



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

TESIS

PROCESOS MORFOGÉNICOS *in vitro* DE CEDRO (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz.) INDUCIDOS, A PARTIR DE SEMILLAS, PARA PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA.

*Tesis de grado previo a la obtención
del Título de Ingeniera Forestal.*

Autora: Gabriela del Cisne Díaz Quichimbo.

Director: Ing. Víctor Hugo Eras Guamán Mg. Sc.

Co-director: Prof. Dr. Guillermo E. Delgado Paredes

LOJA – ECUADOR
2012

**“PROCESOS MORFOGÉNICOS *in vitro* DE CEDRO (*Cedrela montana*
Moritz ex Turcz.) INDUCIDOS, A PARTIR DE SEMILLAS, PARA
PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA”.**

TESIS DE GRADO

Presentada al tribunal calificador como requisito para obtener el

Título de:

INGENIERA FORESTAL

En la Universidad Nacional de Loja

Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Forestal

APROBADA

Ing. Manuel Quizhpe Córdova. Mg. Sc.

PRESIDENTE

Ing. Honías Cartuche O. Mg. Sc.

VOCAL

Ing. Héctor Maza Ch. Mg. Sc.

VOCAL

Ingeniero

Víctor Hugo Eras Guamán Mg. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que la Investigación de tesis titulada “**PROCESOS MORFOGÉNICOS *in vitro* DE CEDRO (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz.) INDUCIDOS, A PARTIR DE SEMILLAS, PARA PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA**, de autoría de señora Egresada Gabriela del Cisne Díaz Quichimbo, ha sido dirigida, revisada y aprobada en su integridad, por lo AUTORIZO su defensa, publicación y difusión.

Loja, Julio de 2012

.....
Ing. Víctor Hugo Eras Guamán Mg. Sc

DIRECTOR DE TESIS

Ing. Manuel Quizhpe Córdova. Mg. Sc.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

CERTIFICA:

Que la tesis titulada: **“PROCESOS MORFOGÉNICOS *in vitro* DE CEDRO (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz.) INDUCIDOS, A PARTIR DE SEMILLAS, PARA PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA**, de la autoría de la señora egresada GABRIELA DEL CISNE DÍAZ QUICHIMBO, se ha incorporado las sugerencias realizadas por el Tribunal Calificador. Además, se ha procedido a su respectiva calificación y aprobación definitiva.

Por lo que, se autoriza a la señora egresada la publicación definitiva de la tesis antes mencionada.

Loja, Julio 2012.

Ing. Manuel Quizhpe Córdova Mg. Sc

PRESIDENTE

AUTORÍA

Las ideas y los conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Gabriela del Cisne Díaz Quichimbo

DEDICATORIA

A ti papito Dios por estar conmigo a cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Agradecer hoy y siempre a mis padres MARCO Y GLORJA, porque creyeron en mí, porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada una meta mas, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mis hermanos Marco, Byron, Carlos, gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

En especial a ti hija mía DOMÉNICA ALEJANDRA que eres el motivo y la razón que me ha llevado a seguir superándome día a día, para alcanzar un sueño más y por todas las veces que no pudiste tener una mamá a tiempo completo.

Y todas las personas que quienes en los momentos más difíciles me dieron su amor y comprensión para poderme superar, quiero también dejar a cada uno de ellos una enseñanza que cuando se quiere alcanzar algo en la vida, no hay tiempo ni obstáculo que lo impida para poderlo LOGRAR.

Mi Dome, eres el amor de mi vida y todo lo hago por ti.

Recuerdas que siempre cuentas conmigo y siempre te voy amar.

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, a la Carrera de Ingeniería Forestal y en ella a los distinguidos docentes por sus valiosas enseñanzas y su continuo apoyo.

Al Ministerio de Industria y Productividad (MIPRO) y al Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, por haber financiado y permitido ejecutar mi proyecto de tesis respectivamente.

A mi Director de tesis Ing. Víctor Hugo Eras Guamán Mg. Sc, quien con su experiencia como docente ha sido la guía idónea, por el tiempo brindado durante el proceso que ha llevado a realizar esta tesis.

A los miembros del tribunal calificador: Ing. Manuel Quizhpe, Ing. Honías Cartuche, Ing. Héctor Maza, por sus acertadas observaciones y el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis.

Y de manera especial al Co-Director Prof. Dr. Guillermo E. Delgado Paredes, Ing. Julia Minchala, Ing. Darling González, Ing. Ruth Poma y Ing. Magali Yaguana, por su paciencia, orientación, sugerencia y opiniones durante todo el proceso de mi tesis y que muy aparte de la asesoría técnica, llegaron a ser mis grandes Amigos, que me alentaron a seguir adelante en los momentos difíciles de mi vida *Gracias* siempre los llevare en mi corazón

Y a ustedes compañeros y amigos de amanecidas, de risas, tristezas y felicidad, por su apoyo desinteresado, María Eugenia, Marly, Veronica, Dalton, Pablo, Tatiana y Judith.

totales.

Gracias

Att. Gabriela

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Páginas
RESUMEN	1
SUMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	9
2.1 Descripción de la especie en estudio <i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz	9
2.1.1 Clasificación botánica	9
2.1.2 Descripción botánica	9
2.1.3 Ecología	9
2.1.4 Usos	10
2.1.5 Categoría de Amenaza	10
2.2 Generalidades de la Biotecnología	10
2.2.1. Biotecnología vegetal	10
2.3 Micropropagación <i>in vitro</i>	11
2.3.1. Micropropagación	11
2.3.2. Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i>	11
2.3.3. Factores que intervienen en la micropropagación	12
2.3.3.1. Factores externos	13
2.3.3.2. Factores ambientales de incubación	14
2.3.3.3. Medio de cultivo	15
2.4. Morfogénesis Vegetal	18
2.4.1. Organogénesis	18
2.4.2. Embriogénesis somática	19
2.5. Conservación	20
2.5.1. Conservación <i>in situ</i>	20
2.5.2. Conservación <i>ex situ</i>	21
2.5.3. Bancos de Germoplasma	21

2.5.4.	Conservación <i>in vitro</i>	21
3.	METODOLOGÍA	23
3.1.	Localización y descripción del área de estudio	23
3.1.1.	Ubicación geográfica, política y localización del Laboratorio de Micropropagación Vegetal	23
3.2.	Metodología para micropropagar <i>C. montana</i> a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de plántulas obtenidas por germinación de semillas <i>in vitro</i>	24
3.2.1.	Fase de campo	24
3.2.1.1.	Recolección de las semillas	24
3.2.2.	Fase de Laboratorio Germinación de semillas <i>in vitro</i>	24
3.2.2.1.	Selección y desinfección de las semillas	24
3.2.2.2.	Medio de cultivo para la germinación de semillas <i>in vitro</i>	25
3.2.3.	Siembra de semillas	26
3.2.3.1.	Diseño experimental	27
3.2.4.	Medio de cultivo para la proliferación de ápices caulinares y segmentos nodales	28
3.2.4.1.	Diseño experimental	28
3.2.5.	Enraizamiento de ápices caulinares	29
3.2.5.1.	Condiciones ambientales de incubación	31
3.2.5.2.	Diseño experimental	31
3.2.5.3.	Análisis estadístico	31
3.3.	Metodología para evaluar la inducción de callos, friables y compactos, a partir de diversos explantes como cotiledones, hipocótilos y raíces	32
3.3.1.	Extracción y desinfección del material vegetal	32
3.3.2.	Condiciones ambientales de incubación	33
3.3.3.	Diseño experimental	33
3.4.	Metodología para inducir diversos procesos morfogénicos (organogénesis y/o embriogénesis somática) a partir de diversos explantes como cotiledones, hipocótilos y raíces	34

3.4.1.	Extracción y desinfección del material vegetal	34
3.4.1.1.	Extracción de explantes obtenidos de Flores	35
3.4.1.2.	Extracción de explantes obtenidos de embriones zigóticos inmaduros e maduros.	35
3.4.1.3.	Extracción de explantes obtenidos de Hipocótilos, cotiledones, foliolos y raíces.	36
3.4.2.	Condiciones ambientales de incubación	39
3.4.3.	Diseño experimental	39
3.4.4.	Regeneración de callos	41
3.4.5.	Análisis estadístico	41
3.5.	Metodología para conservar el germoplasma de genotipos élites, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales, obtenidos por germinación de semillas <i>in vitro</i> .	42
3.5.1.	Extracción y desinfección del material vegetal	43
3.5.2.	Composición y preparación de medio de cultivo	42
3.5.3.	Extracción y desinfección del material vegetal	43
3.5.4.	Condiciones ambientales de incubación	45
3.5.5.	Diseño experimental	42
3.5.6.	Análisis estadístico	44
3.5.7.	Regeneración de plántulas conservadas <i>in vitro</i>	44
4.	RESULTADOS	45
4.1.	Fase de germinación de semillas <i>in vitro</i> .	45
4.2.	Fase de proliferación	46
4.2.1.	Proliferación Ápices caulinares	46
4.2.2.	Proliferación de segmentos nodales	48
4.3.	Fase de enraizamiento	50
4.3.1.	Enraizamiento ápices caulinares	50
4.3.2.	Enraizamiento de segmentos nodales	52
4.4.	Tasa de multiplicación potencial	54
4.5.	Fase de formación de callos, friables	54
4.6.	Fase de inducción de callos	55
4.6.1.	Fase de formación del callo Embriogénico	55

4.6.1.1. Efecto de las auxinas para la inducción de callos con aparición embriogénica	57
4.6.1.2. Efecto de combinación de Dicamba y diversas auxinas para la inducción de callos con aparición embriogénica.	58
4.6.2. Fase de formación de callo Organogénico.	59
4.6.2.1. Efecto de los reguladores de crecimiento para la inducción de callos con aparición organogénica.	59
4.6.3. Regeneración de callos	64
4.7. Conservación de germoplasma	67
4.7.1. Efecto del ácido abscísico (ABA) para conservar el germoplasma de <i>C. montana</i> .	65
4.7.2. Efecto del manitol para conservar el germoplasma de <i>C. montana</i>	

69

4.7.3. Supervivencia (subcultivo) de plantas conservadas in vitro por seis meses	
---	--

73

5. **DISCUSIÓN**

75

6. **CONCLUSIONES**

83

7. **RECOMENDACIONES**

85

8. **BIBLIOGRAFÍA**

86

9. **ANEXOS**

98

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
1	Composición química del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), utilizado en el cultivo de tejidos de <i>C. montana</i> .	26
2	Diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG ₃) utilizadas en la germinación de semillas de <i>C. montana</i> .	26
3	Diferentes concentraciones de las citocininas benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN) y 2-isopentiladenina (2iP) en la formación de brotes y elongación de ápices caulinares y segmentos nodales de <i>C. montana</i> .	28
4	Diferentes concentraciones de las auxinas ácido indolbutírico (AIB) y ácido indolacético (AIA) en medio MS completo y a la mitad, para el enraizamiento de ápices caulinares de <i>C. montana</i>	30
5	Diferentes concentraciones de las auxinas ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D) ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) para la inducción de callos de <i>C. montana</i> .	33
6	Diferentes concentraciones de Dicamba para la inducción de callos embriogénicos de <i>C. montana</i> .	37
7	Diferentes concentraciones de las auxinas ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D) y Dicamba para la inducción de callos embriogénicos de <i>C. montana</i> .	37
8	Diferentes concentraciones de extracto de maíz para la inducción de callos organogénicos de <i>C. montana</i> .	37

9	Diferentes concentraciones de Dicamba y agua de coco para la inducción de callos organogénicos de <i>C. montana</i> .	37
10	Diferentes concentraciones de citocininas benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN), más agua de coco, para la inducción de callos organogénicos de <i>C. montana</i> .	38
11	Diferentes concentraciones de citocininas benzilaminopurina (BAP), más extracto de maíz y agua de coco para la inducción de callos organogénicos de <i>C. montana</i> .	38
12	Diferentes concentraciones de citocinina benzilaminopurina (BAP), más Dicamba y agua de coco con el MS (TY17) coco para la inducción de callos organogénicos de <i>C. montana</i> .	38
13	Diferentes concentraciones de las citocininas benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN), 2-isopentiladenina (2iP) y sulfato de adenina, para la inducción de callos organogénicos de <i>C. montana</i> .	39
14	Efecto del BAP y compuestos orgánicos utilizados en la regeneración de órganos a partir de callos de <i>C. montana</i> .	41
15	Efecto del ácido giberélico y el ácido abscísico (ABA) regeneración de órganos a partir de callos de <i>C. montana</i> .	41
16	Diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) y MANITOL en medio de cultivo MS y MS/2 con para conservación de germoplasma de <i>C. montana</i> .	42
17	Diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) y ácido indol-butírico (AIB) en medio de cultivo MS/2 para la regeneración de plántulas obtenidas de la	44

	conservación de germoplasma de <i>C. montana</i> .	
18	Efecto de citocininas (BAP, KIN, 2IP) en diferentes concentraciones, en tamaño del brote, desarrollo radicular, número de hojas, número de nudos y en la elongación de ápices caulinares <i>C. montana</i> .	47
19	Efecto de citoquinas BAP, KIN, 2IP en diferentes concentraciones en la elongación del brote, desarrollo radicular, número de hojas y número de nudos de <i>C. montana</i> .	49
20	Efecto de auxinas AIB y AIA en diferentes concentraciones, para la formación de raíces, longitud de raíces, número de hojas, brotes, número de nudos y altura del explante de <i>C. montana</i> .	51
21	Efecto de auxinas (AIB, AIA) en diferentes concentraciones, para la formación de raíces, longitud de raíces, número de hojas, brotes y número de nudos y altura del explante de <i>C. montana</i>	53
22	Efecto de las auxinas 2,4-D, ANA y AIA, en diferentes concentraciones, en la inducción de callos de <i>C. montana</i> .	55
23	Efecto de las auxinas 2,4-D, ANA y AIA, en diferentes concentraciones, en la inducción de callos con apariencia embriogénica de <i>C. montana</i>	57
24	Efecto de Dicamba y Dicamba en combinación con la auxina 2,4-D, en diferentes concentraciones, en la inducción de callos embriogénicos de <i>C. montana</i>	58
25	Efecto de Dicamba, agua de coco y BAP en medio de cultivo MS, en diferentes concentraciones, en la inducción de callos con apariencia organogénica de <i>C. montana</i> .	60

26	Efecto de las citocininas BAP, KIN y 2iP, más sulfato de adenina (SA) en diferentes concentraciones, en la inducción de callos con apariencia organogénica de <i>C. montana</i> .	63
27	Efecto del ABA y AG3, en diferentes concentraciones, en la regeneración de callos de <i>C. montana</i> .	64
28	Efecto de la sustancia osmoreguladora (ABA) en la elongación del brote, desarrollo radicular, número de hojas y número de nudos formados de <i>C. montana</i> .	67
29	Efecto de la sustancia osmoreguladora manitol en la elongación del brote, desarrollo radicular y número de hojas y nudos formados de <i>C. montana</i> .	70
30	Efecto de ácido abscísico (ABA) y ácido indol-butírico (AIB) en diferentes concentraciones en medio de cultivo MS ½, en la elongación del brote, número de raíces, hojas y nudos formados y supervivencia de las plántulas subcultivadas de <i>C. montana</i>	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Germinación de semillas de <i>C. montana</i> en tres concentraciones de ácido giberélico (AG ₃).	45
2	a) Germinación de semillas de <i>C. montana</i> , a los 15 días de cultivo, en algodón empapado con las sales minerales MS suplementadas con AG ₃ 2 mg/L. b) Desarrollo de plántulas germinadas en algodón a las cuatro semanas	46

- de la siembra. c) Proceso germinativo de semillas sembradas en tubos de ensayo con puente de papel de filtro.
- 3 Presencia de mayor proliferación y elongación en el cultivo *in vitro* de *C. montana* en medio MS más 2 mg/L BAP . 48
 - 4 a) Desarrollo del explante, con inducción de callo y raíces, en el medio de cultivo MS ½ y AIB 1 mg/L. b) Explantes que no formaron raíces en medio de cultivo MS y AIA 1 mg/L. 50
 - 5 a) Desarrollo de las raíces en el explante aplicando 1 mg/L AIB en medio de cultivo MS en concentración a la mitad. b) Plántulas vitrificadas en medio de cultivo 1mg/L de AIA. 52
 - 6 Tasa de multiplicación potencial de *C. montana*, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales, partiendo de plántulas germinadas con AG3, en tres subcultivos sucesivos realizados cada tres meses. 54
 - 7 a) Proceso morfogénico de hipocótilos hasta formar callo, presentando cambios a los 12 días (I), a los 15 días (II) y a los 20 días (III). b) Callos con apariencia embriogénica a 3 semanas del cultivo. c) Formación de callos con apariencia embriogénica a partir de embriones zigóticos inmaduros. d) y e) Cultivo de embriones zigóticos que no formaron callo continuando con el proceso de germinación. f) Visión detallada de callos con apariencia embriogénica observándose embriones somáticos de apariencia globular. 59
 - 8 Formación de callos con apariencia organogénica cubriendo el 100% del explante. 60
 - 9 a) Hipocótilos verdes aún, a los tres meses de cultivo, en diferentes tratamientos donde no se registró la formación de callo. b) Cotiledones verdes aún después de tres meses de cultivo. c) Embriones zigóticos cultivados en medio de cultivo con extracto de maíz 20% que no 61

formaron callo sino plántulas.

- | | | |
|-----------|---|------------|
| 10 | a) Formación de raíces en medio de cultivo con AG ₃ 5 mg/L b) y c) Callo subcultivado en medio de cultivo MS con ABA 5 mg/L, observándose la formación de raíces a los 20 días de cultivo. | 65 |
| 11 | Explante con raíz: a) Efecto del medio de cultivo MS ½ + ABA 0,1 mg/L, b) Efecto del medio de cultivo MS ½ + ABA 0,5 mg/L, c) Abcisión foliar a los 4 meses de iniciado el proceso de conservación. Explante sin raíz: d) Efecto del medio de cultivo MS ½ + ABA 0,1 mg/L, e) Explante contaminado con hongos. f) Vitrificación y senescencia del explante. | 68 |
| 12 | Explante con raíz: a) Efecto del medio de cultivo MS + manitol 6,0%. Explante sin raíz:, b) Explante mostrando el efecto del medio de cultivo MS ½ + manitol 6%, a los 4 meses de cultivo, c) Efecto inhibitorio en el crecimiento del brote en medio de cultivo MS + manitol 6,0%. | 71 |
| 13 | Flores cultivadas en medio MS más 2 mg/L de ANA B) flores fenolizadas. | 98 |
| 14 | Sala de Incubación de los cultivos <i>in vitro</i> del Laboratorio de Micropropagación Vegetal. | 99 |
| 15 | Toma de datos, de los diferentes ensayos durante la investigación. | 100 |
| 16 | Frutos con semillas maduras | 100 |
| 17 | a) Fruto con semillas semi-maduras. b) Fruto semillas inmaduras. | 100 |
| 18 | Formación de callo de apariencia embriogénica en explantes de hipocótilo y cotiledones. | 100 |
| 19 | Desarrollo de plántulas subcultivadas en medio después de ser conservadas por seis meses <i>in vitro</i> . | 101 |
| 20 | Callo subcultivado en medio de regeneración, sufre proceso de necrosamiento | 101 |
| 21 | Taladrador de las meliáceas, larva <i>Hypsipyla grandella</i> (Zeller), encontrada en los frutos inmaduros durante los ensayos. | 102 |

RESUMEN

Con el objeto de multiplicar y preservar en condiciones *in vitro* a mediano plazo ejemplares sobresalientes de especies forestales importantes, en el contexto del proyecto de innovación tecnológica entre la Universidad Nacional de Loja, como entidad ejecutora, y el Ministerio de Industria y Productividad (MIPRO), como entidad financiadora. El presente trabajo de investigación se desarrolló, en el marco de un amplio programa de reforestación. Entre las especies de interés comercial que se pretende rescatar se cuenta a *Cedrela montana* (MELIACEAE), conocida vulgarmente como “cedro blanco”.

En este contexto, en la presente investigación se realizaron pruebas de germinación de semillas, proliferación y elongación de brotes, enraizamiento y conservación de germoplasma, así como ensayos preliminares sobre inducción de callos, organogénesis y embriogénesis somática. En todos los experimentos se utilizaron las sales minerales Murashige y Skoog (MS) suplementadas con diversos reguladores de crecimiento. En los ensayos sobre geminación *in vitro* de semillas se utilizó ácido giberélico (AG₃) 1 y 2 mg/L, alcanzándose la mayor tasa de germinación con 72% en la concentración AG₃ 2 mg/L. En la elongación y proliferación de brotes se utilizaron como explantes ápices caulinares y segmentos nodales, ensayándose las citocininas benzilaminopurina (BAP), 6-furfurilaminopurina o Kinetina (KIN) y 2-isopenteniladenina (2iP) en concentraciones de 1 y 2 mg/L destacando BAP 2 mg/L. En los explantes elongados y brotados se indujo enraizamiento *de novo* con ácido indolbutírico (AIB) y ácido indolacético (AIA) en diferentes concentraciones, resultando AIB 1 mg/L y las sales minerales MS, a la mitad de la concentración, como el mejor tratamiento. En la inducción de callos friables se utilizó las auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftaleneacético (ANA) y AIA 1 y 2 mg/L. En lo referente a la inducción de embriogénesis somática, se utilizó como explantes hipocótilos y embriones maduros e inmaduros en varias

combinaciones de 2,4-D, ANA, AIA y Dicamba, en concentraciones de 0.5 - 2 mg/L, con el mayor porcentaje de inducción de callos con apariencia embriogénica en la interacción Dicamba 0.5 – 2,4-D 3 mg/L. En la inducción a organogénesis se utilizaron las citocininas BAP, KIN y 2IP en concentraciones 1, 3 mg/L, suplementadas con Sulfato de adenina 5 y 10 mg/L y agua de coco 20%. El mayor porcentaje de formación de callos con apariencia organogénica se observó en la combinación agua de coco 20%+ BAP 3 mg/L, utilizando como explantes segmentos de hipocótilos. En la inducción a organogénesis somática se emplearon BAP, KIN y 2IP en concentraciones 1, 2 y 3 mg/L respectivamente combinado con Sulfato de adenina en concentraciones de 5 y 10 mg/L, pero al probar la adición de 20% de coco agua más 3mg/L de BAP promovió los mayores porcentajes de tamaño de callo a partir de segmentos de hipocótilos.

En la conservación *in vitro* de germoplasma se utilizó plántulas de semillas germinadas, con raíz y sin raíz, bajo condiciones limitantes de crecimiento, utilizando ácido abscísico (ABA) y el osmoregulador manitol, en un lapso de 6 meses, observándose la mayor limitación en el crecimiento en los explantes con raíz, en el tratamiento ABA 0.1 mg/L, además de una baja tasa de mortalidad y alto porcentaje de supervivencia en el subcultivo.

SUMMARY

In order to multiply and preserve under *in vitro* conditions in a medium term outstanding copies of important forest species in the context of technological innovation project between National University of Loja as executing entity and Ministry of Industry and productivity (MIPRO), as funding entity. This research work was developed within the framework of a comprehensive program of reforestation. Among species of commercial interest is to rescue the *Cedrela montana* (MELIACEAE), commonly known as “white cedar”.

In this context, in this research were tested for seed germination, proliferation and shoot elongation, rooting and conservation of germplasm, as well as preliminary tests on callus induction, organogenesis and somatic embryogenesis. In all experiments we used the mineral salts Murashige and Skoog (MS) supplemented with various growth regulators. In trials on seed germination *in vitro* was used gibberellic acid (AG3) 1 and 2 mg/L, reaching the higher germination rate with 72% in the concentration AG3 2 mg/L. In elongation and proliferation of shoots were used as explants and nodal segments shoot apices, being tested cytokinins benzylaminopurine (BAP), 6-furfurylaminopurine or Kinetin (KIN) and 2-isopentenyladenine (2iP) at concentrations of 1 and 2 mg/L highlighting BAP 2 mg/L. In the explants elongated and sprouting was induced *de novo* root with indolebutyric acid (AIB) and indoleacetic (AIA) in different concentrations, resulting AIB 1 mg/L and the mineral salts MS, at half the concentration, as the best treatment. In the induction of friable calluses auxins was used 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), naphthaleneacetic acid (ANA) y AIA 1 and 2 mg/L. Regarding the induction of somatic embryogenesis, was used as explants hypocotyls and mature and immature embryos in various combinations of 2,4-D, ANA, AIA and Dicamba, in concentrations of 0.5-2mg/L, with the highest percentage of callus with embryogenic appearance in the Dicamba interaction 0.5-2,4-D 3mg/L. In the induction of organogenesis were used cytokinins BAP, KIN and 2iP in concentrations 1.3 mg / L, supplemented with

adenine sulfate, 5 and 10 mg / L and 20% coconut water.

The highest percentage of callus with organogenic appearance was observed in the combination of coconut water 20% plus BAP 3 mg/L, using as explants Hypocotyls segments. In the induction of somatic organogenesis used BAP, KIN, 2iP in concentrations 1.2 and 3 mg / L respectively combined with adenine sulfate at concentrations of 5 and 10 mg / L, but in testing the addition of 20% water plus coconut water 3mg / L of BAP promoted the highest percentages callus size from hypocotyls segments.

In vitro conservation of germplasm was used germinated seedlings with roots and without roots, limiting growth conditions, using abscisic acid (ABA) and mannitol osmoregulator, over a period of six months, with the greatest growth limitation in the explants with roots, in the ABA treatment 0.1 mg/L, plus a low mortality rate and high percentage of survival in the subculture.

1. INTRODUCCIÓN

Cedrela montana Moritz ex Turcz (Cedro blanco), pertenece a la familia MELIACEAE y alcanza una altura de 10 a 15 m (Borja, 1990); es una especie forestal nativa de alto valor comercial, debido a su excelente calidad de madera y a sus múltiples beneficios que brindan al ambiente como, por ejemplo, la recuperación de suelos, enriquecimiento de ecosistemas degradados, protección de vertientes de agua, extracción de madera, entre otros (Cintrón, 1990); además, esta planta es altamente apreciada en la medicina tradicional por su actividad antitumoral, (Champagne *et al.* 1992), y su raíz de corteza amarga se usa para combatir las fiebres y la epilepsia (Martínez, 1959, citado por Infante *et al.*, 2008). Se encuentra en zonas altas y húmedas, en altitudes que van desde los 1 600 a 2 800 msnm (Borja 1990), mientras que (Cabrera y Ordoñez 2004), hacen referencia que esta especie en Ecuador se encuentra en las formaciones boscosas de la sierra y oriente, entre los 1 800 - 3 200 m de altitud, cubriendo zonas especialmente de Loja, Saraguro y Sozoranga.

La deforestación ha sido una de las principales causas de la pérdida de la diversidad biológica a nivel mundial y el Ecuador no es la excepción, pues se deforestan alrededor de 190 000 ha anualmente (FAO, 2005). La explotación desmesurada de especies forestales maderables valiosas ocasiona una dramática disminución de su población y regeneración natural. Las razones de la deforestación son varias, principalmente el aprovechamiento de madera, leña y otros productos forestales y la expansión de terrenos para agricultura, ganadería y asentamientos humanos. Además, de estos factores, la incidencia de incendios forestales, plagas y desastres climáticos han contribuido a la eliminación del recurso forestal.

Para la FAO, el uso y comercio de la madera y sus derivados son actividades que han estado presentes en la economía del país. El Ecuador ha sido autosuficiente en productos madereros, gracias a una base forestal

natural que originalmente cubría el 80% del territorio nacional. Esta situación actualmente se está revirtiendo debido a conocidos problemas de sobre explotación y tala irracional de bosques nativos, frente a una incipiente forestación (<http://www.fao.org>).

Por otro lado, el cultivo de tejidos es una herramienta de la biotecnología, considerándosele una alternativa importante para regenerar y multiplicar las especies forestales. La propagación vegetativa ha tenido un papel importante en la multiplicación de árboles “élite” (Krikorian, 1991), con lo cual la micropropagación ha demostrado ser un importante mecanismo para la regeneración y supervivencia de especies en peligro de extinción. La micropropagación ofrece numerosas ventajas con respecto a la propagación masiva de árboles catalogados como “élite”, acortando de sobre manera los ciclos de reproducción que en condiciones de campo tomarían años (Montes, 2007). Una revisión clásica de literatura sobre cultivo de tejidos en especies forestales ha sido presentada por (Bajaj 1986) y (Bonga y Durzan 1989).

En micropropagación, la embriogénesis somática y la organogénesis pueden usarse para obtener clones somáticos y regenerar plantas completas con características uniformes y así establecer cultivares de plantas valiosas, libres de microorganismos, difíciles de obtener por métodos de cultivo tradicionales (George, 1993).

Mediante el método de cultivo *in vitro*, puede realizarse la conservación de germoplasma *ex situ*, mediante cambios en el ambiente del cultivo lo cual permite desacelerar el crecimiento de las células y de los tejidos (Roca *et al.*, 1991; Engelmann y Takagi, 2000; Scocchi y Rey, 2007). Los cultivos *in vitro* también pueden almacenarse por largos períodos de tiempo mediante alguno de los métodos de conservación utilizados para microorganismos como es la refrigeración y criopreservación (Mroginski *et al.*, 1991; Calva y Pérez, 2005).

Los primeros trabajos de cultivo de tejidos en cedro (*Cedrela odorata*) se iniciaron en 1989 por Maruyama y Col. (Maruyama *et al* 1989), quienes utilizando ápices caulinares lograron obtener gran cantidad de plántulas. En 1997 se obtuvo semilla artificial de cedro, encapsulando los ápices obtenidos por micropropagación (Maruyama *et al* 1997a, 1997b), en el informe se menciona que la embriogénesis somática es la técnica apropiada para la rápida micropropagación a gran escala y para la tecnología de semilla artificial; no obstante, esta técnica no puede ser usada en muchas especies, que se muestran recalcitrantes al proceso, en que la embriogénesis somática no ha sido inducida o el protocolo desarrollado ha resultado complicado, incluyendo al cedro, por lo que es necesario rescatar especies forestales importantes, en este caso *Cedrela montana*, con el establecimiento de protocolos para germinación de semillas, brotamiento y enraizamiento de ápices caulinares, embriogénesis/organogénesis somática y la conservación de germoplasma, es decir, propendiendo la propagación de plantas sanas y a la conservación del material genético valioso.

La presente investigación se llevó acabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, entre los meses noviembre del 2010 a octubre del 2011.

La literatura científica reporta trabajos en cultivo de tejidos en varias especies de la familia MELIACEAE, como por ejemplo, en *Cedrela odorata*. (Muñoz, 2003; Daquinta *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 2008; Peña-Ramírez *et al.*, 2010), *C. fissilis* (Costa *et al.*, 2002), *C. salvadorensis* (Soto *et al.*, 2010) y *Swetenia macrophylla* (Orellana, 1997); sin embargo, estos trabajos no se encuentran referidos a *Cedrela montana*, de allí la necesidad de su estudio.

Objetivo general:

- Contribuir a la preservación de *Cedrela montana* Moritz ex Turz (cedro blanco), mediante la inducción de diversos procesos morfogénicos *in vitro* a partir de semillas germinadas en laboratorio, con fines de propagación y conservación de germoplasma.

Objetivos específicos:

- Micropropagar cedro a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de plántulas obtenidas por germinación de semillas *in vitro*.
- Inducir callos friables y compactos, a partir de diversos explantes como cotiledones, hipocótilos y raíces.
- Inducir diversos procesos morfogénicos (organogénesis y/o embriogénesis somática) a partir de diversos explantes como cotiledones, hipocótilos y raíces.
- Conservar el germoplasma de genotipos élites, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales, obtenidos por germinación de semillas *in vitro*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Descripción de la especie en estudio *Cedrela montana* Moritz ex Turcz

2.1.1. Clasificación botánica

ORDEN: Sapindales
 FAMILIA: MELIACEAE
 GÉNERO: *Cedrela*
 ESPECIE: *montana*
 NOMBRE COMÚN: Cedro, cedro blanco



2.1.2. Descripción botánica

Árbol > 25 m, corteza café muy fisurada. Hojas compuestas, alternas paripinadas, 7–9 folíolos de bases marcadamente asimétricas, con borde entero; caducifolio. La inflorescencia que presenta es un racimo compuesto de 20-25 cm., las flores son bisexuales, pequeñas, con 4-5 pétalos, de color blanco azuladas, con cáliz y corola presente. El fruto es una cápsula, abiertos (en dispersión de las semillas) parecen flores de madera; semillas aladas (sámaras), ortodoxa.

2.1.3. Ecología

(Cabrera y Ordoñez 2004), mediante estudios realizados en la “ECSF” indican que esta especie inicia la formación de botones florales a principios del mes de octubre, alcanzando su máxima intensidad a fines de enero; en Ecuador se encuentran en las formaciones boscosas de la sierra y oriente, entre los 1 800- 3 200 m de altitud, cubriendo zonas especialmente de Loja, Saraguro y Sozoranga.

2.1.4. Usos

Muy importante por su madera, se usa para construcción, artesanías, muebles, interiores y carpintería. En Colombia se utiliza el cocimiento de la corteza para lavatorios de úlceras y el lavado bucal contra el dolor de dientes (Loján 2003)

2.1.5. Categoría de Amenaza

El Libro Rojo de plantas de Colombia de especies maderables amenazadas (2006) reporta a la especie *C. montana*, en la categoría (NT) “Casi Amenazado” según las normas de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales).

2.2. Generalidades de la Biotecnología

La biotecnología es un conjunto de técnicas que involucra varias disciplinas y ciencias (biología, bioquímica, genética, virología, agronomía, ingeniería, química, medicina y veterinaria entre otras). En términos generales biotecnología es el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre. Esta definición implica una serie de desarrollos en técnicas de laboratorio que, durante las últimas décadas, han sido responsables del tremendo interés científico y comercial en biotecnología, la creación de nuevas empresas y la reorientación de investigaciones y de inversiones en compañías ya establecidas y en Universidades (www.abcagro.com)

2.2.1. Biotecnología Vegetal

La biotecnología vegetal permite la transferencia de una mayor variedad de información genética de una manera más precisa y controlada. En la base de las nuevas biotecnologías desarrolladas están las técnicas de aislamiento de células, tejidos y órganos de plantas y el crecimiento de estos bajo

condiciones controladas (*in vitro*). Existe un rango considerable de técnicas disponibles que varían ampliamente en sofisticación y en el tiempo necesario para producir resultados útiles (www.abcagro.com)

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* consiste en cultivar pequeños segmentos de la planta (explantes) sobre medios sintéticos en condiciones controladas, con el propósito de regenerar plantas enteras. Para el cultivo de material vegetal separado de la planta es necesario adicionar al medio los nutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento que las células, tejidos u órganos recibirían a través de las raíces o de los órganos fotosintetizadores de la planta.

2.3. Micropropagación *in vitro*

2.3.1. Micropropagación

Es la técnica que permite el desarrollo masivo de nuevas plantas en medios artificiales, bajo condiciones asépticas, a partir de porciones muy pequeñas de plantas (embriones, segmentos, tallos, polen, etc.). Por otra parte, es el resultado de la proliferación de brotes, que son multiplicados en condiciones asépticas y elementos químicos para su desarrollo ideal, (Hartman y Kester 1990). Las bases de la micropropagación *in vitro* fueron sentadas por (Murashige 1974, 1977), en tanto que en varias revisiones de literatura se han publicado numerosos protocolos al respecto, en diferentes especies cultivadas y silvestres (Tomes *et al.*, 1982; Villalobos *et al.*, 1982; Torres y Caldas, 1990; Roca y Mroginski, 1991; Villalobos & Thorpe; 1991; George, 1993; Delgado y Rojas, 2001).

2.3.2. Establecimiento de cultivo *in vitro*

Los cultivos *in vitro* pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta. Sin embargo, la fuente inicial de material vegetal es determinante para el éxito en el establecimiento de los mismos y se aconseja utilizar plantas sanas y vigorosas (Jiménez 1998).

Las condiciones de cultivo no sólo se adecúan para que las células crezcan y se dividan rápidamente sino también para que la mayor parte de ellas expresen su capacidad de rediferenciación y biosíntesis para una o varias sustancias de interés (Endress 1994). En varios de los estudios sobre cultivos de células y tejidos vegetales esto se ha tratado de resolver variando los componentes de los medios de cultivo y las condiciones físicas y fisicoquímicas de los procesos, aprovechando las ventajas que ofrece la rápida respuesta de las células *in vitro* ante pequeños cambios en su medio ambiente con respecto a las plantas crecidas por métodos tradicionales (Calva y Pérez 2005).

2.3.3. Factores que intervienen en la micropropagación

El éxito de establecer cultivos viables, está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explanto, (Olmos *et al.* 2004).

El cultivo se incuba bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen el desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones. Los callos obtenidos mediante este procedimiento pueden subcultivarse para su mantenimiento y propagación o inducir su diferenciación para formar órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o pasarse a un medio de cultivo líquido para obtener células y pequeños agregados en suspensión.

Los cultivos se mantienen bajo las mismas condiciones físicas y fisicoquímicas usadas para la inducción de callos. Los cultivos de órganos se puede rediferenciar hasta plantas completas (micropropagación) que luego se transfieren a invernadero (Calva y Pérez 2005).

2.3.3.1. Factores externos

a) Planta donante

La selección de la planta donante es fundamental en la reproducción clonal; la planta “plus” o “élite” debe ser rigurosamente seleccionada, pues es determinante en el éxito del cultivo de células. Con un material cuidadosamente seleccionado cada especie conserva su homogeneidad y permite mantener el paso de las generaciones (Ortega 1992).

b) Edad de la planta

Los tejidos embrionarios generalmente tienen una alta capacidad regenerativa, conforme una planta envejece su capacidad regenerativa tiende a disminuir, por lo que se tiende a utilizar material procedente de plantas jóvenes. Los vástagos se regeneran más fácilmente cuando se toman de la parte basal de un árbol, debido a que esta zona posee el carácter juvenil, (Pierik 1990).

c) Estado fisiológico

Este tiene un fuerte efecto sobre la división celular y la regeneración *in vitro*. En general los fragmentos de plantas de estado vegetativo regeneran *in vitro* con más facilidad que los fragmentos de plantas en estado generativo, aunque se puede encontrar algunas excepciones (Ortega 1992).

d) Estado sanitario

Existe más probabilidad de éxito en un cultivo *in vitro*, si la planta tiene un buen estado de salud en el momento del aislamiento. Si se debe elegir entre individuos de un mismo clon, se deben escoger los más sanos como material experimental, ya que esto repercute sobre el porcentaje de infección después del aislamiento, (Ortega 1992).

2.3.3.2. Factores ambientales de incubación

a) Luz

Se considera la duración del día, irradiación y composición espectral; la duración del día se establece entre 14 y 16 horas, aunque también se usa luz continua; para la composición espectral de la luz, se utiliza tubos fluorescentes del tipo blanco frío (Pierik 1990).

b) Temperatura

La temperatura se mantiene constante de 24 a 26°C, dependiendo de la especie experimental, se elige una temperatura más baja 18 °C para especies bulbosas, o una temperatura más alta de 28-29 °C para especies tropicales (Pierik 1990).

c) Humedad

Se sabe que la humedad dentro de los cultivos es alta por la condensación de las paredes de los tubos de ensayo; la humedad del aire del área de incubación solo influirá en la pérdida de agua de los tubos (Pierik 1990). En cambio (Roca y Mroginski 1991), señalan que la humedad dentro del área de incubación puede ser de 70 - 80%.

d) Oxígeno

Para el buen crecimiento de células y tejidos, la buena aireación es un factor importante, por esta razón es frecuente el uso de aparatos y agitadores. El suministro de oxígeno no se puede facilitar suministrando tapones metálicos, realizando inoculaciones apolares, utilizando medios líquidos, o, inocular sobre puentes de papel, bajo estas condiciones el explante obtiene el oxígeno de las moléculas que se encuentran en el agua del medio de cultivo.

2.3.3.3. Medio de cultivo.

Con el medio de cultivo se logra abastecer de nutrimentos al tejido, células u órganos que se desarrollan en él; esta alimentación exógena que requiere el explante es necesaria por el hecho de que las células son heterótrofas.

Un medio de cultivo básicamente está compuesto por carbono, nutrimentos minerales y vitaminas; sin embargo, en la mayoría de los casos los tres tipos de sustancias que anotamos antes, no son suficientes para el buen desarrollo del cultivo, por lo que se hace necesario, completar los medios con regulaciones de crecimiento (auxinas y citocininas) y otros compuestos como aminoácidos, precursores de aminoácidos, antioxidantes, carbón activado, etc. (Roca y Mroginski 1991).

a) Macronutrientes

Los macronutrientes están compuestos de las sales minerales del medio de cultivo MS Murashige y Skoog (1962), los que incluyen las siguientes sales: nitrato de amonio, nitrato de potasio, sulfato de magnesio, fosfato ácido de potasio y cloruro de calcio (Cuadro 1); sin embargo, es posible utilizar otras formulaciones como por ejemplo los macronutrientes del medio de cultivo B5 (Gamborg *et al.* 1968) e incluso modificaciones de las sales minerales MS, tales como macronutrientes MS/2, MS/5 y MS/10.

b) Micronutrientes

Están compuestos de las sales minerales del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), las que incluyen las siguientes sales: sulfato de manganeso, sulfato de zinc, ácido bórico, ioduro de potasio, molibdato de sodio, sulfato de cobre, cloruro de cobalto, etilendiaminotetracético de sodio y sulfato de hierro (Cuadro 1); sin embargo, es posible utilizar otras formulaciones como por ejemplo los micronutrientes del medio de cultivo B5 (Gamborg *et al.* 1968).

c) Carbono

Como fuente de carbono en los medios de cultivo se utiliza normalmente sacarosa, constituyendo un componente esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, en concentraciones que van desde 1 a 5%; también se puede usar glucosa y en menor medida fructuosa, dependiendo mucho del tipo del material vegetal (Pierik 1990).

d) Reguladores de crecimiento

Las sustancias reguladoras de crecimiento según (Pierik 1990), afirma que es un conjunto de productos sintéticos que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, como también a las hormonas que son compuestos orgánicos sintetizados por las mismas plantas.

En el cultivo de tejidos, los reguladores de crecimiento son muy importantes, especialmente las auxinas y las citocininas. Si a un medio de cultivo se le debe añadir una auxina o una citocinina para conseguir la extensión y/o división celular depende del tipo de explante y de la especie vegetal. En las plantas que producen mayor cantidad de auxinas y/o citocininas no necesitan de ninguna aplicación exógena; desde este punto se puede hacer la siguiente división: cultivos que no necesitan ni auxinas ni citocininas, cultivos que necesitan solo auxinas, cultivos que necesitan solo citocininas (Pierik 1990).

1) Las auxinas. Las auxinas producen elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación de callos), formación de raíces adventicias e inhibición de la formación de vástagos adventicios y axilares. Tienen dos orígenes, auxinas naturales AIA y auxinas sintéticas como ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) y ácido diclorofenoxiacético (2,4-D).

2) **Las citocininas** se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, inducen la formación de vástagos adventicios; sin embargo, inhibe la formación de raíces, promueven la formación de vástagos axilares, además, promueve procesos de morfogénesis, la expansión foliar, y el desarrollo de los cloroplastos, mejorando el desarrollo vegetativo (Davies, 1995). Este tiene dos orígenes, uno natural como la Zeatina (ZEA) y otros sintéticos como Benziladenina (BAP) y Kinetina (KIN).

3) **Ácido Abscísico (ABA)** provoca respuestas que ayudan a proteger a las plantas contra estos factores, como el cierre de estomas y la producción de proteínas protectoras. También participa en la embriogénesis normal y en la formación de proteínas de almacenamiento en semillas. Estas características pueden utilizarse en cultivo *in vitro* para producir metabolitos de reacción al estrés, para retrasar el crecimiento y para moderar los efectos de auxinas y citocininas (Rosales *et la* 2004).

e) Vitaminas

(Pierik 1990), menciona que la mayor parte de las plantas son capaces de sintetizar *in vitro* sus propias vitaminas, por lo que surge la duda de adicionar a los medios de cultivo mezclas de vitaminas. (Roca y Mroginski 1991), señalan que probablemente solo se necesitan la inoculación de tiamina (vitamina B1).

f) Agente Gelificante

El más utilizado es el agar, un derivado de alga marina, polisacárido, con elevada masa molecular, no contiene materiales tóxicos y resulta ser el componente más caro de los medios nutritivos sólidos. El agar disuelto forma un gel capaz de retener el agua y absorbe compuestos, la concentración usual del agar es de 0,6 a 0,8% (Pierik 1990).

2.4. Morfogénesis Vegetal

La morfogénesis conduce a la embriogénesis somática y la organogénesis y es el resultado de una organizada división y diferenciación celular con patrones definidos y que dependen básicamente de la actividad y expresión de ciertos genes. Cuando se realiza el cultivo de tejidos, el control de la morfogénesis se realiza a través de la incorporación exógena de compuestos hormonales y otros elementos nutricionales. Al ser colocado un fragmento de tejido en un medio de cultivo posibilita la liberación de las células del control a que están sometidas en el organismo vivo y se readquiere la capacidad de división celular (Zapata 1994).

La embriogénesis somática, en tanto, es la capacidad de ciertas células vegetales para formar embriones; estos embriones somáticos germinan y dan origen a individuos completos con el fenotipo de la planta donante de la célula inicial (Pérez *et al.* 1999).

2.4.1. Organogénesis

La organogénesis consiste en la formación de *novo* de órganos (raíces y/o brotes adventicios) en los explantos cultivados *in vitro*. El proceso involucrado en la transformación de una célula a una planta u órgano, en ese entonces lo llamaron diferenciación celular, pero actualmente se denomina organogénesis (Calva y Pérez 2005); consiste en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema y el desarrollo de ese primordio en brotes vegetativos que luego enraízan vía la formación y proliferación de meristemas radicales. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (Jiménez y González 1998) y la organogénesis generalmente ocurre por la optimización de la relación citocinina - auxina en el medio de cultivo y ocurre por la diferencia de órganos.

a) Organogénesis directa

Consiste en la capacidad que tiene un tejido ya formado (hoja, raíz o estructura reproductiva) de originar directamente (gracias a factores nutricionales y hormonales del medio de cultivo) un nuevo órgano, como por ejemplo brote o raíz (Roca y Mroginski 1991).

b) Organogénesis indirecta:

Es el proceso mediante el cual un tejido puede originar un órgano (brote, raíz), pero pasando por una etapa denominada callo, el cual se diferenciará gatillando por los factores del medio de cultivo a la formación de órganos (Roca y Mroginski 1991).

2.4.2. Embriogénesis Somática

Es una ruta alternativa a la organogénesis para obtener embriones somáticos. Un embrión somático se forma en el cuerpo de la planta por los diferentes tratamientos, son estructuras bipolares. Para que se forme un embrión somático, hay que inducirlo, el principal inductor son las hormonas. Entre las ventajas que ofrece la embriogénesis somática está, la posibilidad de obtener volúmenes de producción superiores en un menor tiempo, lo cual convierte a este sistema en una vía de regeneración potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis. Además, la disponibilidad de protocolos para la obtención de embriones somáticos es clave para la automatización de la micropropagación y la consecuente reducción de costos para su implementación a escala comercial (Celestino *et al.* 2005)

La característica sobresaliente de los embriones somáticos es que se desarrollan de células somáticas y por lo tanto, presentan la potencialidad de producir duplicados de un genotipo específico; esta característica permite la multiplicación de células somáticas a las cuales se les han introducido genes específicos por ingeniería genética y así, los individuos genéticamente

modificados pueden ser multiplicados en forma segura y eficiente, evitando los riesgos de incorporación de genes extraños mediáticamente inestables en el resto del germoplasma, (Artola 2004, citado por Pérez 2010).

a) Embriogénesis somática directa

La vía directa, involucra la formación de los embriones somáticos en una parte del tejido del explante sin la formación de callos. Ya que las células dentro de un embrión cigótico son de por si embriogénicas, es posible inducir las para que estas se dividan para formar un embrión somático. En este caso, las células pre-existentes se dividen directamente para formar un embrión somático. Éstas se conocen como Células Embriogénicas Pre-Determinadas, (Parrott 2002, citado por Pérez 2010).

b) Embriogénesis somática indirecta

La vía indirecta, que requiere una fase intermedia de callo formado por un conjunto de diferentes tipos de células no organizadas y que conservan la capacidad de dividirse. Una vez organizado el callo éste prolifera, se inicia la formación de pro-embryones, usualmente en este medio de cultivo con altas concentraciones de auxinas y luego se transfieren los callos a un medio de cultivo con menores concentraciones de reguladores del crecimiento para inducir la formación de los embriones somáticos a partir de los pro-embryones iniciales, (Parrott 2002, citado por Pérez 2010).

2.5. Conservación

2.5.1. Conservación *in situ*

Conservar la biodiversidad *in situ* consiste en proteger los ecosistemas naturales manteniendo las poblaciones de las especies que los componen o recuperándolas si se han deteriorado. La conservación *in situ* de especies

cultivadas se refiere a mantenerlas en los sitios en donde han desarrollado sus características (Baena *et al* 2003).

2.5.2. Conservación *ex situ*

La conservación *ex situ* se refiere al mantenimiento de los organismos fuera de su hábitat natural, conservando las especies amenazadas y los recursos genéticos. Mediante los métodos de cultivo *in vitro* se logra generando cambios en el ambiente de cultivo que permite desacelerar el crecimiento de las células y de los tejidos, (Scocchi y Hebe 2004).

2.5.3. Bancos de germoplasma

Los bancos de germoplasma son centros orientados al almacenamiento mediante propágulos de una parte representativa de la variabilidad genética correspondiente a una determinada especie. Dentro de esta categoría podemos distinguir los bancos de semillas, los bancos de cultivo *in vitro*, los bancos de polen y los bancos de genes o bancos de ADN, (Iriondo 2001).

2.5.4. Conservación *in vitro*

Hay dos sistemas básicos de conservación de germoplasma *in vitro*, uno mediante la limitación del crecimiento hasta tasas mínimas y otro mediante la supresión total del crecimiento y del metabolismo celular (Roca *et al.* 1989).

La conservación *in vitro* de germoplasma puede realizarse utilizando ápices caulinares y segmentos nodales siguiendo las siguientes estrategias: conservación mediante crecimiento a tasas normales, conservación por limitación del crecimiento a tasas mínimas y conservación por supresión total del crecimiento (crioconservación). La importancia de la conservación *in vitro* adquiere singular interés cuando la semilla sexual es de naturaleza recalcitrante, es decir, no puede conservarse reduciendo drásticamente el

contenido de humedad ni sometiéndola a temperaturas bajas (10, -10 o -20 °C) (Delgado y Rojas 2001). La limitación del crecimiento consiste en mantener los cultivos (yemas o plántulas) en condiciones físicas o químicas que permitan extender al máximo el intervalo la transferencia a los medios de cultivo frescos, sin que ello afecte la viabilidad del cultivo. Esto puede controlarse empleando los siguientes factores: temperatura, nutrientes inorgánicos y orgánicos, reguladores de crecimiento y concentración osmótica del medio, (Roca *et al.* 1989).

Para la conservación de germoplasma debe considerarse la naturaleza del material vegetal, que está definida por la duración de su ciclo de vida, el modo de reproducción y el tamaño de sus individuos (Scocchi y Rey 2007), así como las modificaciones de las condiciones del cultivo que influyen sobre la velocidad de la división celular, el crecimiento normal y el metabolismo, reduciendo la frecuencia de transferencia de las plantas a un medio de cultivo fresco (Roca *et al.*, 1991; García-Águila *et al.*, 2007), con la finalidad de reducir en lo posible el elevado número de variables que implica estas transferencias del cultivo *in vitro* como: riesgos de alteración genética, costos en tiempo, pérdida por accidente o contaminación de los explantes, mano de obra, entre otras, (Pérez 2010).

Otros factores como el tamaño de los frascos, la cantidad y la concentración del agente gelificante, la concentración del carbono en el medio de cultivo, la limitación de la oxigenación, la intensidad de la luz, temperaturas bajas (Withers, 1980) y el control del fotoperíodo, entre otros, son importantes en la supresión del crecimiento de los cultivos *in vitro*, (Roca *et al.* 1989). La conservación, dependiendo de la duración del almacenamiento, puede ser a corto, mediano o largo plazo, con el objetivo de reducir la velocidad del crecimiento del material vegetal, pero que garantice su estabilidad genética y viabilidad (García-Águila *et al.*, 2007).

3. METODOLOGÍA

3.1. Localización y descripción del área de estudio

3.1.1. Ubicación geográfica, política y localización del Laboratorio de Micropropagación Vegetal

El Laboratorio de Micropropagación Vegetal del Área Agropecuaria y de los Recursos Naturales no Renovables se encuentra ubicado a 3 km de la ciudad de Loja.

Situado geográficamente en las siguientes coordenadas:

Latitud: 04° 00' 00" S

Longitud: 79° 12' 00" O

De acuerdo a la clasificación ecológica de (Holdridge 1999) corresponde a la zona de vida Bosque Seco Montano Bajo (bs-MB), su temperatura media anual es de 15,3° C, con una precipitación de 757,5 mm y una humedad relativa de 71,96 %. Su altitud es de 2 135 msnm.

3.2. Metodología para micropropagar *C. montana* a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de plántulas obtenidas por germinación de semillas in vitro

3.2.1. Fase de campo

3.2.1.1. Recolección de las semillas

Se colectaron semillas de *C. montana*, de árboles élitos con las siguientes características fenotípicas: i) copa grande sin competencia, ii) fuste recto, sano y grueso, iii) capacidad y edad para producir, iv) buen estado fitosanitario, v) facilidad de recolección de frutos y cuando haya alcanzado la madurez fisiológica. La colecta se realizó en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Loja, Pueblo Nuevo y en la ruta Sabanilla – San Juan del Oro perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe.

Las semillas se colectaron de frutos maduros en proceso de dehiscencia y directamente de los árboles, con la utilización de la podadora aérea y equipos de escalar (cuerdas y arnés). Entre los meses agosto 2010 y mayo 2011. Una vez colectados los frutos fueron etiquetados y posteriormente transportados hasta el laboratorio para el estudio respectivo.

3.2.2. Fase de laboratorio germinación de semillas in vitro

3.2.2.1. Selección y desinfección de semillas

Se seleccionó semillas, en buenas condiciones fisiológicas y fitosanitarias, las que antes de cultivarse *in vitro*, con unas tijeras, se removió parte del ala que semeja al pericarpio de un fruto sámara, y esto con la finalidad de reducir la tasa de contaminación.

La desinfección de semillas, se realizó en la cámara de flujo laminar de aire esterilizado previamente desinfectada con alcohol etílico 70%. Alrededor de 30 semillas por frasco fueron desinfectadas utilizando alcohol etílico 70%

durante 1 min y posteriormente hipoclorito de sodio (lejía comercial 5,25% de cloro activo) en proporción 1:1 con agua destilada, durante 15 min. Tanto el alcohol etílico como el hipoclorito de sodio fueron removidos con 3 enjuagues con agua destilada esterilizada.

3.2.2.2. Medio de cultivo para la germinación de semillas *in vitro*.

La formulación del medio de cultivo se realizó con las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) (Cuadro1), suplementadas con las vitaminas tiamina.HCl 1 mg/L y m-inositol 100 mg/L, sacarosa 2% y ácido giberélico (AG₃) 0, 1 y 2 mg/L (Cuadro 2). En la preparación del medio de cultivo se utilizó agua destilada esteril, suplementada con los componentes indicados; luego se ajustó el pH a $5,8 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio (NaOH) 1N y ácido clorhídrico (HCl) 1N. Posteriormente, se calentó el medio de cultivo para incorporar el agar y una vez diluido y aún caliente, se dispensó, en frascos de vidrio (de 10 cm de altura y 6 cm de diámetro y 250 ml de capacidad), la cantidad de 25 ml por frasco; después se cerró con tapas metálicas y llevó al autoclave para ser esterilizados a 121°C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión durante 20 min. Una vez enfriados los frascos se utilizaron en la siembra de semillas.

Además, se realizó dos ensayos adicionales para la germinación de semillas *in vitro*, en el primero se colocó algodón esterilizado dentro de frascos de vidrio de 250 ml, posteriormente se le adicionó 30ml de medio de cultivo MS con 2mg/L de AG₃ y el segundo se lo realizó colocando caballetes en tubos de ensayo aplicando la misma formulación, los ensayos en mención no contienen agar; finalmente, se llevó al autoclave para ser esterilizados a 121°C de temperatura y 15 kg/cm² de presión durante 20 min; se sacó los frascos y tubos dejamos reposar por una hora y finalmente se lleva a la cámara de flujo laminar a realizar a siembra de semillas.

3.2.3. Siembra de semillas

Las semillas fueron sembradas a razón de 2 unidades por frasco con orientación del meristema radicular hacia abajo, después de dos días se procedió a cambiar de lugar a las semillas por el problema de fenolización que presentaron. En el proceso del cultivo *in vitro* se utilizaron pinzas esterilizadas a la llama del mechero de alcohol y una máscara de protección buco-nasal, previa desinfección de manos y brazos con alcohol etílico 70%. En el caso de los ensayos adicionales la siembra de semillas a razón de 3 semillas por frasco y 1 por tubo.

Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), utilizado en el cultivo de tejidos de *C. montana*.

Solución Madre	Componentes	Mg/L
NITRATOS	Nitratos de amonio	1 650
	Nitratos de potasio	1 900
	Sulfato de magnesio	370
SULFATOS	Sulfato de manganeso	16,9
	Sulfato de zinc	8,6
	Sulfato cúprico	0,025
HALOIDES	Cloruro de calcio	440
	Yoduro de potasio	0,83
	Cloruro de cobalto	0,25
P,B,Mo	Fosfato de potasio	170
	Ácido bórico	6,20
	Molibdato de sodio	0,25
Na Fe EDTA	Sulfato ferroso	27,80
	Ácido etilendiaminocético	37,30

Cuadro 2. Diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG₃) utilizadas en la germinación de semillas de *C. montana*.

Tratamiento	AG₃ (mg/L)
T0	0,0
T1	1,0
T2	2,0

Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar para evaluar el porcentaje de semillas germinadas, en tres tratamientos bajo la acción del AG₃, en concentraciones de 0, 1 y 2 mg/L, con cincuenta repeticiones en cada tratamiento. Las unidades experimentales fueron frascos de vidrio de 250 ml de capacidad, cada uno con 2 semillas cultivadas *in vitro*.

Especificaciones del diseño experimental:

Número de tratamientos	3
Número de unidades experimentales por tratamiento (frasco)	25
Número total de unidades experimentales (frasco)	75
Numero de semillas por unidades experimentales (repeticiones)	5
Número total de semillas	150

Variables analizadas:

Porcentaje de semillas germinadas
 Porcentaje de semillas no germinadas
 Porcentaje de semillas infectadas por hongos y/o bacterias
 Porcentaje de mortalidad

Hipótesis:

Ho: El efecto del ácido giberélico, aplicado a las semillas en diferentes concentraciones no influye en la germinación de semillas.

Hi: El efecto del ácido giberélico, aplicado a las semillas en diferentes concentraciones influye en la germinación de semillas.

3.2.4. Medio de cultivo para la proliferación de ápices caulinares y segmentos nodales

El medio de cultivo para proliferación de ápices caulinares y segmentos nodales fue similar al medio de cultivo de germinación de semillas con la diferencia que en éste medio de cultivo se ensayaron diferentes concentraciones de las citocininas benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN) y 2-isopentiladenina (2iP) (Cuadro 3).

Durante el proceso, los ápices caulinares de 1 a 1,5 cm de altura, procedentes de plántulas obtenidas por germinación de semillas, después de 5 semanas, fueron removidos en condiciones de asepsia con ayuda de pinzas y escarpelos con hojas de bisturí N° 10, previamente esterilizados a la llama del mechero. El cultivo se realizó en frascos de vidrio con la cantidad de 25 ml del medio de cultivo formulado para tal fin.

Cuadro 3. Diferentes concentraciones de las citocininas benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN) y 2-isopentiladenina (2iP) en la formación de brotes y elongación de ápices caulinares y segmentos nodales de *C. montana*.

Tratamiento	BAP	KIN (mg/L)	2iP
T0	0	0	0
T1	1,0	0	0
T2	2,0	0	0
T3	0	1,0	0
T4	0	2,0	0
T5	0	0	1,0
T6	0	0	2,0

3.2.4.1. Diseño experimental

Para evaluar el efecto que tiene las citocininas en los ápices caulinares se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Las unidades experimentales fueron frascos de vidrio, cada uno con tres explantes.

Especificaciones del diseño experimental:

Unidad experimental (frasco)	1
Número de explantes por frasco	3
Número de tratamientos	7
Número de frascos por tratamiento	4
Número de repeticiones	1
Número total de unidades experimentales	56
Número total de explantes	105

Variables analizadas:

Porcentaje de contaminación
 Porcentaje de mortalidad
 Porcentaje de explantes vivos
 Porcentaje de fenolización
 Porcentaje de proliferación
 Número de brotes formados/ explante
 Tamaño del brote (mm)
 Número de hojas del brote
 Número de nudos/brote

Hipótesis:

Ho: La aplicación de diferentes concentraciones de las citocininas benzilaminopurina, Kinetina y 2-isopentiladenina, no promueven la división celular para la formación de brotes de los ápices caulinares de *C. montana*.

Hi: La aplicación de diferentes concentraciones de las citocininas benzilaminopurina, Kinetina y 2-isopentiladenina, promueven la división celular para la formación de brotes de los ápices caulinares de *C. montana*.

3.2.5. Enraizamiento de ápices caulinares

Los ápices caulinares y segmentos nodales, obtenidos del ensayo de proliferación de cuatro meses de cultivo, se subcultivaron en el medio de

cultivo de enraizamiento formulado para tal fin, ensayándose tanto las concentraciones de las sales minerales MS enteras y a la mitad, como la auxinas ácido indolbutírico (AIB) y ácido indolacético (AIA), en diversas concentraciones como se muestra en el Cuadro 4 .

Cuadro 4. Diferentes concentraciones de las auxinas ácido indolbutírico (AIB) y ácido indolacético (AIA) en medio MS completo y a la mitad, para el enraizamiento de ápices caulinares de *C. montana*.

Tratamiento	MS	AIB		AIA
		(mg/L)		
T0	1	0	0	0
T1	1	0,5	0	0
T2	½	0,5	0	0
T3	1	1,0	0	0
T4	½	1,0	0	0
T5	1	0	0,5	0,5
T6	½	0	0,5	0,5
T7	1	0	1,0	1,0
T8	½	0	1,0	1,0

3.2.5.1. Condiciones ambientales de incubación

Tanto para la germinación de semillas como para el proliferación y enraizamiento de los ápices caulinares, la temperatura de incubación se ajustó entre 20-26 °C y el fotoperiodo de 16/8 horas (día/noche). La irradiancia fue proporcionada con lámparas fluorescentes de 40 W tipo luz del día con alto contenido de color azul. Para el caso de la germinación de semillas la irradiancia fue de 2 W.m⁻², en tanto que para la elongación y enraizamiento de los ápices caulinares fue de 8-10 W.m⁻².

3.2.5.2. Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar para evaluar nueve tratamientos con diez repeticiones cada uno, en el enraizamiento de los ápices caulinares aplicando auxinas.

Especificaciones del diseño experimental:

Unidad experimental (frasco)	1
Número de tratamientos	9
Número de explantes por unidades experimentales	2
Número de unidades experimentales por tratamiento	5
Número total de unidades experimentales	45
Número de repeticiones	2
Número total de explantes	90

Variables analizadas:

Porcentaje de contaminación
 Porcentaje de mortalidad
 Número de hojas formadas
 Número de raíces formadas
 Altura de la planta (mm)
 Longitud de las raíces (mm)
 Número de brotes formados
 Número de explantes con raíz

Hipótesis:

Ho: El efecto de las auxinas ácido indolbutírico y ácido indolacético en diferentes concentraciones no promueven el enraizamiento de ápices caulinares de *C. montana*.

Hi: El efecto de las auxinas ácido indolbutírico y ácido indolacético en diferentes concentraciones promueven el enraizamiento de ápices caulinares de *C. montana*.

3.2.5.3. Análisis estadístico

Los datos se tomaron cada 30 días por un periodo de 4 meses donde se registró la contaminación, mortalidad, número de hojas formadas, número de raíces formadas, altura de la planta (mm), longitud de las raíces (mm) y

número de brotes formados. Los datos se analizaron con el modelo estadístico Anova en el Programa SPSS 2011 mediante la prueba de Tukey, con un intervalo de confianza de 95% puesto que son métodos adecuados para establecer diferencias significativas entre tratamientos.

3.3. Metodología para evaluar la inducción de callos, friables y compactos, a partir de diversos explantes como cotiledones, hipocótilos y raíces

3.3.1. Extracción y desinfección del material vegetal

El proceso de aislamiento de los explantes, constituidos por fragmentos de cotiledones, hipocótilos y raíces, de plántulas *in vitro* obtenidas de la germinación de semillas, se desarrolló en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar de aire esterilizado, utilizando para ello cajas de Petri, pinzas y scalpels con hojas de bisturí N° 10 y 22, previamente esterilizados a la llama del mechero de alcohol etílico.

En el proceso de disección los cotiledones fueron seccionados en fragmentos de 1 cm² de superficie y los hipocótilos en fragmentos de 1 cm de longitud. Los explantes fueron inoculados en el medio de cultivo MS formulado para tal fin. La desinfección de los explantes no se realizó, debido a que por provenir de plántulas obtenidas de semillas germinadas *in vitro*, la asepsia se considera *per se*.

El medio de cultivo utilizado en la inducción de callos, además de las sales minerales MS, vitaminas y sacarosa, se suplementó con las auxinas ácido naftaleneacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en las concentraciones 1 y 2 mg/L, para cada auxina (Cuadro 5).

Cuadro 5. Diferentes concentraciones de las auxinas ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D) ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) para la inducción de callos de *C. montana*.

Tratamiento	2,4-D	ANA	AIA
		(mg/L)	
T0	0	0	0
T1	1,0	0	0
T2	2,0	0	0
T3	0	1,0	0
T4	0	2,0	0
T5	0	0	1,0
T6	0	0	2,0

3.3.2. Condiciones ambientales de incubación

Las condiciones ambientales de incubación fueron las mismas indicadas en los procesos anteriores, con la excepción de que en este caso la incubación fue en total oscuridad.

3.3.3. Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar para evaluar el desarrollo de los callos inducidos a partir de tres explantes diferentes (cotiledones, hipocótilos y raíces), con siete tratamientos y doce repeticiones en cada tratamiento.

Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (frasco)	1
Tipos de explantes (cotiledones, hipocótilos y raíces)	3
Número de tratamientos	7
Número de explantes por unidades experimentales	3
Número de explantes por tratamiento	12
Número de repeticiones	2

Número total de unidades experimentales	42
Número total de explantes	84

Variables analizadas:

Porcentaje de contaminación

Porcentaje de mortalidad

Número de explantes que forman callos (raíces, hipocótilos y cotiledones)

Tamaño del callo:

- Sin formación:

+, callo formado en 1/4 del explante

++, callo formado en 1/2 del explante

+++, callo formado en 2/3 del explante

++++, callo formado en todo el explante

Color del callo

Grado de fenolización

Hipótesis:

Ho: El efecto de auxinas 2,4-dichlorofenoxiacético, ácido naftalenacético y ácido indolacético, en diferentes concentraciones, no inducen la formación de callos.

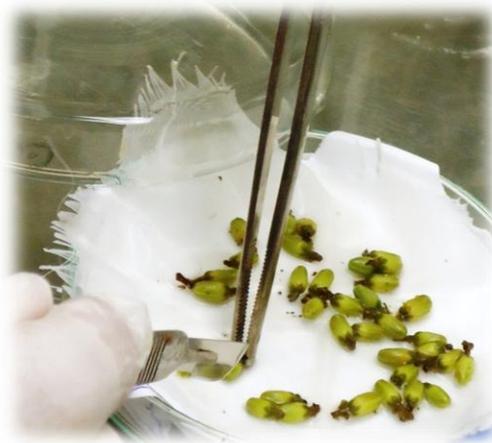
Hi: El efecto de auxinas 2,4-dichlorofenoxiacético, ácido naftalenacético y ácido indolacético, en diferentes concentraciones, inducen la formación de callos.

3.4. Metodología para inducir diversos procesos morfogénicos (organogénesis y/o embriogénesis somática) a partir de diversos explantes como cotiledones, hipocótilos y raíces

3.4.1. Extracción y desinfección del material vegetal

3.4.1.1. Extracción de explantes obtenidos de Flores

Se colectaron flores directamente del árbol, con la ayuda de una podadora aérea; luego fueron colocadas en una pequeña bolsa confeccionada con tul, conteniendo 20 flores, y cada bolsa de tul se colocó en un frasco de vidrio. El proceso de desinfección se realizó en la cámara de flujo laminar, previamente desinfectada con alcohol etílico 70%; las flores fueron desinfectadas utilizando alcohol etílico 70% durante 10 segundos y posteriormente hipoclorito de sodio (lejía comercial 5,25% de cloro activo) en proporción 1:10 con agua destilada, durante 15 min. Tanto el alcohol etílico como el hipoclorito de sodio fueron removidos con 3 enjuagues con agua destilada esterilizada.



Ya desinfectadas las flores se colocaron en cajas de Petri, donde se diseccionaron por la mitad, de esta forma el lado donde se hizo el corte quedó en contacto con el medio de cultivo formulado para tal fin, a razón de 4 explantes se sembraron por frasco; para organogénesis (Cuadro 3) y para embriogénesis somática (Cuadro 5).

3.4.1.2. Extracción de explantes obtenidos de embriones zigóticos inmaduros e maduros.

Se colectó frutos sin madurar (frutos verdes de 15 semanas después de la anthesis) directamente del árbol, con la ayuda de una podadora aérea, entre los meses de abril y mayo del 2011, ubicados en la ciudadela Universitaria; posteriormente fueron lavados con detergente y luego raspados con cuchillo con el fin de eliminar la capa superior.

Ya en la cámara de flujo laminar se colocó un fruto por frasco y se desinfectó con alcohol etílico 70% e hipoclorito de sodio 1:2 durante 10 minutos, tanto el alcohol etílico como el hipoclorito de sodio fueron removidos con 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. Con la ayuda de una navaja de injertar se procedió a abrir los carpelos



y a sacar las semillas inmaduras para desinfestarlas con hipoclorito de sodio en proporción 1:9 y luego enjuagarlas con agua destilada esterilizada; seguidamente se las sumergió en solución de ácido ascórbico 100 mg/L + ácido cítrico 50 mg/L con el fin de evitar la fenolización de los explantes; las semillas fueron colocadas en cajas de Petri, donde fueron seccionadas por la mitad y con mucho cuidado se logró sacar el embrión; luego se sembró 2 embriones por frasco en el medio de cultivo formulado para tal fin embriogénesis (Cuadro 6,7) y organogénesis (Cuadro 8, 10,11)

3.4.1.3. Extracción de explantes obtenidos de Hipocótilos, cotiledones, folíolos y raíces.

El proceso de aislamiento de los explantes fue similar al de inducción de callos, es decir, el material vegetal se obtuvo de plántulas *in vitro* provenientes de la germinación de semillas, con la diferencia de que en este caso se propendió hacia la inducción de organogénesis (Cuadro3, 12,13) y/o embriogénesis somática (Cuadro 5,9).



Cuadro 6. Diferentes concentraciones de Dicamba para la inducción de callos embriogénicos de *C. montana*.

Tratamiento	Dicamba
	mg/L
T1	1
T2	3

Cuadro 7. Diferentes concentraciones de las auxinas ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D) y Dicamba para la inducción de callos embriogénicos de *C. montana*.

Tratamiento	Dicamba	2,4-D
	mg/L	
T1	1,0	0,5
T2	3,0	0,5
T3	0,5	1,0
T4	0,5	3,0

Cuadro 8. Diferentes concentraciones de extracto de maíz para la inducción de callos organogénicos de *C. montana*.

Tratamiento	Extracto de Maíz
	%
T1	20
T2	30

Cuadro 9. Diferentes concentraciones de Dicamba y agua de coco para la inducción de callos organogénicos de *C. montana*.

Tratamiento	Dicamba	Agua de coco
	mg/L	%
T1	0	20
T2	1	20
T3	3	20
T4	0	0
T5	1	0
T6	3	0

Cuadro 10. Diferentes concentraciones de citocininas benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN), más agua de coco, para la inducción de callos organogénicos de *C. montana*

Tratamiento	BAP mg/L	KIN mg/L	Agua de Coco %
T1	1,0	0	20
T2	3,0	0	20
T3	0	1,0	20
T4	0	3,0	20

Cuadro 11. Diferentes concentraciones de citocininas benzilaminopurina (BAP), más extracto de maíz y agua de coco para la inducción de callos organogénicos de *C. montana*.

Tratamiento	BAP mg/L	Extracto de maíz %	Agua de Coco %
T1	3,0	0	20
T2	3,0	20	0
T3	3,0	20	20

Cuadro 12. Diferentes concentraciones de citocinina benzilaminopurina (BAP), más Dicamba y agua de coco con el MS (TY17) coco para la inducción de callos organogénicos de *C. montana*

Tratamiento	Dicamba mg/L	Agua de Coco %	BAP mg/L
T1	3,0	20	0
T2	0	20	0
T3	0	20	3,0

Cuadro 13. Diferentes concentraciones de las citocininas benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN), 2-isopentiladenina (2iP) y sulfato de adenina, para la inducción de callos organogénicos de *C. montana*.

Tratamiento	BAP	KIN	2iP	Sulfato de Adenina
T1	1,0	0	0	5
T2	2,0	0	0	10
T3	0	1,0	0	5
T4	0	2,0	0	10
T5	0	0	1,0	5
T6	0	0	2,0	10

3.4.2. Condiciones ambientales de incubación

Las condiciones ambientales de incubación fueron las indicadas en los procesos anteriores, requiriéndose irradiancia de 10 W.m^{-2} , para el caso de organogénesis y 0 W.m^{-2} es decir en total oscuridad para el caso de embriogénesis somática.

3.4.3. Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar para evaluar el desarrollo de los callos inducidos a partir de diferentes (cotiledones, hipocótilos, raíces, embriones zigóticos maduros e inmaduros), con siete tratamientos y doce repeticiones en cada tratamiento.

Especificaciones del diseño experimental para cada caso:

Unidad experimental (frasco)	1
Tipos de explantes (cotiledones, hipocótilos y raíces)	3
Número de tratamientos	7
Número de explantes por unidades experimentales	2

Número de explantes por tratamiento	12
Número total de unidades experimentales	42
Número de repeticiones	2
Número total de explantes	84

Variables analizadas:

Porcentaje de contaminación
Inicio de formación de callos organogénicos (días)
Inicio de formación de callos embriogénicos (días)
Número de brotes formado
Número de raíces formadas
Número de embriones somáticos formados
Estadíos embriogénicos
Porcentaje de embriones somáticos que forman planta
Número de explante con callo

Hipótesis 1:

Ho: La aplicación de diferentes clases y concentraciones de auxinas no difieren en la formación de callos para la obtención de embriogénesis somática.

Hi: La aplicación de diferentes clases y concentraciones de auxinas difieren en la formación de callos para la obtención de embriogénesis somática.

Hipótesis 2:

Ho: La aplicación de diferentes clases y concentraciones de citocininas no difieren en la formación de callos para la obtención de organogénesis somática.

Hi: La aplicación de diferentes clases y concentraciones de citocininas difiere en la formación de callos para la obtención de organogénesis somática.

3.4.4. Regeneración de callos

Los mejores callos fueron cortados, subcultivados en el medio formulado para tal fin. (Cuadro 14, 15)

Cuadro 14. Efecto del BAP y compuestos orgánicos utilizados en la regeneración de órganos a partir de callos de *C. montana*.

Tratamiento	BAP mg/L	Extracto de maíz %	Agua de Coco %
T1	3,0	0	20
T2	3,0	20	0
T3	3,0	20	20

Cuadro 15. Efecto del ácido giberélico y el ácido absicóico (ABA) regeneración de órganos a partir de callos de *C. montana*.

Tratamiento	AG ₃	ABA
	mg/L	
T1	0	0
T2	5,0	0
T3	0	5,0

3.4.5. Análisis estadístico

Cada 15 días, se determinó el porcentaje de supervivencia de los explantes y las diferentes respuestas morfogénicas (formación de callo, raíces, brotes y embriones somáticos). A los 60 días de cultivo se evaluó, el porcentaje de explantes con raíz, brotes adventicios y la eventual formación de embriones somáticos, que luego se procedió a analizar estadísticamente.

3.5. Metodología para conservar el germoplasma de genotipos élités, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales, obtenidos por germinación de semillas *in vitro*.

3.5.1. Extracción y desinfección del material vegetal

El presente proceso, se realizó con las condiciones de asepsia establecidas en los procesos anteriores. Los explantes fueron plántulas obtenidas por germinación de semillas *in vitro* con raíz y sin raíz, provenientes de plántulas de 3 cm de altura incluyendo el hipocótilo.

3.5.2. Composición y preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo estuvo compuesto por las sales minerales MS y MS/2, suplementadas con varias concentraciones de sustancias inhibitoras y osmoreguladores como del ácido absicó (ABA) y manitol (MANITOL), respectivamente (Cuadro 16).

Cuadro 16. Diferentes concentraciones de ácido absicó (ABA) y MANITOL en medio de cultivo MS y MS/2 con para conservación de germoplasma de *C. montana*.

Tratamiento	Con raíz		Sin raíz	
	ABA (mg/L)	MANITOL (%)	ABA (mg/L)	MANITOL (%)
0	0	0	0	0
1	0,1	0	0,1	0
2	0,5	0	0,5	0
3	0,1	0	0,1	0
4	0,5	0	0,5	0
5	0	4	0	4
6	0	6	0	6
7	0	4	0	4
8	0	6	0	6

3.5.3. Extracción y desinfección del material vegetal

Con la ayuda de una pinza se procedió a sacar los explantes y colocarlos en una caja de Petri donde se cortó el hipocótilo a 1,5cm a partir de última hoja quedando un explante de aproximadamente 3cm, además se eliminó las hojas más grandes, no se realizó la desinfección por lo que el material se encontraban aséptico.

3.5.4. Condiciones ambientales de incubación

Las condiciones ambientales de incubación fueron similares a los procesos anteriores, con la diferencia que la irradiancia fue menor a los casos anteriores, ajustándose a 5 W.m^{-2} .

3.5.5. Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar con las siguientes descripciones:

Especificaciones del diseño experimental:

Unidad experimental	1 frasco
Número de tratamientos	18
Número de explantes por unidades experimentales	1
Número de unidades experimentales por tratamiento	10
Número total de unidades experimentales	90
Número de repeticiones	2
Número total de explantes	90

Variables analizadas:

Elongación del brote
 Desarrollo radicular
 Número de brotes formados
 Número de hojas formadas
 Número de nudos formados
 Longitud de los entrenudos

Senescencia de hojas

Abscisión de hojas

Otros aspectos fisiológicos de tallos y raíces

- – Fenolización
- – Vitrificación

3.5.6. Análisis estadístico

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado sobre la base de los dieciocho tratamientos y diez repeticiones para cada uno. Los datos se analizaron con el modelo estadístico Anova en el Programa SPSS 2011 mediante la prueba de Tukey para establecer diferencias significativas, con un intervalo de confianza de 95%, que son métodos adecuados para establecer diferenciación de los tratamientos y sobre la base de dichas variables establecer las de mayor influencia en el proceso de conservación de germoplasma.

3.5.7. Regeneración de plántulas conservadas *in vitro*.

Los explantes obtenidos de la conservación *in vitro* durante 6 meses fueron subcultivados en los medios que se explica en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Diferentes concentraciones de ácido absicico (ABA) y ácido indol-butírico (AIB) en medio de cultivo MS/2 para la regeneración de plántulas obtenidas de la conservación de germoplasma de *C. montana*.

Tratamiento	ABA	AIB
	mg/L	
T1	0,5	0
T2	0	1
T3	0,5	1

4. RESULTADOS

4.1. Fase de germinación de semillas *in vitro*

La Figura 1 muestra que el tratamiento con 2mg/L de AG₃ registró los mejores resultados de germinación con el 72 % (iniciando la emergencia radicular a los 10 días después de la siembra), y una altura promedio a los treinta días entre 5 – 7,1 cm. (Anexo1); en lo que refiere a mortalidad se obtuvo el 28 % de material vegetal infectado por hongos y bacterias (Figura1).

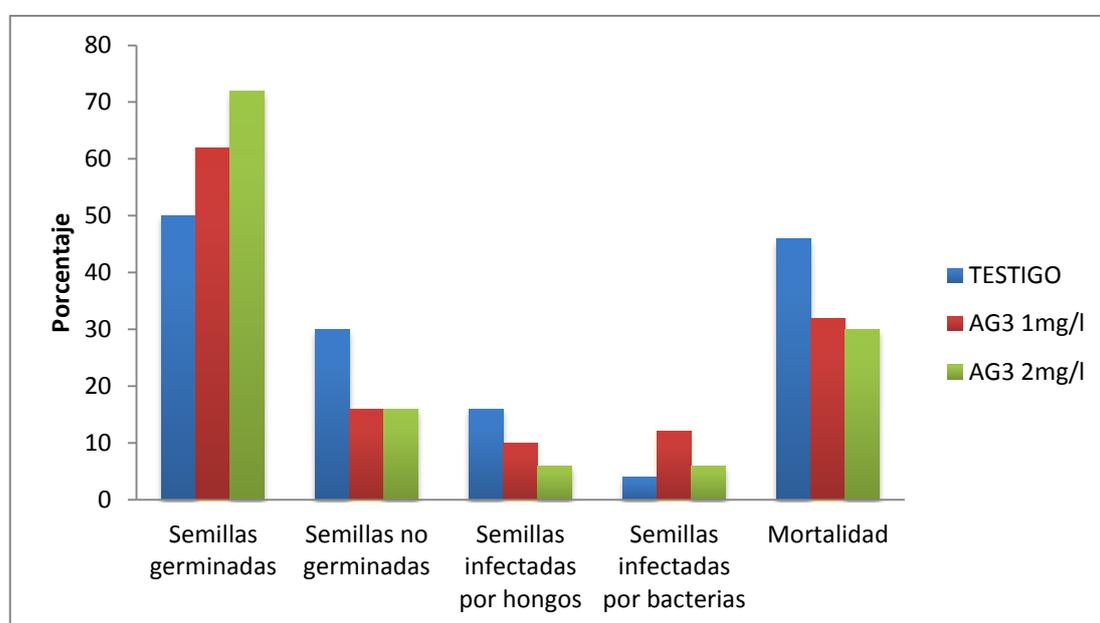


Figura 1. Germinación de semillas de *C. montana* en tres concentraciones de ácido giberélico (AG₃).

Además, en los ensayos adicionales donde se probó la germinación de semillas en frascos con algodón empapado con las sales minerales MS suplementadas con AG₃ 2mg/L, se obtuvo una tasa de germinación de 75% y la emergencia de la radícula se inició a los 12 días; también, se ensayó la germinación de semillas en tubos de ensayo, obteniéndose 40% de plántulas germinadas a los 20 días de cultivo (Figura 2).

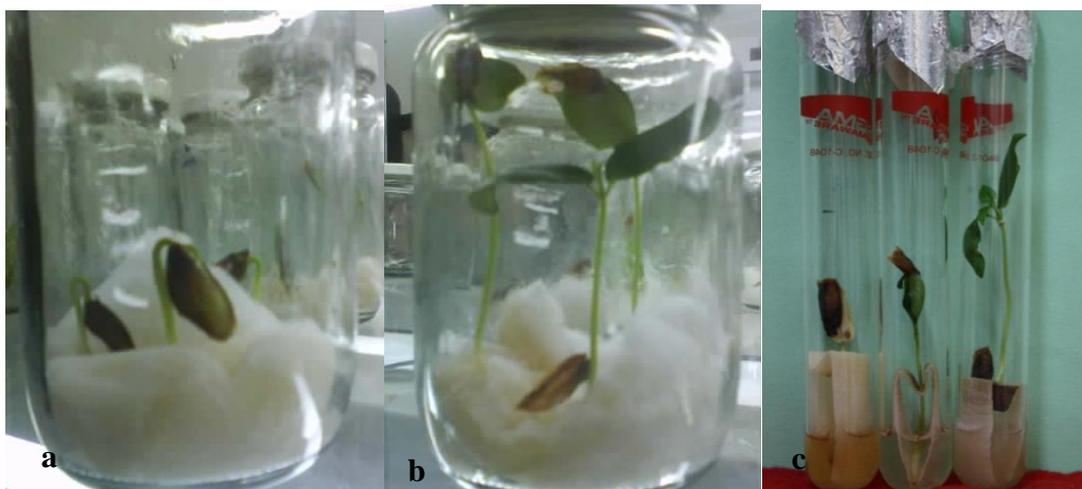


Figura 2. **a)** Germinación de semillas de *C. montana*, a los 15 días de cultivo, en algodón empapado con las sales minerales MS suplementadas con AG_3 2 mg/L. **b)** Desarrollo de plántulas germinadas en algodón a las cuatro semanas de la siembra. **c)** Proceso germinativo de semillas sembradas en tubos de ensayo con puente de papel de filtro.

4.2. Fase de proliferación

4.2.1. Proliferación Ápices caulinares

De los ensayos realizados en el cuadro 18 y como se observa en la figura 3, donde indica que a los 4 meses de evaluación el BAP en concentraciones 2 mg/L registra la mayor **proliferación** o mayor número de brotes formados (3) y tamaño del brote (6 mm); en lo que refiere al número de hojas formadas el tratamiento con 2IP en concentración de 1mg/L obtuvo el mayor valor (4); el tratamiento con BAP 2 mg/L promovió el mayor número de nudos formados (2,5) (figura 3) y **elongación** de ápices a los 4 meses de evaluación, el tratamiento de KIN con 2mg/L, es el mejor con 26,83 mm, es importante señalar que no hubo explantes fenolizados. El porcentaje de mortalidad se debe trastornos anatómicos, morfológicos y fisiológicos vitrificación y senescencia que se presentaron a los tres meses de su cultivo.

Cuadro 18. Efecto de citocininas (BAP, KIN, 2IP) en diferentes concentraciones, en tamaño del brote, desarrollo radicular, número de hojas, número de nudos y en la elongación de ápices caulinares *C. montana*.

Tratamientos		N° brotes	Tamaño	N°	N°	Elongación ápices	Mortalidad	
mg/L		Formados	del brote (mm)	Hojas	Nudos	(mm)	%	
	Testigo	1,33±0,21d	2,17±0,00b	3±0,34a	1,33±0,54a	18±2,45a	40	
A	BAP	1	2,85±0,15ab	5,00±0,26ab	3±0,61a	2,28±0,95a	40	
		2	3,00±0,4a	6,00±0,45a	3±0,32a	2,50±1,07a	25,75±2,56a	40
P	KIN	1	2,00±0,26bcd	4,33±0,95ab	3±0,49a	1,83±0,75a	26,83±2,01a	40
		2	2,60±0,16bc	4,50±0,27ab	3±0,35a	2,10±0,66a	21,30±2,95a	0
C	2IP	1	2,89±0,32ab	4,20±0,49ab	4±0,49a	2,40±1,07a	20,80±2,89a	50
		2	1,85±0,26cd	2,2±0,72b	3±0,18a	1,71±0,6a	15,29±1,78a	30

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%.



Figura 3. Presencia de mayor proliferación y elongación en el cultivo *in vitro* de *C. montana* en medio MS más 2 mg/L BAP .

4.2.2. Proliferación de Segmentos nodales

En el cuadro 19, se observan los resultados obtenidos en la inducción para la formación de brotes y la elongación del explante a los 4 meses de evaluación, así que el mayor número de brotes (2,71), hojas (3) y nudos (2) se registró con BAP 1 mg/L y en lo que refiere a elongación del brote (24mm) el mayor valor se registra con 2IP 1 mg/L en MS entero, fenolización no existió en ningún tratamiento. Cabe señalar que la mortalidad de los explantes se evidencio a los a partir de los 3 meses debido a cambios morfológicos y fisiológicos vitrificación y senescencia que se presentaron a los tres meses de su cultivo.

Cuadro 19. Efecto de citoquinas BAP, KIN, 2IP en diferentes concentraciones en la elongación del brote, desarrollo radicular, número de hojas y número de nudos de *C. montana*.

Tratamientos	N° brotes	Tamaño	N° hojas	N° nudos	Elongación del	Mortalidad %	
mg/L	Formados	de nuevo brote (mm)			brote (mm)		
N U D O S	Testigo	1,33±0,21b	2,83±0,80a	2,0±0,68a	1,3±0,21a	17,0±2,08a	40
	1	2,71±0,18a	4,86±2,04a	3,4±0,53a	2,3±0,18a	20,0±2,04a	30
	2	2,44±0,18a	4,67±0,53a	2,6±0,34a	1,8±0,22a	23,6±0,53a	10
	1	2,67±0,33a	4,83±1,83a	3,2±0,48a	2,3±0,33a	22,0±1,83a	40
	2	2,25±0,16ab	5,75±2,96a	3,0±0,33a	2,0±0,19a	23,3±2,96a	20
	1	2,60±0,24a	5,00±2,21a	3,2±0,49a	2,0±0,32a	24,0±2,21a	50
	2	2,00±0,00ab	3,80±1,17a	2,2±0,20a	1,6±0,24a	15,6±1,17a	50

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%.

4.3. Fase de enraizamiento

4.3.1. Enraizamiento ápices caulinares

El cuadro 20 muestra los valores medios del efecto de las auxinas AIB y ANA, en el desarrollo radicular, donde el mayor número y longitud de raíces formadas, 2,4 y 30,56 mm, respectivamente, se registró en el medio de cultivo conformado por las sales minerales MS $\frac{1}{2}$ (a la mitad de su concentración) suplementado con AIB 1 mg/L; en lo concerniente al número de hojas, brotes y nudos formados, 5,29; 1,86 y 5,29, respectivamente, se obtuvo los mejores resultados con AIA 0,5 mg/L. En lo referente a altura de plántula el mejor resultado fue de 28,67 mm, en el tratamiento MS más AIB 0,5 mg/L (Figura4).



Figura 4. a) Desarrollo del explante, con inducción de callo y raíces, en el medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ y AIB 1 mg/L. **b)** Explantes que no formaron raíces en medio de cultivo MS y AIA 1 mg/L.

Cuadro 20. Efecto de auxinas AIB y AIA en diferentes concentraciones, para la formación de raíces, longitud de raíces, número de hojas, brotes, número de nudos y altura del explante de *C. montana*.

Tratamientos	N° raíces	Long. Raíces (mm)	N° hojas	N° brotes formados	N° nudos	Altura (mm)
Testigo	0,0±0,00 b	0,00±0,00 a	0,30±0,21 c	1,00±0,00 b	1,30±0,15 ab	15,10±0,15 b
0,5mg/L + MS	0,7±0,42 ab	7,83±7,25 a	3,33±0,42 ab	1,33±0,21 b	2,00±0,00 ab	28,67±0,00a
A						
0,5mg/L+ MS^{1/2}	1,1±0,75 ab	15,29±9,99 a	2,29±0,75 bc	1,00±0,00 b	1,71±0,18 ab	18,29±0,18 ab
I						
1 mg/L + MS	0,6±0,27 b	3,50±1,87 a	1,50±0,27 bc	1,00±0,00 b	1,50±0,19 ab	21,25±0,19 ab
B						
1 mg/L + MS^{1/2}	2,4±0,86a	30,56±11,42a	3,78±0,86 ab	1,11±0,11 b	2,89±0,72 a	26,89±0,72 a
0,5mg/L + MS	1,4±1,17 ab	16,57±9,49 a	5,29±1,17a	1,86±0,14a	2,57±0,48ab	27,71±0,48 a
A						
0,5mg/L+ MS^{1/2}	0,0±0,42 b	0,00±0,00 a	1,50±0,42 bc	1,00±0,00 b	1,75±0,16 ab	23,38±0,16 ab
I						
1 mg/L + MS	0,0±0,48 b	0,00±0,00 a	2,57±0,48 ab	1,00±0,00 b	1,43±0,20 ab	26,57±0,20 a
A						
1 mg/L + MS^{1/2}	0,0 ±0,24 b	0,00±0,00 a	1,40±0,24 bc	1,00±0,00 b	1,00±0,00 b	14,40±0,00 b

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%.

4.3.2. Enraizamiento de segmentos nodales

Tal como se indica en el cuadro 21, el mayor número de raíces formadas (1,37) y altura de plántula (27,50 mm), se observó en el medio de cultivo MS con AIB 1 mg/L. En lo referente a longitud de raíces (26 mm) y número de hojas (4,33) y nudos formados (2,89), éstos mayores valores se obtuvieron en el medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ con AIB 1 mg/L, en tanto que la mayor tasa de brotamiento (1,86) se alcanzó en el tratamiento MS con AIA 0,5 mg/L. Es importante señalar que en el tratamiento MS con AIB 0,5mg/L, a los 2 meses de cultivo, los explantes murieron (Figura 5).

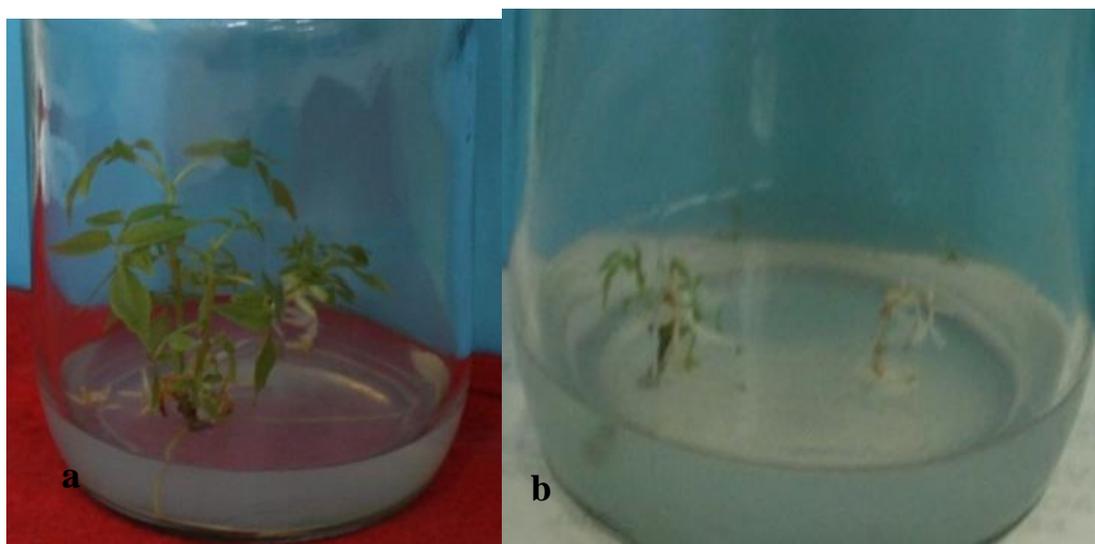


Figura 5. a) Desarrollo de las raíces en el explante aplicando 1 mg/L AIB en medio de cultivo MS en concentración a la mitad. **b)** Plántulas vitrificadas en medio de cultivo 1mg/L de AIA.

Cuadro 21. Efecto de auxinas (AIB, AIA) en diferentes concentraciones, para la formación de raíces, longitud de raíces, número de hojas, brotes y número de nudos y altura del explante de *C. montana*

Tratamientos	N° Raíces formadas	Long. Raíces (mm)	N° HOJAS	N° Brotes formados / explante	N° NUDOS	Altura de plántula (mm)
Testigo	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00b	1±0,00b	1,30±0,00ab	16,71±0,00c
A 0,5mg/L + MS	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00b	1,00±0,00b	2,0±0,00ab	0,00±0,00b
I 0,5mg/L + MS^{1/2}	0,00±0,00a	0,00±0,00a	2,67±0,56ab	1±0,00b	1,71±0,00ab	20,33±0,00abc
B 1 mg/L + MS	1,375±1,10a	13,75±8,65a	3,63±0,82ab	1,63±0,26ab	1,50±0,68ab	27,50±0,26a
1 mg/L + MS^{1/2}	1,333±0,42a	26±13,77a	4,33±1,89a	1,50±0,22ab	2,89±0,96a	26,67±0,22ab
A 0,5mg/L + MS	0,111±0,11a	1,11±1,11a	2,22±0,57ab	1,33±0,24ab	2,57±0,24aab	24,00±0,24abc
I 0,5mg/L + MS^{1/2}	0,428±0,30a	20±13,63a	3,00±0,65ab	1,86±0,14a	1,75±0,31aab	25,57±0,14abc
A 1 mg/L + MS	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00b	1,00±0,00b	1,43±0,00ab	0,00±0,00b
1 mg/L+MS^{1/2}	0,00±0,00a	0,00±0,00a	1±0,63ab	1±0,00b	1,00±0,24b	17,60±0,00bc

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%.

4.4. Tasa de multiplicación potencial

La figura 6 indica la tasa de multiplicación potencial mediante el cultivo de ápices caulinares y segmentos nodales, en las mejores condiciones fisiológicas, partiendo de 92 plántulas provenientes de un lote de semillas germinadas. Después del primer subcultivo, a los tres meses, se obtuvo 100 plántulas; de este lote, tres meses después de realizado el segundo subcultivo, se obtuvo 115 plántulas, estimándose que tres meses después de realizarse el tercer subcultivo, se obtendría 125 plántulas.

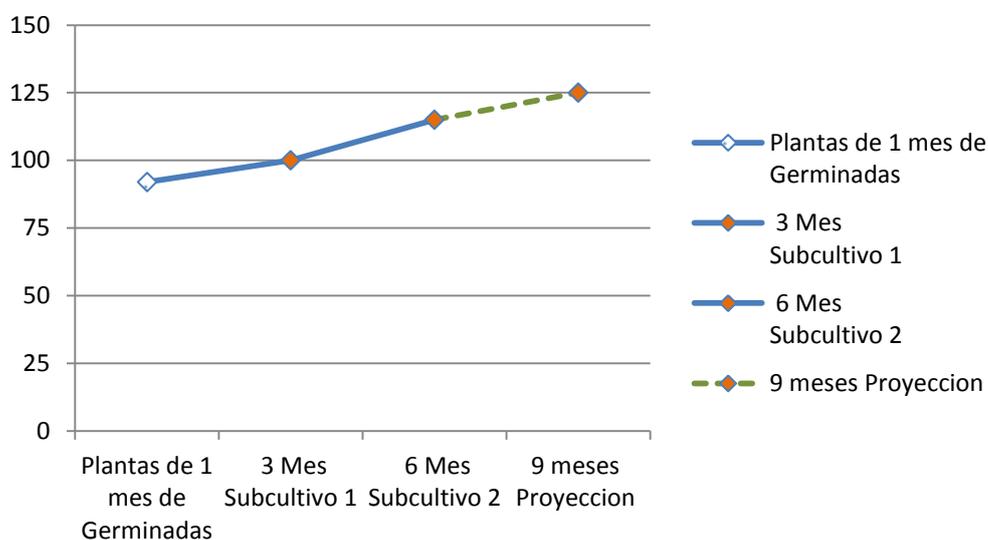


Figura 6. Tasa de multiplicación potencial de *C. montana*, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales, partiendo de plántulas germinadas con AG3, en tres subcultivos sucesivos realizados cada tres meses.

4.5. Fase de formación de callos, friables

En el cuadro 22 se observa que utilizando como explantes hipocótilo la mayor inducción de callos se alcanzó en medio de cultivo suplementado con 2,4-D 1 mg/L 2,4-D ocupando 65% (+++) del explante y presentando una coloración blanca (B); en el caso de cotiledones la mayor inducción de callos se alcanzó en medio de cultivo suplementado con 2,4-D 2 mg/L ocupando 52% (++) del explante. Las raíces no formaron callos en ninguno de los tratamientos ensayados. El porcentaje de contaminación y mortalidad en

todo el ensayo fue 0%, debido a que los explantes provenían de plántulas asépticas; asimismo, en todos los tratamientos ensayados los callos formados fueron de naturaleza friable.

Cuadro 22. Efecto de las auxinas 2,4-D, ANA y AIA, en diferentes concentraciones, en la inducción de callos de *C. montana*.

TRATAMIENTOS			RESPUESTA		
(mg/L)			Tamaño del callo (%) / Coloración*		
2,4-D	ANA	AIA	RAÍCES	HIPOCOTILOS	COTILEDONES
0	0	0	0±0,00a	0±0,00c	0±0,00b
1			0±0,00a	65,0±12,47/B ab	37,50±10,70/ CrM a
2			0±0,00a	37,5±11,33/CrM ab	52,50±10,83/CrM a
	1		0±0,00a	47,5±10/Cr ab	25,50±3,82/ M b
	2		0±0,00a	30,0±8,16/Cr abc	0,00±0,00 b
		1	0±0,00a	0,00±0,00 c	0,00±0,00 b
		2	0±0,00a	22,50±2,50/ CrV bc	0,00±0,00 b

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%.

*Coloración del callo: B, blanco; Cr, crema; M, marrón y V, verde. Evaluación: 60 días de cultivo.

4.6. Fase de inducción de callos

4.6.1. Fase de formación del callo Embriogénico

4.6.1.1. Efecto de las auxinas para la inducción de callos con apariencia embriogénica

Durante las 8 semanas de cultivo se observó cambios morfológicos y de coloración que iban desde el hinchamiento del tejido hasta la formación del callo con apariencia embriogénica.

En el cuadro 23 se observa que el tratamiento que promovió la formación de callos en menor tiempo fue el que incorporó 2,4-D 2 mg/L, tanto en explantes de hipocótilos como de embriones inmaduros; los callos iniciaron su crecimiento a los 17 y 13 días, respectivamente. En cotiledones el mejor

medio de cultivo de inducción de callos fue el suplementado con 2,4-D 1 mg/L, iniciándose su formación a los 21 días. En el mismo cuadro 24 se observa que los porcentajes de inducción de callos en segmentos de hipocótilos, cotiledones y embriones zigóticos inmaduros, en los tratamientos con 2,4-D 1 y 2 mg/L, fueron 65% (+++), 52% (++) y 77,5% (+++), respectivamente, mostrando los callos, con apariencia embriogénica, un incipiente estadio globular (Figura 7).

El porcentaje de contaminación fue 1% y la mortalidad en todo el ensayo fue 0%. Es importante señalar que los embriones zigóticos inmaduros que no formaron callo siguieron el proceso normal de germinación (Figura 7) y los segmentos de cotiledones e hipocótilos que no llegaron a alcanzar ninguna proliferación de callo, permanecieron verdes.

Cuadro 23. Efecto de las auxinas 2,4-D, ANA y AIA, en diferentes concentraciones, en la inducción de callos con apariencia embriogénica de *C. montana*.

TRATAMIENTOS (mg/L)	Explantos que formaron callo (%)			Inicio de formación de callos embriogénicos promedio (días)*			Tamaño del callo (%)		
	HIP.	COT.	EMBR.	HIP.	COT.	EMBR.	HIP.	COT.	EMBR.
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,4-D 1	70	70	70	21,6±3,46a	21,00±4,85a	14,2±2,63a	65,0±12,47a	37,50±10,70a	52,5±8,70b
2,4-D 2	90	90	90	17,3±4,05a	25,70±3,23a	13,0±1,61a	37,5±11,33ab	52,50±10,83a	77,5±1,17a
ANA 1	30	30	30	20,9±2,64a	30,00 ±3,82b	6,50±3,35ab	47,5±10,83ab	25,0±3,82b	7,20±3,68c
ANA 2	0	0	0	20,5±4,63a	0,00±0,00b	0,00±0,00b	30,0±8,16abc	0,00±0,00b	0,00±0,00c
AIA 1	0	0	0	0±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00c	0,00±0,00b	0,00±0,00c
AIA 2	0	0	0	25,8±3,26a	0,00±0,00b	0,00±0,00b	22,50±2,50bc	0,00±0,00b	0,00±0,00c

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%.

*: El promedio se calculó únicamente de los embriones que formaron callos.

4.6.1.2. Efecto de combinación de Dicamba y diversas auxinas para la inducción de callos con apariencia embriogénica.

En el cuadro 24 se observa que en el medio de cultivo MS suplementado con Dicamba 2 mg/L, utilizando como explantes embriones zigóticos inmaduros, se alcanzó 100% de inducción callos con apariencia embriogénica a los 14,8 días del cultivo con un tamaño de 92,5 % (++++), a los dos meses del cultivo. Cuando se utilizó Dicamba 0,5 mg/L y 2,4-D 3 mg/L, los embriones zigóticos inmaduros indujeron 100% de callos con apariencia embriogénica a los 11,7 días del cultivo, en tanto que en cuatro semanas del cultivo se alcanzó un tamaño de 92,5 % (++++) (Figura 7).

Cuadro 24. Efecto de Dicamba y Dicamba en combinación con la auxina 2,4-D, en diferentes concentraciones, en la inducción de callos embriogénicos de *C. montana*

TRATAMIENTOS mg/L		Explantes que formaron callo (%)		Inicio de formación de callos embriogénicos (días)		Tamaño del callo (%)	
Dicamba	2,4-D	EMBR. INMAD.	EMBR. MAD.	EMBR. INMAD.*	EMBR. MAD.	EMBR. INMAD.*	EMBR. MAD
1	-	80	-	15,6±1,96	-	57,5±0,66	-
2	-	100	-	14,8±1,26	-	92,5±0,82	-
1	0,5	-	100	-	25,4±0,94a	-	62,5±8,16bc
3	0,5	-	100	-	15,2±1,16b	-	80±3,82ab
0,5	1	-	100	-	26,9±1,36a	-	45±6,72c
0,5	3	-	100	-	11,7±0,93b	-	92,5±5,00a

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%.

* No se puede asignar letras porque para la prueba de Tuckey se requiere como mínimo 3 tratamientos

EMBR. MAD., embriones zigóticos maduros; EMBR. INMAD. Embriones zigóticos inmaduros.

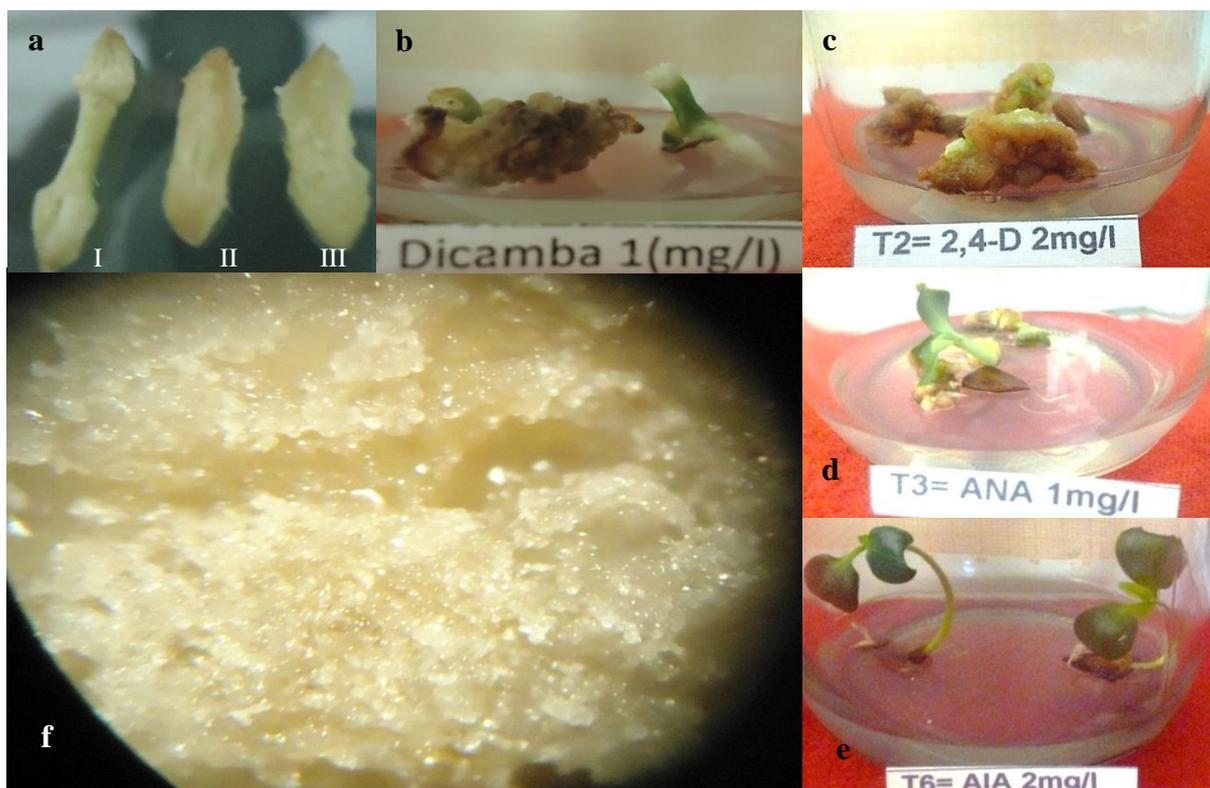


Figura 7. a) Proceso morfológico de hipocótilos hasta formar callo, presentando cambios a los 12 días (I), a los 15 días (II) y a los 20 días (III). **b)** Callos con apariencia embriogénica a 3 semanas del cultivo. **c)** Formación de callos con apariencia embriogénica a partir de embriones zigóticos inmaduros. **d)** y **e)** Cultivo de embriones zigóticos que no formaron callo continuando con el proceso de germinación. **f)** Visión detallada de callos con apariencia embriogénica observándose embriones somáticos de apariencia globular.

4.6.2. Fase de formación de callo Organogénico.

4.6.2.1. Efecto de los reguladores de crecimiento para la inducción de callos con apariencia organogénica.

En el cuadro 25 se observa que el mejor medio de cultivo para la inducción de callos con apariencia organogénica, en explantes de hipocótilos, fue la combinación agua de coco 20% suplementado con BAP, iniciándose su formación a los 33,94 días del cultivo, con un tamaño de 100% (++++) (Figura 8).

Cuadro 25. Efecto de Dicamba, agua de coco y BAP en medio de cultivo MS, en diferentes concentraciones, en la inducción de callos con apariencia organogénica de *C. montana*.

TRATAMIENTOS (mg/L)			Explantes que formaron callo (%)	Formación del callo con apariencia organogénica (días)	Tamaño del callo (%)
Dicamba	A.C %	BAP			
3	20	-	50	36,8±0,96ab	65,00±12,94a
-	20	-	30	40±131,15a	75,00±13,15a
-	20	3	80	33,94±0,79b	100,00±14,77a



Figura 8. Formación de callos con apariencia organogénica cubriendo el 100% del explante.

Además, es importante señalar que se realizaron los siguientes ensayos con BAP, KIN, 2iP, Dicamba, extracto de maíz 20% y 30% y agua de coco 20%, en varias interacciones: Dicamba 1 mg/L + agua de coco 20%; Dicamba 3 mg/L + agua de coco 20%; BAP 1 mg/L + agua de coco 20%; BAP 3 mg/L+ agua de coco 20%; KIN 1 mg/L+ agua de coco 20%; KIN 3 mg/L + agua de coco 20%; BAP 3 mg/L+ extracto de maíz 20% + agua de coco 20% y BAP 3 mg/L+ extracto de maíz 30% En estos ensayos se utilizaron como explantes hipocótilos, cotiledones y embriones zigóticos inmaduros con la finalidad de

inducir procesos organogénicos; sin embargo, los resultados fueron negativos puesto que en ningún tratamiento se observó la inducción de callos (Figura 9).



Figura 9. a) Hipocótilos verdes aún, a los tres meses de cultivo, en diferentes tratamientos donde no se registró la formación de callo. b) Cotiledones verdes aún después de tres meses de cultivo. c) Embriones zigóticos cultivados en medio de cultivo con extracto de maíz 20% que no formaron callo sino plántulas.

De varios ensayos realizados, en medios de cultivo con sulfato de adenina, BAP, KIN y 2iP, en diferentes concentraciones, evaluados mensualmente hasta un periodo de 3 meses, se obtuvieron los resultados indicados en el cuadro 26. Los tratamientos con BAP 1 y 2 mg/L suplementada con sulfato de adenina 5 y 10 mg/L indujeron 80 y 90% de callos, a los 35,57 y 40,11 días de iniciado el cultivo, con un tamaño de 30,56 (++) y 41,67% (++) , respectivamente, a diferencia de otros tratamientos donde no se registró formación de callos en hipocótilos y cotiledones.

Cuadro 26. Efecto de las citocininas BAP, KIN y 2iP, más sulfato de adenina (SA) en diferentes concentraciones, en la inducción de callos con apariencia organogénica de *C. montana*.

TRATAMIENTOS (mg/L)				Explantos que formaron callo (%)		Formación del callo (días)		Tamaño del callo (%)	
BAP	KIN	2iP	SA	HIPOCOTILOS	COTILEDONES	HIPOCOTILOS	COTILEDONES	HIPOCOTILOS	COTILEDONES
1,0			5,0	80	0	35,57±1,04b	0a	30,56±9.10a	0a
2,0			10	90	0	40,11±1,24a	0a	41,67±8,33a	0a
	1,0		5,0	0	0	0c	0a	0b	0a
	2,0		10	0	0	0c	0a	0b	0a
		1,0	5,0	0	0	0c	0a	0b	0a
		2,0	10	0	0	0c	0a	0b	0a

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%.

4.6.3. Regeneración de callos

Para la fase de regeneración de brotes se utilizaron tres tratamientos, evaluándose los resultados a lo largo de dos meses de cultivo (Cuadro 27). En medio de cultivo con ABA 5 mg/L, 40% de los cultivos formaron callos con un promedio de 3,75 raíces a los 20 días del cultivo y en medio de cultivo con AG₃ 5mg/L, 30% de los cultivos formaron callos con un promedio de 2,5 raíces a los 39,5 días del cultivo. En ambos tratamientos la formación de raíces constituyó un proceso de organogénesis indirecta puesto que el órgano se formó directamente del callo (Figura 10).

Asimismo, se propendió a la regeneración de órganos en los siguientes tratamientos adicionales: BAP 3 mg/L y agua de coco 20%, BAP 3 mg/L más extracto de maíz 20% y agua de coco 20% y BAP 3 mg/L y extracto de maíz 20%; en los tres casos los callos formados se tornaron de color marrón y a las 4 semanas del cultivo se necrosaron totalmente y al primer mes todos murieron.

Cuadro 27. Efecto del ABA y AG₃, en diferentes concentraciones, en la regeneración de callos de *C. montana*.

Tratamientos (mg/L)	N° de callos que formaron raíces %	N° de raíces formadas	Inicio de formación de raíces
Testigo	0	0	0
ABA 5	40	3,75±0,30	19±0,37
AG ₃ 5	30	2,5±0,18	29,33±0,38

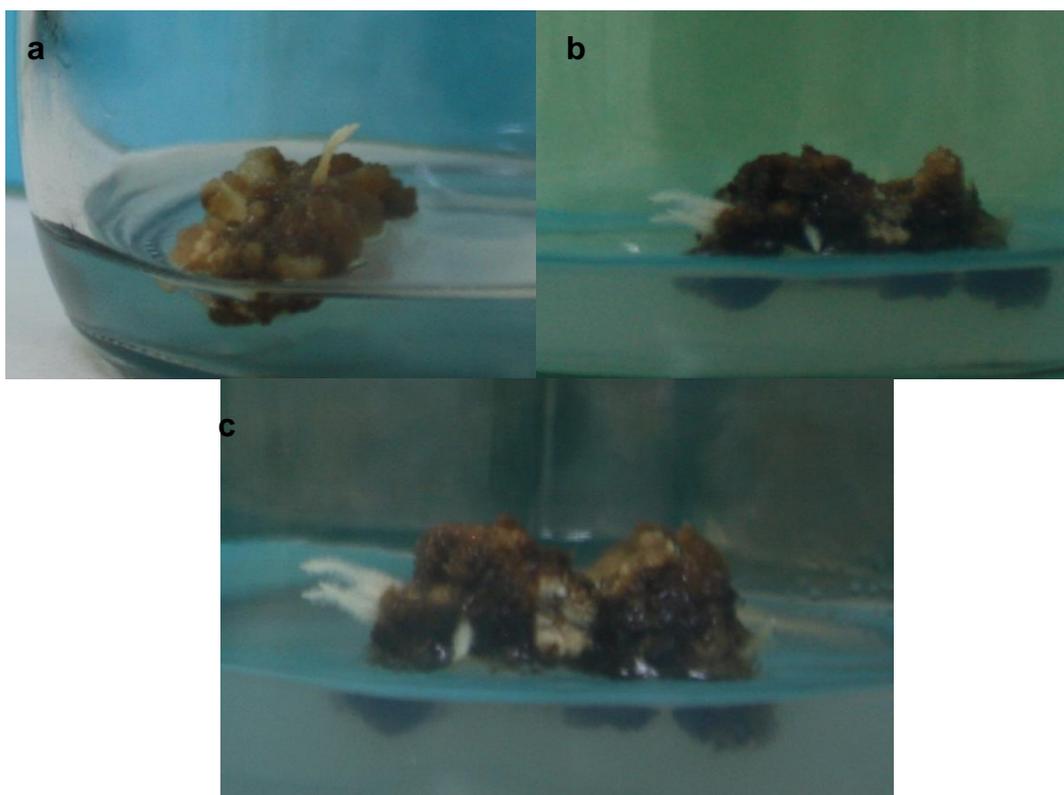


Figura 10. **a)** Formación de raíces en medio de cultivo con AG₃ 5 mg/L **b) y c)** Callo subcultivado en medio de cultivo MS con ABA 5 mg/L, observándose la formación de raíces a los 20 días de cultivo.

4.7. Conservación de germoplasma

4.7.1. Efecto del ácido absicóico (ABA) para conservar el germoplasma de *C. montana*

El Cuadro 28 muestra los resultados de los tratamientos de ello se informa que el mejor tratamiento es al aplicar ABA 0,1 mg/L en medio de Cultivo de Murashige & Skoog a la mitad de concentración en explantes con raíz y sin raíz para la conservación de germoplasma; las variables de explantes **con raíz**, se obtuvo en elongación de brote (60 mm), raíces formadas (2), hojas formadas (3) y nudos formados (4) como se puede apreciar en la (figura 11) con el mayor porcentaje de supervivencia 70%; mientras que en los explantes **sin raíz** en elongación de brote (39 mm), raíces formadas (0), hojas formadas (2) y nudos formados (3) se obtuvieron los más bajos

resultados con una supervivencia de 60%, mencionándose además que no ocurrió con el los tratamientos restantes en el presente cuadro, los mismos que fueron afectados por diversos procesos morfológicos y fisiológicos vitrificación, abscisión y senescencia y no hubo explantes que presenten fenolización.

Cuadro 28. Efecto de la sustancia osmoreguladora (ABA) en la elongación del brote, desarrollo radicular, número de hojas y número de nudos formados de *C. montana*.

Tratamiento	CON RAÍZ					SIN RAÍZ				
	Elongac. (mm)	N° Raíces	N° nudos	N° hojas	Supervivencia (%)	Elongac. (mm)	N° raíces	N° nudos	N° hojas	Supervivencia (%)
ABA (mg/L)										
Testigo	79±0,43a	2±0,33 a	4±0,22a	5±0,42a	60,0	51±2,71abc	3±0,43a	3±0,3a	4±0,60a	60,0
MS + 0,1	68±0,63 ab	2±0,33 a	2±0,21b	3±0,49a	60,0	58±8,25ab	1±0,63ab	3±0,2a	3±0,48a	40,0
MS + 0,5	62±0,55 b	1±0,62 a	2±0,33b	3±0,95a	60,0	41±2,75ac	2±0,55b	2±0,5a	3±0,78a	70,0
MS ½ + 0,1	60±0,25 b	2±0,55 a	2±0,20b	3±0,51a	70,0	39±2,14abc	0±0,25ab	2±0,2a	3±0,71a	60,0
MS ½ + 0,5	65±0,80 ab	3±0,37 a	4±0,34a	6±0,84a	60,0	43±2,60abc	2±0,80ab	3±0,4a	4±0,83a	70,0

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%.



Figura 11. Modalidad de conservación de plantas *in vitro* en Explante con raíz: **a)** Efecto del medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ + ABA 0,1 mg/L, **b)** Efecto del medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ + ABA 0,5 mg/L, **c)** Abscisión foliar a los 4 meses de iniciado el proceso de conservación. Explante sin raíz: **d)** Efecto del medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ + ABA 0,1 mg/L, **e)** Explante contaminado con hongos. **f)** Vitrificación y senescencia del explante.

4.7.2. Efecto del manitol para conservar el germoplasma de *C.montana*

El tratamiento con Manitol (Cuadro 29) en explantes **con raíz** se observa que el mejor resultado es al 6% en medio de Cultivo de Murashige & Skoog en concentración entera, presenta un crecimiento lento en la elongación del hipocótilo (49mm), raíces (1), nudos (1) y formación de hojas (2) con el 60% de supervivencia, sin afectar el desarrollo fisiológico de la planta, dando como resultado plantas saludables listas para subcultivarlas (figura 11); mientras que en los resultados obtenidos de plántulas **sin raíz**, el mejor medio cultivo es Manitol al 6% más MS en concentración a la mitad, limitó el crecimiento del brote obteniendo una elongación 32 mm, con 0 número de raíces y hojas verdaderas, se debe mencionar que este tratamiento es el que más limitó el desarrollo de la planta pero no es el más óptimo para la conservación del germoplasma debido a que no desarrollo ningún órgano, lo que hace dificultoso para su regeneración, los tratamientos restantes igualmente muestran una inhibición de crecimiento extrema donde no permitió que los órganos se desarrollen y a partir del cuarto y quinto mes presentaron alteraciones en su fisionomía como vitrificación, senescencia y deformaciones en las hojas cotiledonarias. (Figura 12).

Cuadro 29. Efecto de la sustancia osmoreguladora manitol en la elongación del brote, desarrollo radicular y número de hojas y nudos formados de *C. montana*.

Tratamiento	CON RAÍZ					SIN RAÍZ				
	Elongac. (mm)	N° Raíces	N° nudos	N° hojas	Supervivencia (%)	Elongac. (mm)	N° raíces	N° nudos	N° hojas	Supervivencia (%)
Testigo	79±3,52 a	2±0,6a	4±0,22a	5±0,42a	60,0	51±2,71 a	3±0,43a	3±0,3a	4±0,92a	60,0
MS + 4,0	55±2,24b	1±0,17ab	2±0,22bc	2±0,68b	60,0	38±2,50b	0±0b	2±0a	2±0b	40,0
MS ½ + 4,0	53±3,22b	1±0,20ab	2±0bc	2±0,80b	50,0	36±1,50b	0±0b	1±0,20b	2±0,51b	70,0
MS + 6,0	49±2,84b	1±0,17ab	1±0b	2±0b	60,0	33±1,05b	0±0b	1±0,21b	1±0,37b	60,0
MS ½ + 6,0	52±3,06b	1±0,00b	2±0,14c	2±0,14b	70,0	32±0,91b	0±0b	1±0b	0±0b	70,0

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%

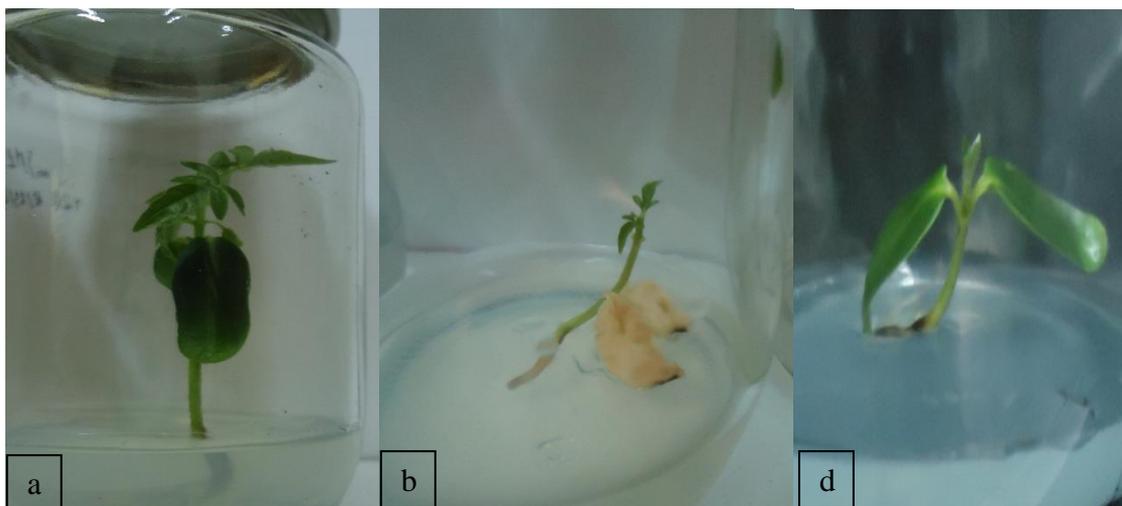


Figura 12. Explante con raíz: **a)** Efecto del medio de cultivo MS + manitol 6,0%. **Explante sin raíz:**, **b)** Explante mostrando el efecto del medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ + manitol 6%, a los 4 meses de cultivo, **c)** Efecto inhibitorio en el crecimiento del brote en medio de cultivo MS + manitol 6,0%.

4.7.3. Supervivencia (subcultivo) de plantas conservadas *in vitro* por seis meses

Las plantas conservadas durante seis meses en buenas condiciones, fueron transferidas a tres tratamientos de regeneración, como se presenta en el cuadro 30, obteniéndose a las 8 semanas, plantas *in vitro* con buena apariencia los explantes que se subcultivo en el tratamiento ABA 0,5 combinado con 1mg/L de AIB, reportando mayor elongación (51,25mm), más número de raíces (0,53), hojas (4,33), nudos (2,60) y donde también hubo mayor tasa supervivencia (83,3%).

Cuadro 30. Efecto de ácido abscísico (ABA) y ácido indol-butírico (AIB) en diferentes concentraciones en medio de cultivo MS ½, en la elongación del brote, número de raíces, hojas y nudos formados y supervivencia de las plántulas subcultivadas de *C. montana*

Tratamiento (mg/L)	Plantas subcultivadas				
	Elongación (mm)	N° Raíces	N° nudos	N° hojas	Supervive ncia %
ABA 0,5	44,83±2,92 ab	0,42±0,19 a	1,75±0,28 a	2,67±0,47 a	66,7
AIB 1,0	37,20±1,07 b	0,40±0,31 a	2,33±0,21 a	2,80±0,55 a	55,6
ABA 0,5 +AIB 1,0	51,27±3,33a	0,53±0,26a	2,60±0,27a	4,33±0,56a	83,3

Datos expresados como promedio ± desviación estándar. Letras presentan diferencias según el test de Tuckey con un nivel de confianza de 95%

5. DISCUSIÓN

Es ampliamente conocido que el establecimiento *in vitro* de especies arbóreas es difícil de lograr y que la obtención de explantes, a partir de plántulas provenientes de semillas germinadas asépticamente, resuelve algunos problemas, como por ejemplo la desinfección del material vegetal y la poca respuesta morfogénica de los tejidos de árboles adultos (Berríos, 1991; Krikorian, 1991; Villalobos & Thorpe, 1991).

5.1. Fase de germinación de semillas *in vitro*

Las giberelinas son un grupo de hormonas que desempeñan un papel significativo en la fisiología de la semilla, en muchas de ellas el AG₃ mejora la velocidad de germinación, el porcentaje de germinación y el crecimiento inicial de plántulas (Hartmann y Kester, 1997 citado por Pérez 2000).

La adición de AG₃ 2 mg/L al medio de cultivo, permitió obtener los mejores resultados en la germinación de semillas con 72% y la elongación del hipocótilo con 7,1 cm, a los 30 días de cultivo. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por (Araya *et al.* 2000), quien en su estudio realizado con *Alnus acuminata*, utilizando similares concentraciones de AG₃, después de 35 días de cultivo, obtuvieron 80% de germinación de semillas, además, reportaron que en altas concentraciones se evidenciaba un efecto inhibitorio. Como es reconocido, las giberelinas constituyen un grupo de hormonas vegetales basados en la estructura *ent*-giberelano que desempeñan un papel significativo en la fisiología de la semilla, puesto que muchas de ellas, especialmente el AG₃, mejora el porcentaje y velocidad de germinación así como el crecimiento inicial de plántulas (Davies, 1995; Jacobsen *et al.* 1995).

En lo referente a la contaminación, en el tratamiento con AG₃ 2 mg/L se obtuvo los menores porcentajes de contaminación con apenas 12%,

diferiendo con los resultados registrados por (Pérez *et al* 2001) quien al realizar la germinación *in vitro* de semillas de cedro de tres procedencias y con tres meses de almacenada, observó diferencias en el porcentaje de contaminación entre 20 a 46%, atribuyéndose esta diferencia al protocolo de desinfestación de semillas utilizado en el presente estudio. Según lo manifestado por (Castro 2001), la asociación de las semillas de especies forestales tropicales con muchos microorganismos, de manera natural ayudan a los procesos de germinación, pero que contrariamente representan un factor limitante para los trabajo *in vitro*.

Según (Guerrero y Ramírez 2000) aseguran que la contaminación *in vitro* se debe al ataque de los fitopatógenos en los medios nutritivos, puede estar asociado a la disminución del pH durante la esterilización del medio, favoreciendo de esta manera al desarrollo de hongos y al ataque de bacterias, también aducen que esto se debe a la influencia de las bajas concentraciones de hipoclorito de sodio y/o a la mala manipulación del operador.

5.2. Fase de proliferación de los explantes obtenidos de ápices caulinares y segmentos nodales.

Los resultados obtenidos en el tratamiento con 2 mg/L de BAP, obtuvo el mayor número de brotes (3) y nudos en los explantes obtenidos de ápices; lo que corrobora plenamente con lo reportado por (Daquinta 2003), quien manifiesta que usando BAP 0,5 mg/L no tiene una incidencia directa en la formación de brotes. Así mismo, este autor continua manifestando que a medida que se aumenta la concentración de BAP se alcanzan mayores niveles de brotación en *Cedrela odorata*. , (Castillo *et al.* 2011) en su trabajo realizado en *C. odorata* realizó la combinación de ANA (0.2 mg/L) y BA (2.0 mg/L), donde logro formar un promedio de 2.4 brotes por explante y (Montes 2007) obtuvo de 2.3 brotes por explante aplicando 1,5 mg de BAP junto con 0,5 mg/L de 2-iP; los resultados obtenido de los autores citados

anteriormente no superan a los resultados reflejados en el presente trabajo. Por lo que sería importante probar nuevas concentraciones superiores a 2 mg/L de BAP y/o combinaciones de auxinas y citoquininas en la proliferación y elongación de *C. montana*.

Por otro lado, (Soto, *et al* 2010), probaron en *Cedrela salvadorensis Standl*, otra citocinina (Benzil adenina-BA), encontrando que el mayor número promedio de brotes por segmento nodal fue de 2,0 en todas las concentraciones utilizadas (0; 0,5; 1,5; 2,5 y 3,5 mg/L, respectivamente), que es superior a lo obtenido en este trabajo de investigación, en donde los segmentos nodales al aplicar BAP en una concentración más baja de 1mg/L fue el que mayor número de brotes, hojas y nudos tuvo (2,8-3,4-2,3) respectivamente, con lo cual se confirma lo manifestado por los autores, que el BA a diferencia del BAP, promueve una mayor formación de brotes en los explantes. Finalmente, de lo investigado y de la revisión de trabajos similares, se puede colegir que para la propagación *in vitro* de *Cedrela montana*, se podrían probar otras citocininas como el Benzil adenina (BA) en diferentes concentraciones, para promover la inducción de brotes axilares en explantes.

5.3. Fase de enraizamiento de los explantes obtenidos de ápices caulinares y segmentos nodales.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el tratamiento con medio de cultivo MS ½, suplementado con AIB 1 mg/L, indujo la formación de 2,4 raíces con 30,5 mm de largo, utilizando como explantes ápices caulinares. (Valverde *et al.* 2008) en su estudio en *Cedrela odorata*. registró con IBA 2 mg/L la formación de 6,5 raíces por explante; sin embargo, en el estudio realizado por (Castillo *et al.* 2011), en la multiplicación *in vitro* de cedro rojo obtuvieron una mejor respuesta para formación de raíces, con la interacción ANA 0,05 mg/L + AIA 0,05 mg/L, con un promedio de 6,9 raíces formadas por brote, por lo que resultaría necesario incrementar las concentraciones de AIB y/o ensayar con otras auxinas, y otras combinaciones de ANA, para obtener

mayor número raíces.

Por otro lado, utilizando segmentos nodales en el medio de cultivo MS suplementado con AIB 1 mg/L se indujo la formación de 1,3 raíces con 26 mm de largo, cifras superiores a lo reportado por (Pérez *et al.* 2001), quienes al interactuar ANA 0,5 + AIB 1 mg/L, obtuvieron 1,1 raíces formadas por lo que no resultaría conveniente realizar esta clase de interacción; sin embargo, obtuvieron mejores resultados utilizando el medio de cultivo WPM ½ suplementado con sacarosa 3%, induciendo la formación de 3,9 raíces por explante y en medio de cultivo WPM concentrado, suplementado con sacarosa 4%, se alcanzó una longitud de 11,8 cm de largo, superior a lo realizado en la presente investigación; así mismo, (Pérez *et al.* 2001) explicaron que la escasa respuesta de los explantes en la fase de inducción de raíces puede deberse tanto al tamaño de los brotes utilizados (1-2cm) como a la formación excesiva de callo, atribuida a la presencia de auxinas en el medio de cultivo, tal como se observó en la presente investigación. De lo realizado en la presente investigación y de la revisión de trabajos similares, se podría plantear para una futura realización de trabajos utilizando el medio de cultivo WPM u otro de similar en composición en sales minerales, más distintas concentraciones de auxinas, en especial AIB para la inducción de enraizamiento *in vitro* de *C.montana*..

5.4. Fase de formación de callos, friables

De los resultados alcanzados para inducir callos friables, el mejor medio es MS + 1 mg/L de 2,4-D en explantes de hipocótilos puesto que se obtuvo mayor respuesta, el callo formado ocupó un 65% del explante, con una coloración Crema/Marrón (CrM), de consistencia friables es decir suave y/o desmenuzable, similares resultados obtuvo (Peña *et al.* 2010) en su trabajo titulado "Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar", que al aplicar otro tipo de auxina utilizó 3mg/L Dicamba alcanzó a diferenciar callos friables, al igual que

(Medina y Sotolondo 2004) que logró la inducción de callos de origen friables a partir de foliolos de rebrotes de este híbrido de caoba con la combinación 2,4-D+AIB y Kinetina

5.5. Fase de formación del callo con apariencia embriogénica

Para la fase de formación de callos embriogénicos, se logró partiendo de hipocótilos y embriones inmaduros aplicando 2 mg/L de 2,4-D en el medio de cultivo MS, lo que corrobora (Gonzales *et al.* 2007) la auxina 2,4-D, una hormona con sobrada capacidad de inducir callos embriogénicos; con el tratamiento mencionado empezaron a formar callos entre los 13 y 17 días y el porcentaje promedio de explantes que llegaron a formar callos fue del 80%, pero únicamente llegaron a etapa globular; lo que explica (Parrot 2002), cuando las concentraciones de auxina se elevan a un determinado nivel, los embriones somáticos no pasan de la etapa globular, se detiene su desarrollo y forman embriones nuevos a partir de estos; por otro lado, (Medina y Sotolondo 2004), informaron que las sales minerales descritas por (Murashige y Skoog 1962), reducidas a la mitad de su concentración, fundamentalmente con la reducción de 60 a 30 mM de nitrógeno, es donde se desarrollan callos con mejores características morfológicas y con mayor totipotencialidad para formar estructuras embriogénicas.

Así mismo reportaron (Peña *et al.* 2010) que los embriones zigóticos inmaduros constituyen la principal fuente de explantes para el establecimiento de un protocolo eficiente de embriogénesis somática en la familia MELIACEAE, lo que de alguna manera se confirma en el presente trabajo puesto que se obtuvo una mejor respuesta embriogénica utilizando como explantes embriones inmaduros en medio de cultivo MS suplementado con Dicamba 2 mg/L, alcanzándose 100% de explantes que formaron callos en un promedio de 15 días de cultivo, en tanto que a los dos meses de cultivo el callo se formó en el 92,5% del explante, aunque únicamente llegó a

formarse embriones somáticos en el estadio globular. Al respecto, (Gonzales y Peña 2007) informaron que el uso de Dicamba 0 – 2 mg/L, tanto en el medio de cultivo MS como WPM, inducen la formación de callos a los 7 días posteriores al cultivo; sin embargo, (Peña *et al.* 2010) informaron que Dicamba 3 mg/L posibilitó la diferenciación de callos rodeados de algunos embriones somáticos en la etapa de desarrollo globular e incluso éstas estructuras se formaban constantemente, pero no continuaban su desarrollo en subcultivos sucesivos y la mayoría de callos se necrosaban y morían, hechos que también fueron observados en el presente trabajo cuando los callos con apariencia embriogénica fueron transferidos a medio de cultivo de regeneración.

A la luz de los resultados obtenidos, explantes como los embriones zigóticos inmaduros y/o maduros resultan ideales en el proceso de obtención de callos embriogénicos en tanto que las auxinas 2,4-D y Dicamba presentan la mayor respuesta morfogénica, ya sea aumentando o disminuyendo los niveles de concentración.

5.6. Fase de formación del callo con apariencia organogénica

En el cultivo *in vitro* de diferentes explantes y en condiciones adecuadas, puede inducirse la formación de nuevos órganos (brotes, raíces y flores) de manera directa, sin la formación de callo, denominándose a este proceso organogénesis directa y si se induce la formación de órganos a partir del callo el proceso se denomina organogénesis indirecta (Radice, 2007).

En el presente trabajo, el medio de cultivo MS suplementado con agua de coco 20%, y con 3 mg/L de BAP y utilizando como explantes hipocótilos se alcanzó 70% de formación de callos organogénicos, los que no desarrollaron brotes, ni ningún otro tipo de órgano; sin embargo, (Peña *et al.* 2010) reportaron que en el medio de cultivo TY17, que incorpora las sales minerales MS, suplementado con agua de coco 20% incrementó

significativamente el número de brotes formados en segmentos de hipocótilo de *Cedrelela odorata*, con un promedio de 4,68 brotes por explante y el uso de diversas citocininas (BAP, 2iP y ZEA) y en varias concentraciones (0 – 45 μ M) no resultaron más eficientes que el agua de coco.

Mejores resultados en la formación de callos se obtuvieron en hipocótilos utilizando BAP 2 mg/L más sulfato de adenina 10 mg/L, donde se alcanzó 90% de callos formados, a las 8 semanas de cultivo. Al respecto, (Herrera *et al* 2011), utilizando segmentos de hoja de Nem (*Azadiracta indica*) demostraron que el tratamiento más efectivo para lograr la desdiferenciación de los explantes fue con Picloram 2 mg/L, puesto que obtuvo hasta 23,2% de callos, después de 4 semanas de cultivo.

De los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, la inducción de callos organogénicos fue escasa debido a que el tiempo en formarse es extenso y en otros casos los tratamientos establecidos no lograron inducir callos por varias razones, una de estas estaría en relación con la orientación de los hipocótilos cultivados *in vitro*, puesto que los inoculados en posición horizontal no presentaron ninguna respuesta, mientras que los cultivados en posición vertical mostraron generación de callo de color verde, después de tres semanas de cultivo; en la mayoría de los casos estos emergían de los extremos cortados del explante (Daquinta *et al*. 2003; Herrera *et al*. 2011).

Es posible que la utilización de explantes más jóvenes y el cambio de orientación de los hipocótilos mejoraría el proceso de inducción, puesto que como ya ha sido demostrado, esta especie tiene potencial para ser micropropagada mediante organogénesis, pero se requiere estudiar mejor sus requerimientos naturales, cambiar y/o combinar adecuadamente las citocininas para optimizar el proceso de inducción de callo.

5.6.1. Regeneración de callos

En la regeneración de órganos (raíces), a partir de callos, se obtuvo como resultado una **organogénesis indirecta**, puesto que las raíces se formaron a partir de callos (Litz y Jarret 1991).

Al utilizar 5 mg/L de ácido abscísico en medio de Cultivo de MS, se logró visualizar la formación de raíces a los 19 días de cultivo, mientras que (Peña *et al.* 2010) quien al aplicar 4 mg/L de ABA, a las 9 semanas de cultivo indujo al 12% transformación del callo. La transformación del embrión empezó con la aparición de una estructura bipolar, posteriormente la formación de retoños con las verdaderas hojas, el tallo y alargamiento de la raíz, y la formación de la raíz secundaria. (Litz y Jarret 1991) ha informado que el ABA puede inducir la modificación del embrión. Sin embargo, en nuestros experimentos, la eficacia era bastante baja por que no hubo la diferenciación de callos, más bien se obtuvo estructuras organogénicas como las raíces.

5.7. Conservación de germoplasma

Han señalado (Roca *et al.* 1993), que la conservación *in vitro* de germoplasma, es un procedimiento auxiliar y complemento valioso de la conservación de los recursos genéticos, mediante la limitación del crecimiento a tasas mínimas y esto se logra haciendo cambios en el ambiente como la irradiancia, fotoperiodo, temperatura, concentraciones de nutrientes y reguladores de crecimiento, para desacelerar o suprimir totalmente el crecimiento de las células y de los tejidos. La conservación de los genotipos se realiza mediante el cultivo *in vitro* de ápices caulinares o de nudos (Scocchi y Hebe 2007), regulando los niveles de citocininas, sustancias osmoreguladoras como el manitol y de inhibidores de crecimiento, como el ácido abscísico, que se interrelaciona con la sacarosa y la temperatura de conservación (Roca 1985).

5.7.1. Efecto del ABA en la conservación *in vitro* de *C. montana*

De acuerdo a los resultados obtenidos, al disminuir a la mitad la concentración del medio de cultivo MS, más la adición de ABA 0,05 mg/l, se obtuvo un crecimiento lento de los órganos vegetativos sin afectar dramáticamente la fisiología de la planta, después de 6 meses de cultivo, (García *et al.* 2007), al disminuir a la mitad de concentración las sales minerales del medio de cultivo MS obtuvo un crecimiento lento de los órganos, sin que ocurran disturbios fisiológicos significativos como senescencia, abscisión o vitrificación. (Estrada *et al.* 2009) consideran que estas deficiencias fisiológicas estarían relacionadas con el agotamiento progresivo de los nutrientes a medida que transcurre el tiempo de conservación; éstos autores en su estudio realizado para conservar *in vitro* de germoplasma de camote (*Ipomoea batatas*) corroboraron plenamente que el ABA inhibe el crecimiento de las plántulas, a medida que se aumenta la concentración de 5.0 a 10.0 mg/L, puesto que la longitud del tallo y el número de yemas y raíces formadas disminuyen, después de siete meses de cultivo, sin riesgos en la supervivencia y la recuperación del material vegetal conservado.

5.7.2. Efecto de MANITOL en la conservación *in vitro* de *C. montana*

La limitación del crecimiento a tasas mínimas, se debe también, al efecto de la concentración osmótica de determinadas sustancias osmoreguladoras como el Manitol que inducen la reducción en la absorción del agua y de nutrientes del medio cultivo (Roca *et al.* 1993).

Sobre el efecto del manitol en medio de cultivo MS, utilizando como explantes ápices caulinares con raíz, se observó un crecimiento lento en la elongación del hipocótilo (49 mm), formación de raíces y hojas y 30% de mortalidad. Respecto a los explantes de ápices caulinares sin raíz, el tratamiento con mejor respuesta fue el medio de cultivo MS ½ suplementado

con manitol al 6%, donde se observó que en 6 meses de cultivo la elongación del explante fue 2 mm con 40% de plantas vitrificadas y senescentes. El manitol retarda el crecimiento de los explantes, pero en ocasiones no resulta adecuado en altas concentraciones para la conservación *in vitro*, puesto que provoca la muerte de los explantes (Espinosa *et al.* 2002). (Estrada *et al.* 2009) confirmaron que el suplemento de manitol en el medio de cultivo disminuyó la supervivencia del material vegetal a medida que aumentaba la concentración del mismo. El mismo autor informó que en el tratamiento con manitol 2%, después de seis meses de cultivo, las plántulas *in vitro* comenzaron a tornarse amarillas, con abundante caída de hojas y pérdida, en algunos casos, del ápice caulinar, seguido del oscurecimiento y posterior muerte de éstos. (Suksa *et al.* 1997 citado por Estrada *et al.* 2009), utilizó la misma concentración de manitol 6% en el medio de cultivo, y observó una disminución de la viabilidad y capacidad de recuperación de los brotes de papaya, así como el desarrollo de plantas anormales. Por su parte (Santos 2011), al conservar *Cinchona officinalis*, menciona que concentraciones de manitol 4% y 8% resultaron determinantes, a tal punto que no fue posible la recuperación de las plántulas, evidenciándose cambios en su morfología con diferentes tonalidades de color debido a una deficiente absorción de agua y nutrientes.

6. CONCLUSIONES

- ✓ EL AG₃ 2 mg/L es la mejor concentración en el medio de cultivo MS, para la germinación de semillas puesto que se obtuvo mayor número de semillas geminadas (72%) en menor tiempo y con mayor crecimiento.
- ✓ La proliferación de brotes, utilizando ápices caulinares, fue mayor en medio de cultivo MS con BAP 2 mg/L, formándose 3 brotes/explante, en tanto que la mayor elongación de brotes se alcanzó con KIN 2 mg/L.
- ✓ La mayor tasa de enraizamiento de los ápices caulinares, con 2,4 raíces y una longitud de 30,5 mm de largo se alcanzó en el medio de cultivo MS ½ suplementado con AIB 1 mg/L.
- ✓ La mayor inducción de callos friables, blancos y cubriendo el 65% del explante, se observó en hipocótilos, utilizando el medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D 1 mg/L.
- ✓ Estructuras semejantes a embriones somáticos se indujeron en hipocótilos, cotiledones y embriones zigóticos inmaduros en medio de cultivo MS suplementado con Dicamba 0,5 mg/L + 2,4-D 3 mg/L y en embriones zigóticos inmaduros en medio de cultivo MS suplementado con Dicamba 2 mg/L, a 4 semanas de cultivo.
- ✓ Inducción de callos con apariencia organogénica, a partir de hipocótilos, se observó en medio de cultivo MS suplementado con BAP 3 mg/L y agua de coco 20%.
- ✓ Se observó como única respuesta organogénica raíces, en un número de 3,7 raíces por explante, en medio de cultivo MS suplementado con ABA 5 mg/L, en dos meses de cultivo.

- ✓ Las plantas *in vitro* *C. montana*, pudieron ser conservadas *in vitro* durante seis meses, aplicando ABA 0,1 mg/L en medio de Cultivo de Murashige & Skoog a la mitad en explantes **con raíz** se obtuvo mejor resultado, que **sin raíz** obteniendo de esta manera la disminución del crecimiento del ápice y de los órganos sin afectar su fisionomía y logrando plantas con buena apariencia con una tasa de supervivencia del 70%..
- ✓ La aplicación de la sustancia osmoreguladora ABA en pequeñas cantidades (0,1mg/L en medio MS a la mitad) es una alternativa viable para la conservación *in vitro* de plántulas de *C. montana* durante 6 meses, puesto la concentración limitó el crecimiento y la preservación de material vegetal fue bueno, ya que no se afectó la fisionomía del explante.
- ✓ También el crecimiento se redujo con el empleo de sales MS y el incremento de las concentraciones de manitol al 6 %, únicamente en explantes con raíz se logró disminuir el crecimiento de los ápices, obteniendo una supervivencia del 60%.
- ✓ El mejor medio de cultivo para la regeneración de plantas, conservadas durante seis meses, fue el MS ½ suplementado con ABA 0,5 mg/L + AIB 1 mg/L, observándose una mayor elongación del brote, número de raíces y hojas formadas y 83% de supervivencia.

7. RECOMENDACIONES

- ☞ En la germinación de semillas se recomienda remplazar el agar con algodón empapado de MS, para evitar el uso del agar y de esta forma ahorrar recursos.

- ☞ En la fase de proliferación y enraizamiento se recomienda usar explantes de más de 2cm de altura, para obtener mejores resultados.

- ☞ Para la producción de callos friables se recomienda usar el medio de cultivo MS + 2-4D en concentraciones mayores a 1mg/l.

- ☞ Bajar la concentración de manitol 6%, al 2% o 3% para evitar problemas de toxicidad, vitrificación y muerte de los explantes y de esta forma alarga el tiempo de permanencia de los explantes en el medio de cultivo

8. BIBLIOGRAFÍA

- Araya, E., Gómez, L., Hidalgo, N., Valverde, R. 2000. Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación in vitro de (*Alnus acuminata*) Agronomía Costarricense Gómez, ; Vol. 24, Núm. 001, Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 75-80 pp.
- Baena M.; Jaramillo S.; & Montoya J.E. 2003. Material de apoyo a la capacitación en conservación in situ de la diversidad vegetal en áreas protegidas y en fincas. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticas, Cali - Colombia. Pág. 129.
- Bajaj, Y.P.S. (ed.). 1986. Biotechnology in Agriculture and Forestry 1. Trees I. Springer-Verlag, Berlín. 515 pp.
- Berrios, A; Sandoval, FJ; Müller, LE. 1991. Propagación clonal in vitro de diferentes especies de poró. Turrialba. 41(4):607-614.
- Bioteología vegetal. Citado el 15 de junio del 2010. Disponible en la Web: <http://apuntes.rincondelvago.com/bioteologia-vegetal.html>
- Bonga, J.M. & D.J. Durzán. (eds.). 1987. Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 1. General principles and Biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. 399 pp.
- Borja, C. y Lasso, S. 1990. Plantas Nativas para Reforestación en el Ecuador. Quito, Ec. Fundación Natura. 208 p.
- Cabrera, M.; Ordóñez, O. 2004 "Fenología, Almacenamiento de Semillas y Propagación a Nivel de Vivero de Diez Especies Forestales Nativas

del Sur del Ecuador. Tesis de Ingeniero Forestal. Universidad Nacional de Loja. Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. Loja-Ecuador Pp. 136.

Calva, C; Pérez, J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Artículo universitario. México. [Citado 1 de Julio de 2010] Disponible en la Web: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm>

Calva, C; Pérez, J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Artículo universitario. México. [Citado 1 de Julio de 2010] Disponible en la Web: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm>

Carrizosa MS. y C. Serrano 1997. Propagación de *Cedrela montana* por cultivo in vitro. Memorias del IV congreso de la Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. Tomo II: 255-260).

Castillo, M., Machida, H., Cortés, C., García F., 2011 (INIFAP), 2CENID-COMEF (INIFAP) MULTIPLICACIÓN Y CONSERVACIÓN IN VITRO DE CEDRO ROJO (*Cedrela odorata*. L.) A PARTIR DE MERISTEMOS. VI Reunión Nacional de Innovación Forestal León, Guanajuato.

Castro, D. 2001. Micropropagación de *Cedrela odorata* L.. Universidad de Colombia, 17p.

Celestino, I. Hernández, E. Carneros, D. López. V., y Toribio, M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Finca El Encín. Apdo. 127. 28800

Alcalá de Henares (Madrid)

Champagne, D., Koul, O., Isman, M., Scudder, G., Towers, G., 1992. Biological activity of liminoids from the Riales. *Phytochemistry*. 394 p.

Cintrón B. 1990. *Cedrela odorata*. L. Department of Agriculture, Forest Service.

Costa N., C. Volkmer, F. Netto y A. Viana 2002. In vitro culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae) *Plant Tissue Cult. & Biotech.* Vol. 70, N° 3, 259 – 268

Daquinta M, Lezcano Y, Cid M, Rodríguez M, Pina D, Escalona M. 2003. Callogénesis en meliáceas exóticas (*Khaya nyasica* Stapf y *Toona ciliata*). Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila. *Biotecnología Vegetal* Vol. 3, No. 2: 123 – 125.

Daquinta M., R. Rodríguez, L. Ramos, L. Capote, et al. 2003. Manejo Biotecnológico de Especies Forestales y Bambúes en Cuba. XII World Forestry Congress. Québec City, Canadá.

Davies, P.J. (ed.). 1995. *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 833 pp.

Davies, P.J. 1995. The plant hormones: Their nature, occurrence, and function. En: *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. P.J. Davies (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 1-12.

- Delgado, G.E. & C. Rojas. 2001. Cultivo de Tejidos. Fundamentos y Aplicaciones. Vol. 1. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú. 256 pp.
- Endress, R. 1994. Plant Cell Biotechnology. Springer-Verlag, Berlín. 331 pp.
- Engelmann F. & Takagi H. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma.
- Espinosa A.; Salas L.; González P.; Silva J. 2002. Empleo de ácido abscísico, manitol y la disminución de la concentración de las sales del medio de cultivo en la conservación in vitro de Ipomoea batatas. Biotecnología vegetal. Vol. 2: 39-42.
- Estrada A.; García B.; González M.; Nuñez Y.; Kosky G.; Bernard M. 2009. Aplicación de algunas técnicas de estadística multivariada al estudio de la conservación in vitro de germoplasma de Dioscorea alata L. Vol. 9, No. 3. Cuba.
- FAO. 2005. Situación actual de la forestación y reforestación en el Ecuador. [Citado 12 de Julio de 2010] Disponible en la Web: <http://www.fao.org>.
- FAO. 1993. Conservation of genetic resources in tropical forest management. Principles and concepts. FAO Tropical Forestry. 107p.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller & K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
- García L., Águila., Feria M, Acosta K. 2007 Instituto de Biotecnología de las

Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Centro Universitario Vladimir I. Lenin. Las Tunas, Cuba.

George, E.F. 1993. Plant tissue culture techniques. En: Plant propagation by Tissue Culture. E.F. George (ed.). Edington, Exegetics Limited.

Guerrero, C., Ramírez A., 2000. Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. in vitro. *Journal of Experimental Botany* 48(309):951-962.

González J.A. & Peña, Y. 2007. Establishment of efficient protocols for massive propagation of tropical trees from Mesoamerica through somatic embryogenesis: *Cedrela odorata*, *Swietenia macrophylla*, *Cyrtosperma donnell-smithii*, *Crescentia cujete* and *Cordia dodecandra*. In: Proc. 2nd IS Acclim. Establish. Microprop. Plants. *Acta Hort.* 748: 229-234.

Hartman, H.T. & D.E. Kester. 1990. Propagación de Plantas. Co. Edit. Continental, México. 810 pp.

Hartman, H. Y Kester, D. 1997. Propagación de Plantas. México D.F. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. 760 p.

Herrera, A., Villegas, M., López, R. 2011. Evaluación de las respuestas morfogénica y tamizaje fitoquímico de callo obtenido a partir de disco de hoja de *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – CIBUQ., Universidad del Quindío. Av. Bolívar calle 12 norte Armenia Quindío. Colombia. 2 pp."

Holdridge L. R. 1999 Zonas Ecológicas de vida. Vol 105 No. 2727: 367-368.

Infante, J., Jara, A., Rivera, O. 2008. Arboles y arbustos mas frecuentes de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 31 pp.

Iriondo J., 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Dpto. Biología Vegetal, E.U.I.T. Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. España. [Citado 12 de Julio de 2010] Disponible en la Web: http://www.inia.es/gcontrec/pub/germoplasma_1161158274546.pdf

Jacobsen, J.V., F.Gubler & P.M. Chandler. 1995. Giberellin action in germinated cereal. En: Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. P.J. Davies (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 246-271.

Jiménez, A.,Gonzalez.E. 1998. Generalidades del Cultivo in vitro. En: J. Pérez Ponce (Ed). Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología. Cap.1.Vol.1. IBP,Santa Clara: 13-24.

Krikorian, A.D. 1991. Propagación clonal in vitro. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. W.M. Roca & L.A. Mroginski (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Pp. 95-125.

Litz, R.E. & R.L. Jarret. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. W.M. Roca & L.A. Mroginski (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Pp. 143-172.

- López, P.Cr. 1990. Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos. En: V.M. Villalobos (Ed). Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO (105): 15-19.
- Maruyama, E., I. Kinoshita, K. Ishii, K. Ohba y A. Saito. 1997b. Alginate-encapsulated technology for the propagation of the tropical forest trees: *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart. and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. *Silvae Genet.* 46: 17–23.
- Maruyama, E., K. Ishii, A. Saito & K. Migita. 1989. Micropropagation of cedro (*Cedrela odorata* L.) by shoot tip culture. *J. Jpn. For. Soc.* 71: 329–331.
- Medina L., Sotolondo R., 2004. Avances en el cultivo de tejidos de *Swietenia Macrophylla* King. Y *Swietenia Mahogani* Jacq. (HÍBRIDO DE CAOBA) Universidad de Pinar del Río. Calle Martí 270 Final, Pinar del Río, lucia@af.upr.edu.cu / soto@af.upr.edu.cu.
- Montes, M.2007. Metodología de micropropagación de segmentos nodales de caoba (*Swietenia humilis*), obtenidos mediante semilla seleccionada. 2ª publicación.
- Mroginski, L.A., W.M. Roca & K.K. Kartha 1991. Crioconservación de germoplasma. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. W.M. Roca & L.A. Mroginski (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Pp. 715-730.
- Muñoz, T., S. 2003. Embriogénesis Somática en Cedro (*Cedrela Odorata* Linnaeus) a partir de Cotiledones. Tesis Biol. Universidad Nacional Agraria de la Molina. Lima, Perú.

- Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- Murashige, T. 1977. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of the Academia Sinica* 18: 1-24.
- Murayama, e.; k. Ishii. 1997 «Somatic Embryogenesis in Big-Leaf Mahogany (*Swietenia macrophylla* King)», Somatic embryogenesis in woody plants, vol. 5, Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, 1997, pp. 45-63.
- Olmos, S; Luciani, G; Galdeano, E. 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Argentina [Citado 10 de Julio de 2010] http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte5_cap1.pdf
- Orellana, M. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo In vitro para los explantes nodales de Caoba (*Swieteniamacrophylla*. King). Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 85 p.
- Peña Y., Domínguez, A., Juárez, J., Robert M. 2010. Desarrollo Y Caracterización De Un Sistema De Propagación De Cedro Rojo (*Cedrela odorata*. L.) Mediante Embriogénesis Somática En Biorreactores De Inmersión Temporal. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 # 130 Col. Chuburná de Hidalgo 97200 Mérida Yucatán. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Carretera Costera del Golfo Km 216.4 96100 Acayucan, Veracruz Tel. / Fax +52 924 2457410 e-mail. unibve@itsacayucan.edu.mx

- Peña, Y., Gómez J, Gómez L, -Pérez JL, García S., Gonzáles J., Robert M. 2010. Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata*. L.) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. In Vitro Cell Dev Biol–Plant
- Peña-Ramírez, Y.J., J. Juárez-Gómez, L. Gómez-López, J.L. Jerónimo-Pérez, I. García-Sheseña, J.A. González-Rodríguez & M.L. Robert. 2010. Multiple adventitious shoot formation in spanish red cedar (*Cedrela odorata*. L.) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol. In Vitro Cell Dev. Biol. – Planta 46:149-160.
- Pérez M. 2000. Ensayo para mejorar la germinación de la Grosella tropical (*phyllanthusacidus* (L.)Skeels). Zamorano, tesisprevi para obtener el titulo de Ing. Agrónomo.Pag. 22. honduras
- Pérez, M., Ramírez, H., Núñez P., & . Ochoa, A. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguas Calientes.
- Pérez, J. 2010. Cultivo in vitro de tejidos vegetales en Phaseolussp. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Universidad de Granma, Cuba. [citado18 de Junio de 2010] Disponible en la Web: <http://www.monografias.com/trabajos67/cultivo-tejidos-vegetales/cultivo-tejidos-vegetales.shtml>
- Pérez. J; Mesén. F; Hilje. L; Agilar M. 2001. Metodología de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata*. . Fase de desarrollo y enraizamiento1. Comunicación Técnica. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Pierik, R. 1990. Cultivos in vitro de plantas superiores. Madrid, Mundi-prensa.

Radice S., 2007 INTA Castelar. Morfogénesis . Parte 1. Capítulo II.

Roca, W.M., D.I. Arias & R. Chávez. 1991. Métodos de conservación in vitro del germoplasma. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. W.M. Roca & L.A. Mroginski (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Pp. 697-713.

Roca, W; Mroginski, L. 1991. Cultivos de tejidos en la agricultura fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia.

Rosales F.; Pérez G.; & Santizo M. 2004. Estudio del efecto de tres retardantes de crecimiento sobre la regeneración in vitro de tres genotipos de ajo (*Allium sativum* L.).

Santos, A. 2011. Modificación De Nutrientes Y Agentes Osmóticos Sobre La Limitación Del Crecimiento In Vitro De *Cinchona Officinalis*, L. Como Herramienta De Conservación. Tesis previa a la obtención del título de Ingeniera en Gestión Ambiental. Universidad Técnica Particular De Loja. Loja-Ecuador.

Scocchi A. & Rey H. 2007. Conservación de germoplasma in vitro. Parte V. Capítulo 3.

Soto, B., Valverde, L., Rojas, A., Hine, A. 2010. Establecimiento in vitro de *Cedrela salvadorensis* Standl. Tecnología en Marcha, Vol. 23, N.º 4. 66-73 p

- Suksa, PA, Kataoka I, Fujime Y, Subhadrabandhu S (1997). Effect of temperature, growth retardants and osmotic potencial of growth of Papaya Shoots Conserverd in vitro. *Tropical Agriculture* 41(1): 7-13
- Tomes, D.T., B.E. Ellis, P.M. Harney, K.J. Kasha & R.L. Peterson (eds.). 1982. Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture & Industry. Plant Cell Culture Centre. University of Guelph, Ontario, Cánada. 231 pp.
- Torres, A.C. & Caldas, L.S. (eds.). 1990. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. ABCTP, EMBRAPA/CNPH, Brasilia, D.F. 433 pp.
- Valverde L., A. Rojas y A. Hine 2008. In vitro Propagation of Albizia guachapele, *Cedrela odorata*. , Platymiscium pinnatum y Guaiacum sanctun. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* N° 18(2), 151 – 156. 2008.
- Villalobos, V.M. & T.A. Thorpe. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. W.M. Roca & L.A. Mroginski (eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Pp. 127-141.
- Villalobos, V.M., T.A. Thorpe & E.C. Yeung. 1982. El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. *Ciencia y Desarrollo*, CONACYT (México) 51:43-59.
- W. M. Roca, D. I. Arias & R. Chávez. 1993. Métodos de conservación in vitro del germoplasma. Unidad de Investigación en Biotecnología Capitulo 31. Cali – Colombia: 704.

Whiters, L.A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR Technical Report. Roma, Italia.

www.abcagro.com. Aplicaciones de la Biotecnología En La Agricultura [Citado 15 de Junio de 2010]

Zapata, F.B. (1994). Estudio morfohistológico y bioquímico de la embriogénesis somática en Coffeacanehoravar. Robusta. Trabajo de Diplomado.UNAH. La Habana. 48 p.

9. ANEXOS

Anexo 1. Valores medios de emergencia de radícula, aparición de los cotiledones y altura de plántulas germinadas *in vitro* de *C. montana*.

TRATAMIENTOS	Inicio de emergencia de la radícula (días)	Aparición de los cotiledones (días)	Altura cm \times los 30 días
TESTIGO	13 ^a	22a	3,1-4a
AG ₃ 1mg/L	11 ^a	20a	4,1-5
AG ₃ 2mg/L	10 ^a	20a	5,1-7

Anexo 2. Figuras obtenidas en el proceso de realización de la tesis.

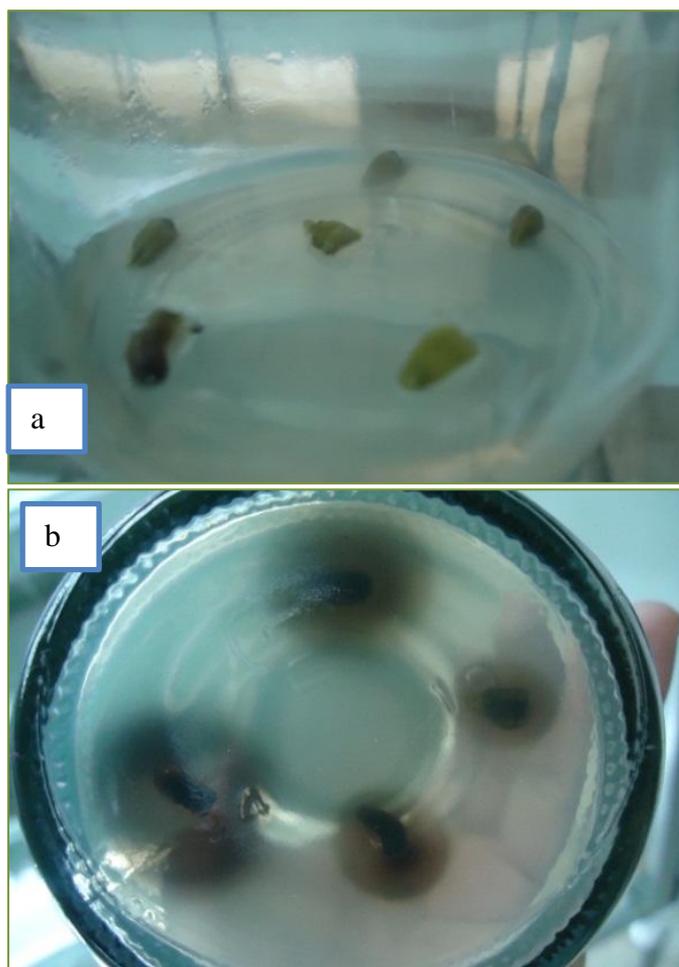


Figura13. a) Flores cultivadas en medio MS más 2 mg/L de ANA b) flores fenolizadas.



Figura 14. Sala de Incubación de los cultivos *in vitro* del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.



Figura 15. Toma de datos, de los diferentes ensayos durante la investigación.



Figura 16. Frutos con semillas maduras

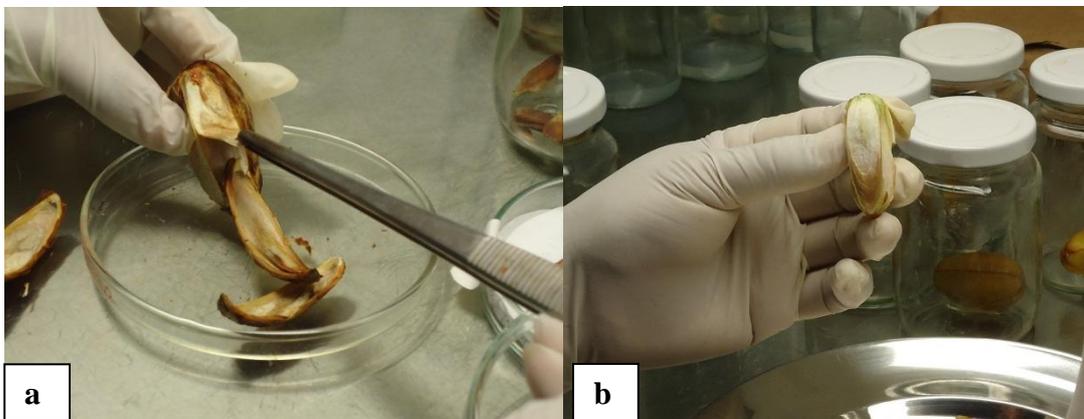


Figura 17. a) Fruto con semillas semi-maduras. b) Fruto semillas inmaduras.



Figura 18. Formación de callo de apariencia embriogénica en explantes de hipocótilo y cotiledones.



Figura 19. Desarrollo de plántulas subcultivadas en medio después de ser conservadas por seis meses *in vitro*.

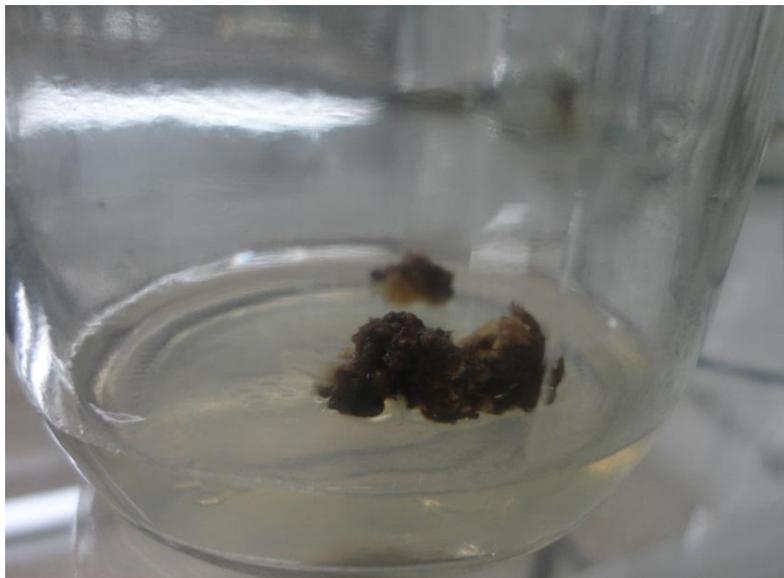


Figura 20. Callo subcultivado en medio de regeneración, sufre proceso de necrosamiento.



Figura 21. Taladrador de las meliáceas, larva *Hypsipyla grandella* (Zeller), encontrada en los frutos inmaduros durante los ensayos.

ANEXO 3. Análisis estadístico, comparación entre tratamientos según la prueba de Tukey, en la fase de proliferación de ápices caulinares; con las siguientes variables:

N° de Brotes Formados

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
.00	6	1.0000			
6.00	7	1.8571	1.8571		
3.00	6		2.0000	2.0000	
4.00	10		2.6000	2.6000	2.6000
5.00	5			2.8000	2.8000
1.00	6			2.8333	2.8333
2.00	5				3.0000
Sig.		.051	.129	.063	.773

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,125.

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
.00	6	1.0000			
6.00	7	1.8571	1.8571		
3.00	6		2.0000	2.0000	
4.00	10		2.6000	2.6000	2.6000
5.00	5			2.8000	2.8000
1.00	6			2.8333	2.8333
2.00	5				3.0000
Sig.		.051	.129	.063	.773

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,125.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Tamaño del Brote (mm)

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
.00	6	2.1701	
6.00	7	2.5714	
5.00	5	4.2000	4.2000
3.00	6	4.3333	4.3333
4.00	10	4.5000	4.5000
1.00	6		5.0000
2.00	5		6.0000
Sig.		.169	.233

N° de Hojas

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
.00	6		2.5000
3.00	6		2.6667
6.00	7		2.7143
4.00	10		2.9000
2.00	5		3.0000
1.00	6		3.3333
5.00	5		3.8000
Sig.			.329

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,125.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

N° de Nudos

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
.00	6		1.3333
6.00	7		1.7143
3.00	6		1.8333
4.00	10		2.1000
1.00	6		2.3333
2.00	5		2.4000
5.00	5		2.4000
Sig.			.127

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,125.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

*Elongación (mm)*HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
6.00	7		15.2857
.00	6		18.0000
1.00	6		19.0000
5.00	5		20.8000
4.00	10		21.3000
2.00	5		25.2000
3.00	6		26.8333
Sig.			.068

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,125.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

ANEXO 4. Análisis estadístico, comparación entre tratamientos según la prueba de Tukey, en la fase de proliferación de segmentos nodales; con las siguientes variables:

*N° Brotes*HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
.00	6	1.3333	
6.00	5	2.0000	2.0000
4.00	8	2.2500	2.2500
2.00	9		2.4444
5.00	5		2.6000
3.00	6		2.6667
1.00	7		2.7143
Sig.		.056	.233

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,293.

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
.00	6	1.3333	
6.00	5	2.0000	2.0000
4.00	8	2.2500	2.2500
2.00	9		2.4444
5.00	5		2.6000
3.00	6		2.6667
1.00	7		2.7143
Sig.		.056	.233

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,293.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Tamaño nuevo brote (mm)

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
.00	6		2.8333
6.00	5		3.8000
2.00	9		4.6667
3.00	6		4.8333
1.00	7		4.8571
5.00	5		5.0000
4.00	8		5.7500
Sig.			.383

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,293.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

*N° hojas*HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
.00	6		2.0000
6.00	5		2.2000
2.00	9		2.5556
4.00	8		3.0000
3.00	6		3.1667
5.00	5		3.2000
1.00	7		3.4286
Sig.			.326

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,293.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

*N° Nudos*HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
.00	6		1.3333
6.00	5		1.6000
2.00	9		1.7778
4.00	8		2.0000
5.00	5		2.0000
1.00	7		2.2857
3.00	6		2.3333
Sig.			.086

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,293.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

*Elongación (mm)*HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
6.00	5		15.6000
.00	6		17.0000
1.00	7		20.0000
3.00	6		22.0000
4.00	8		23.2500
2.00	9		23.5556
5.00	5		24.0000
Sig.			.083

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,293.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

ANEXO 5. Análisis estadístico, comparación entre tratamientos según la prueba de Tukey, en la fase de enraizamiento de ápices caulinares; con las siguientes variables:

Nº de Raíces

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
.00	10	.0000	
6.00	8	.0000	
7.00	7	.0000	
8.00	5	.0000	
3.00	8	.6250	
1.00	6	.6667	.6667
2.00	7	1.1429	1.1429
5.00	7	1.4286	1.4286
4.00	9		2.4444
Sig.		.220	.052

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7,164.
 b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Long. Raíces (mm)

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
.00	10		.0000
6.00	8		.0000
7.00	7		.0000
8.00	5		.0000
3.00	8		3.5000
1.00	6		7.8333
2.00	7		15.2857
5.00	7		16.5714
4.00	9		30.5556
Sig.			.055

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7,164.
 b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

N° Hojas

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
.00	10	.3000		
8.00	5	1.4000	1.4000	
3.00	8	1.5000	1.5000	
6.00	8	1.5000	1.5000	
2.00	7	2.2857	2.2857	
7.00	7	2.5714	2.5714	2.5714
1.00	6		3.3333	3.3333

4.00	9		3.7778	3.7778
5.00	7			5.2857
Sig.		.244	.194	.085

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7,164.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

N° Brotes Formados

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
.00	10	1.0000	
2.00	7	1.0000	
3.00	8	1.0000	
6.00	8	1.0000	
7.00	7	1.0000	
8.00	5	1.0000	
4.00	9	1.1111	
1.00	6	1.3333	
5.00	7		1.8571
Sig.		.158	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7,164.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

N° Nudos

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
8.00	5	1.0000	
.00	10	1.3000	1.3000
7.00	7	1.4286	1.4286

3.00	8	1.5000	1.5000
2.00	7	1.7143	1.7143
6.00	8	1.7500	1.7500
1.00	6	2.0000	2.0000
5.00	7	2.5714	2.5714
4.00	9		2.8889
Sig.		.078	.072

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7,164.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Altura (mm)

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
8.00	5	14.4000	
.00	10	15.1000	
2.00	7	18.2857	18.2857
3.00	8	21.2500	21.2500
6.00	8	23.3750	23.3750
7.00	7		26.5714
4.00	9		26.8889
5.00	7		27.7143
1.00	6		28.6667
Sig.		.239	.103

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 7,164.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

ANEXO 5. Análisis estadístico, comparación entre tratamientos según la prueba de Tukey, en la fase de enraizamiento de segmentos nodales; con las siguientes variables

N° de Raíces

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
.00	7		.0000
2.00	6		.0000
8.00	5		.0000
5.00	9		.1111
6.00	7		.4286
4.00	6		1.3333
3.00	8		1.3750
Sig.			.544

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,634.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Long. Raíces (mm)

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
.00	7		.0000
2.00	6		.0000
8.00	5		.0000
5.00	9		1.1111
3.00	8		13.7500
6.00	7		20.0000
4.00	6		26.0000
Sig.			.280

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,634.

HSD de Tukey^{a.,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
.00	7		.0000
2.00	6		.0000
8.00	5		.0000
5.00	9		1.1111
3.00	8		13.7500
6.00	7		20.0000
4.00	6		26.0000
Sig.			.280

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,634.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

N° Hojas

HSD de Tukey^{a.,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
.00	7	.0000	
8.00	5	1.0000	1.0000
5.00	9	2.2222	2.2222
2.00	6	2.6667	2.6667
6.00	7	3.0000	3.0000
3.00	8	3.6250	3.6250
4.00	6	4.3333	4.3333
Sig.		.070	.119

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,634.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

N° Brotes Formados

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
.00	7	1.0000	
2.00	6	1.0000	
8.00	5	1.0000	
5.00	9	1.3333	1.3333
4.00	6	1.5000	1.5000
3.00	8	1.6250	1.6250
6.00	7		1.8571
Sig.		.279	.486

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,634.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

N° Nudos

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
.00	7		1.0000
2.00	6		1.0000
8.00	5		1.4000
5.00	9		1.5556
6.00	7		2.0000
3.00	8		2.5000
4.00	6		2.5000
Sig.			.315

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,634.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

*Altura (mm)*HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
.00	7	16.7143		
8.00	5	17.6000	17.6000	
2.00	6	20.3333	20.3333	20.3333
5.00	9	24.0000	24.0000	24.0000
6.00	7	25.5714	25.5714	25.5714
4.00	6		26.6667	26.6667
3.00	8			27.5000
Sig.		.064	.054	.214

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,634.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

ANEXO 6. Análisis estadístico, comparación entre tratamientos según la prueba de Tukey, en la fase de formación de callos, friables y/o compactos; con las siguientes variables

- **HIPOCOTILOS**

HSD de Tukey ^a				
T	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
AIA 1	10	.0000		
AIA 2	10	22.5000	22.5000	
ANA 2	10	30.0000	30.0000	30.0000
2,4-D 2	10		37.5000	37.5000
ANA 1	10		47.5000	47.5000
2,4-D 1	10			65.0000
Sig.		.180	.362	.076

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000.

- **COTILEDONES**

HSD de Tukey^a			
T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
AIA 1	10	.0000	
AIA 2	10	.0000	
ANA 2	10	.0000	
ANA 1	10	7.5000	
2,4-D 1	10		37.5000
2,4-D 2	10		52.5000
Sig.		.961	.567

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000.

ANEXO 7. Análisis estadístico, comparación entre tratamientos según la prueba de Tukey, en la fase de iniciación de callo de apariencia embriogénica; con las siguientes variables

Efecto de las auxinas para la inducción de callos embriogénicos - Inicio de formación de callos embriogénicos promedio

Hipocótilos

HSD de Tukey^a			
T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
AIA 1	10	.0000	
2,4-D 2	10		17.3000
ANA 2	10		20.5000
ANA 1	10		20.9000
2,4-D 1	10		21.6000
AIA 2	10		25.8000
Sig.		1.000	.478

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000.

Cotiledones

HSD de Tukey^{a,b}			
T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
AIA 1	10	.0000	
AIA 2	20	.0000	
ANA 2	10	.0000	

ANA 1	10	7.3000	
2,4-D 1	10		21.0000
2,4-D 2	10		25.7000
Sig.		.327	.773

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,909.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Embriones zigóticos inmaduros

in_cls_inm

HSD de Tukeya

t	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
AIA 1	10	.0000	
AIA 2	10	.0000	
ANA 2	10	.0000	
ANA 1	10	6.5000	6.5000
2,4-D 2	10		13.0000
2,4-D 1	10		14.2000
Sig.		.151	.053

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000.

Efecto de las auxinas para la inducción de callos embriogénicos – Tamaño del callo

Hipocótilos

HSD de Tukeya

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
AIA 1	10	.0000		
AIA 2	10	22.5000	22.5000	
ANA 2	10	30.0000	30.0000	30.0000
2,4-D 2	10		37.5000	37.5000
ANA 1	10		47.5000	47.5000
2,4-D 1	10			65.0000
Sig.		.180	.362	.076

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000.

Cotiledones

HSD de Tukeya

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
AIA 1	10	.0000	
AIA 2	10	.0000	
ANA 2	10	.0000	
ANA 1	10	7.5000	
2,4-D 1	10		37.5000
2,4-D 2	10		52.5000
Sig.		.961	.567

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000.

Embriones zigóticos .

HSD de Tukey ^a				
T	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
AIA 1	10	.0000		
AIA 2	10	.0000		
ANA 2	10	.0000		
ANA 1	10	7.2000		
2,4-D 1	10		52.5000	
2,4-D 2	10			77.5000
Sig.		.945	1.000	1.000
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000.				

Efecto de combinación de Dicamba y auxinas para la inducción de callos embriogénicos

Inicio de formación de callos embriogénicos – Embriones zigóticos

*maduros*HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Dicam 0.5 – 2,4-D 3	10	11.7000	
Dicam 3 – 2,4-D 0,5	11	15.4545	
Dicam 1 – 2,4-D 0,5	10		25.4000
Dicam 0.5 – 2,4-D 1	9		26.7778
Sig.		.102	.821

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9,950.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

*Tamaño del callo - Embriones zigóticos maduros*HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Dicam 0.5 – 2,4-D 1	9	41.6667		
Dicam 1 – 2,4-D 0,5	10	62.5000	62.5000	
Dicam 3 – 2,4-D 0,5	11		81.8182	81.8182
Dicam 0.5 – 2,4-D 3	10			92.5000
Sig.		.086	.125	.597

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9,950.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

ANEXO 8. Análisis estadístico, comparación entre tratamientos según la prueba de Tukey, en la fase de iniciación de callo de apariencia organogénica; con las siguientes variables

El efecto de Dicamba, agua de coco y BAP en medio con el MS (TY17)*Formación del callo*HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05
---	---	------------------------------

		1	2
AC 20% - Bap 3	8	33.8750	
Dic 3 – AC 20%	5	36.8000	36.8000
AC 20%	3		40.0000
Sig.		.153	.112

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,557.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Tamaño del callo

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
Dic 3 – AC 20%	5		65.0000
AC 20%	3		75.0000
AC 20% - Bap 3	8		100.0000
Sig.			.129

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4,557.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Efecto de citocininas (BAP, KIN Y 2IP) más sulfato de adenina (SA) *HIPOCOLITOS - Formación del callo*

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
KIN 1	10	.0000		
KIN 2	9	.0000		
2IP 1	9	.0000		
2IP 2	10	.0000		
BAP 1	7		35.5714	
BAP 2	9			40.1111

Sig.		1.000	1.000	1.000
------	--	-------	-------	-------

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8,873.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

HIPOCOLITOS - Tamaño del callo

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
KIN 1	10	.0000	
KIN 2	9	.0000	
2IP 1	9	.0000	
2IP 2	10	.0000	
BAP 1	9		30.5556
BAP 2	9		41.6667
Sig.		1.000	.591

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9,310.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

ANEXO 9. Análisis estadístico, comparación entre tratamientos según la prueba de Tukey, en la fase de Regeneración de palntas conservadas poe seis mese in vitro; con las siguientes variables *Elongación*

Var

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
AIB 1	10	37.2000	
ABA 0,5	12	44.8333	44.8333
ABA 0,5+ AIB A	15		51.2667
Sig.		.176	.285

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

N° Raíces

Var

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
AIB 1	10		.4000
ABA 0,5	12		.4167
ABA 0,5+ AIB A	15		.5333
Sig.			.929

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

N° Nudos

HSD de Tukey^{a,b}

T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
ABA 0,5	12		1.7500
AIB 1	15		2.3333
ABA 0,5+ AIB A	10		2.6000
Sig.			.058

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

N° Hojas

HSD de Tukey^{a,b}			
T	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
ABA 0,5	15		2.6667
AIB 1	10		2.8000
ABA 0,5+ AIB A	12		4.3333
Sig.			.080

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.
