano de Quito



RESOLUCIÓN No. **C** : 350

En ejercicio de las atribuciones que le otorgan los artículos 7, 57 literal a) y 87 literal a) del Código Orgánico de Organización Territorial, Autonomía y Descentralización.

RESUELVE:

DECLARAR PATRIMONIO NATURAL, HISTÓRICO, CULTURAL Y PAISAJÍSTICO AL SISTEMA DE QUEBRADAS DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO

SECCIÓN I

PRINCIPIOS Y DEFINICIONES GENERALES

Artículo 1.- Declaratoria.- Declárese al Sistema de Quebradas del Distrito Metropolitano de Quito, como Patrimonio Natural, Histórico, Cultural y Paisajístico, y establecer como prioritario su cuidado, rehabilitación integral y mantenimiento a fin de prevenir los riesgos inherentes y brindar a la ciudadanía lugares de alta calidad ambiental, recreación, esparcimiento y cultura.

Para el efecto, el Municipio del Distrito Metropolitano de Quito, dentro del marco jurídico de sus competencias, promoverá, gestionará y evaluará las políticas y estrategias destinadas a la recuperación del sistema de quebradas dentro del territorio del Distrito.

Artículo 2.- Caracterización.- Las quebradas se caracterizan por poseer pendientes en diferentes grados, con presencia de remanentes de vegetación natural andina; además, constituyen cauces naturales y microcuencas que, en muchas ocasiones, atraviesan la estructura urbana de Quito, siendo en muchos casos sujetas a usos socioeconómicos diversos, de carácter rural y urbano.

Artículo 3 Objeto.- La presente declaratoria de las quebradas como patrimonio natural, histórico, cultural y paisajístico, tiene por objeto proteger, conservar y recuperar las funciones naturales de las mismas, permitiendo una fusión urbano y rural que promueva el mejoramiento de la calidad de vida de los habitantes del Distrito y la seguridad ante posibles riesgos, además de brindar a los y las habitantes de la ciudad, lugares de calidad ambiental, recreación y esparcimiento.

Artículo 4.- Fines.- Los fines específicos de la presente declaratoria son los establecidos en las Ordenanzas Metropolitanas Nos. 171, 172 y 213, considerando además los siguientes:

- a) La protección del suelo, su flora, fauna, recursos hídricos y recursos naturales existentes;
- b) El rol de conectores ecológicos del Subsistema Metropolitano de Áreas Naturales Protegidas del Distrito Metropolitano de Quito y de la Red Verde Urbana; y,
- c) Permitir el fortalecimiento de la identidad y convivencia surgida alrededor de las quebradas.

Artículo 5.- Manejo, Conservación y Coordinación.- La secretaría encargada del ambiente en el Distrito Metropolitano de Quito, en coordinación con las secretarías encargadas de la seguridad y gobernabilidad, ordenamiento territorial y la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento, promoverán y normarán las actividades de manejo de los recursos naturales que se desarrollen en las quebradas, en los términos y con las limitaciones que se establezcan en las ordenanzas y sus reglamentos, así como su extensión y las condiciones para su conservación, uso, recuperación y restauración.

La secretaría encargada del ambiente, en coordinación con las demás dependencias metropolitanas, organismos de derecho público, privado y las universidades de la ciudad, emprenderán acciones urgentes tendientes a fomentar la recuperación de las quebradas del Distrito.

Artículo 6.- Control y Seguridad.- La Agencia Metropolitana de Control sancionará las infracciones que se cometan en las quebradas. El Cuerpo de Bomberos, la Policía Metropolitana y demás instituciones para la gestión de riesgos y la seguridad ciudadana, colaborarán para garantizar la seguridad ambiental y ciudadana en las áreas.

Artículo 7.- Gestión Institucional.- El Municipio del Distrito Metropolitano de Quito adoptará acciones pertinentes para el cumplimiento de la presente resolución, en el marco del Eje Quito Verde.

Artículo 8.- Financiamiento.- El Municipio del Distrito Metropolitano de Quito, y sus empresas públicas metropolitanas, destinarán sus recursos propios para la conservación, recuperación y manejo de las quebradas, gestionando además recursos, cuando sea necesario, con otras instituciones de derecho público o privado, nacionales e internacionales.

El Municipio del Distrito Metropolitano de Quito reconoce la labor de la ciudadanía en la recuperación y mantenimiento de las quebradas como un factor decisivo, por lo que se propenderá a incentivar las formas de la participación ciudadana que coadyuven al efecto.

Disposición Final.- Esta Resolución entrará en vigencia a partir de la fecha de su sanción.

Dada en la Sala de Sesiones del Concejo Metropolitano de Quito, a los siete días del mes de junio del año dos mil doce.

ALCALDÍA DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO.- Distrito Metropolitano de Quito, **15 JUN 2012**

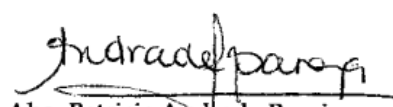
EJECÚTESE:



Dr. Augusto Barrera Guarderas
ALCALDE DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO

CERTIFICO, que la presente resolución fue discutida y aprobada en sesión ordinaria del Concejo Metropolitano de Quito el 7 de junio de 2012; y sancionada por el Dr. Augusto Barrera Guarderas, Alcalde del Distrito Metropolitano de Quito, el **15 JUN 2012**

Lo Certifico.- Distrito Metropolitano de Quito, **18 JUN 2012**



Abg. Patricia Andrade Baroja
SECRETARIA GENERAL DEL CONCEJO METROPOLITANO DE QUITO

DXAC

Anexo 2. Resolución No. 238 Plantas emblemáticas del Distrito Metropolitano de Quito



RESOLUCIÓN No. C 238

EL CONCEJO METROPOLITANO DE QUITO

Visto el Informe No. IC-2012-087 de 6 de marzo de 2012, emitido por la Comisión de Ambiente.

CONSIDERANDO:

- Que,** el numeral 7 del artículo 3 de la Constitución de la República del Ecuador establece como uno de los deberes primordiales del Estado: “(...) Proteger el patrimonio natural y cultural del país (...)”;
- Que,** el artículo 14 de la Constitución de la República declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país;
- Que,** el tercer inciso del artículo 71 de la Constitución de la República señala: “ (...) El Estado incentivará a las personas naturales y jurídicas, y a los colectivos, para que protejan la naturaleza, y promover el respeto a todos los elementos que forman un ecosistema.”;
- Que,** el artículo 404 de la Constitución de la República determina que el patrimonio natural del Ecuador, único e invaluable, comprende entre otras, las formaciones físicas, biológicas y geológicas cuyo valor desde el punto de vista ambiental, científico, cultural o paisajístico exige su protección, conservación, recuperación y promoción;

- Que,** de conformidad con el artículo 13 de la Ley de Gestión Ambiental, el Municipio del Distrito Metropolitano de Quito es competente para dictar políticas ambientales seccionales, con sujeción a la Constitución de la República y a la Ley;
- Que,** el Ecuador es uno de los cinco países megadiversos del planeta, cuyo rico patrimonio natural se manifiesta de manera especial en el grupo de las plantas, contando con más de 18.000 especies de plantas vasculares, siendo la proximidad de Quito con la línea ecuatorial y la gran variación en altitud, desde la cima del volcán Pichincha hasta las riberas del río Guayllabamba, motivo para que aproximadamente el 5% de las plantas vasculares del Ecuador se encuentren en Quito y sus alrededores;
- Que,** el arrayán de Quito (*Myrcianthes halli*) es un árbol nativo nombrado en honor al coronel inglés Francis Hall, quien participó en el proceso independentista del actual Ecuador, y que recolectó el primer espécimen tipo en Quito;
- Que,** la salvia de Quito (*Salvia quitensis*) es un hermoso arbusto con potencial para ser desarrollado para uso ornamental, cuyo nombre hace alusión a la ciudad de Quito, su lugar de origen, y que se destaca entre la vegetación de las laderas del Pichincha;
- Que,** la guaba (*Inga insignis*) es un árbol nativo de los Andes y frecuente en los huertos de los valles de Quito, que fue recolectado por primera vez en el Valle de Tumbaco por Alexander Von Humboldt y Aimé Bonpland, y nombrado para la ciencia con ese espécimen tipo;
- Que,** la tuna de San Antonio y Pomasqui (*Opuntia soederstromiana*), planta endémica de las zonas secas de los valles interandinos del Ecuador, fue recolectada en San Antonio, cerca de Quito, en 1918 y fue nombrada para la ciencia en 1919 en honor a Ludovic Söderstrom, quien fue el primer recolector de la misma;
- Que** el chocho de Rumipamba (*Lupinus pubescens*), especie herbácea nativa de los valles interandinos de los Andes del norte del Ecuador, ha sido nombrada a partir de la recolección tipo hecha en la zona de Rumipamba (actual barrio de Quito);
- Que** el algarrobo o guaranga (*Mimosa quitensis*), es una especie frecuente en las quebradas, suelos arenosos o sobre taludes de los caminos andinos, cuyo espécimen tipo fue recolectado por Francis Hall en alguna quebrada de Quito;

- Que,** la mora de Quito (*Rubus glaucus*), conocida como Mora de Castilla, es un frutal nativo de Ecuador y, contrario a lo que piensa la mayoría de gente, no fue introducida desde Castilla (España), sino que fue recolectada por primera vez para la ciencia en las laderas del volcán Pichincha, cuyo fruto forma parte de la tradición gastronómica quiteña;
- Que,** el conocimiento y la valoración del patrimonio natural contribuyen al desarrollo de valores de identidad y autoestima de las comunidades que se comprometen en su conservación;
- Que,** es necesario destacar el valor histórico – cultural de muchas especies de plantas recolectadas por primera vez en Quito o en zonas aledañas, y que fueron nombradas y descritas para la ciencia con base en estas colecciones; y,
- Que,** representantes de instituciones públicas, privadas y académicas, han propuesto al arrayán de Quito (*Myrcianthes halli*), la salvia (*Salvia quitensis*), la guaba (*Inga insignis*), la tuna de San Antonio (*Opuntia soederstromiana*), el chocho de Rumipamba (*Lupinus pubescens*), el algarrobo de las quebradas (*Mimosa quitensis*) y la mora de Quito (*Rubus glaucus*) como plantas emblemáticas de la ciudad de Quito.

En ejercicio de la atribución que le confiere los artículos 7; 57 literal a); y, 87 literal a) del Código Orgánico de Organización Territorial, Autonomía y Descentralización; y, 8 de la Ley Orgánica de Régimen para el Distrito Metropolitano de Quito.

RESUELVE:

Artículo único.- Declarar al arrayán de Quito (*Myrcianthes halli*) como árbol emblemático del Distrito Metropolitano de Quito; a la salvia (*Salvia quitensis*) como arbusto emblemático de las laderas del Pichincha; a la guaba (*Inga insignis*) como árbol emblemático de los Valles de Tumbaco y Los Chillos; a la tuna de San Antonio y Pomasqui (*Opuntia soederstromiana*) como planta emblemática de San Antonio de Pichincha y Calderón; al chocho de Rumipamba (*Lupinus pubescens*) como planta emblemática del sector norte de la zona de Rumipamba; al algarrobo de las quebradas (*Mimosa quitensis*), como árbol emblemático de las quebradas de Quito; y, a la mora de Quito, (*Rubus glaucus*), como frutal emblemático de Quito.

Disposición Transitoria Única.- Encárguese a la Secretaría de Ambiente, en coordinación con la Secretaría de Educación, Recreación y Deporte; la Empresa Pública Metropolitana de Gestión de Destino Turístico; y, la Empresa Pública Metropolitana de Movilidad y Obras Públicas, emprender, en unión con las organizaciones públicas y



RESOLUCIÓN No. **C 238**

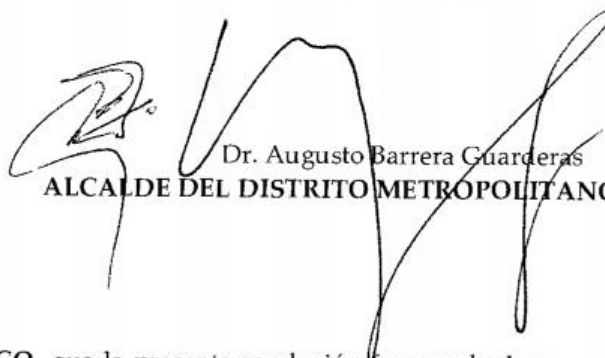
privadas, acciones tendientes a fomentar la conservación de la vegetación nativa del Distrito Metropolitano de Quito.

Disposición General Única.- El Municipio del Distrito Metropolitano de Quito, a través de sus organismos, órganos y dependencias metropolitanas competentes, promoverá, a través de campañas de educación ambiental, el conocimiento y valoración del patrimonio natural, y la investigación y la conservación de especies emblemáticas del Distrito.

Dada, en la Sala de Sesiones del Concejo Metropolitano de Quito, a los 15 días del mes de marzo del año dos mil doce.

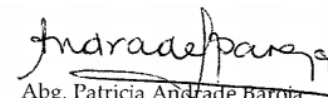
ALCALDÍA DEL DISTRITO METROPOLITANO.- Distrito Metropolitano de Quito, 0

EJECÚTESE:


Dr. Augusto Barrera Guarderas
ALCALDE DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO

CERTIFICO, que la presente resolución fue aprobada en sesión ordinaria del Concejo Metropolitano de Quito el 15 de marzo de 2012; y sancionada por el Dr. Augusto Barrera Guarderas, Alcalde del Distrito Metropolitano de Quito, el **09 ABR 2012**.

Lo Certifico.- Distrito Metropolitano de Quito, **10 ABR 2012**


Abg. Patricia Andrade Baroja
SECRETARIA GENERAL DEL CONCEJO METROPOLITANO DE QUITO

Anexo 3. Composición del medio de cultivo Murashige and Skoog (M&S) 1962(Arcos, 2010, p. 177)

	Compuesto	Fórmula	Cantidad stock (g/L)
Macronutrientes	Nitrato de amonio	NH_4NO_3	16,5
	Nitrato de potasio	KNO_3	19
	Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4
Micronutrientes	Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7
	Fosfato de potasio dihidrogenado	KH_2PO_4	1,7
	Ácido bórico	H_3BO_3	0,062
	Sulfato de manganeso tetrahidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,196
	Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,086
	Yoduro de potasio	KI	0,009
	Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,003
	Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,003
	Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,003
Quelatos	Sulfato de hierro heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,56
	Na_2 -EDTA ($2\text{H}_2\text{O}$)		0,736

