



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS,
RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

TEMA:

VALIDACIÓN DE DOS TIPOS DE CITOQUININAS Y TRES DOSIS DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DEL ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE: INGENIERA AGRÓNOMA, OTORGADO POR LA UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR, A TRAVÉS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS NATURALES DEL AMBIENTE, CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

AUTORA:

MIRIAN YOLANDA CHIMBORAZO SISA

DIRECTORA:

ING. SONIA FIERRO BORJA Mg.

GUARANDA – ECUADOR

2020

VALIDACIÓN DE DOS TIPOS DE CITOQUININAS Y TRES DOSIS DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DEL ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh.

REVISADO Y APROBADO POR

**ING. SONIA FIERRO BORJA Mg.
DIRECTORA**

**ING. KLEBER ESPINOZA MORA Mg.
ÀREA DE BIOMETRÌA**

**ING. NELSON MONAR GAVILANEZ M.Sc.
ÀREA DE REDACCIÒN TÈCNICA**

CERTIFICACIÓN DE LA AUTORÍA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



Yo, Mirian Yolanda Chimborazo Sisa, con cédula de identidad número 0202237251, declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autor (es).

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.

MIRIAN YOLANDA CHIMBORAZO SISA

AUTORA

CI: 020223725-1

ING. SONIA FIERRO BORJA Mg.

DIRECTORA

CI: 020108471-2

ING. NELSON MONAR GAVILANEZ M.Sc.

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

CI: 020108983-6

Notaria Tercera del Cantón Guaranda
Msc. Ab. Henry Rojas Narvaez
Notario



Nº ESCRITURA 20200201003P00

DECLARACION JURAMENTADA

OTORGADA POR:

MIRIAN YOLANDA CHIMBORAZO SISA

INDETERMINADA

DE: 2 COPIAS L.L.

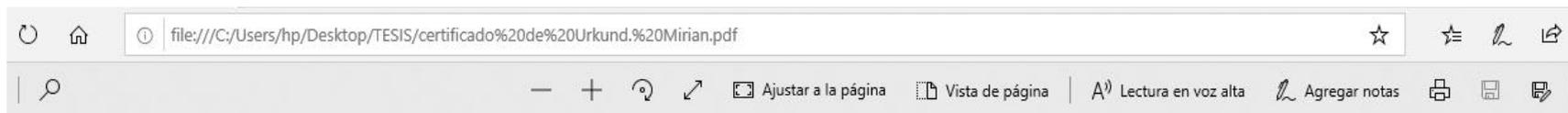
En la ciudad de Guaranda, capital de la provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día veintinueve de septiembre del dos mil veinte, ante mi Abogado HENRY ROJAS NARVAEZ, Notario Público Tercero del Cantón Guaranda, comparecen: la señorita MIRIAN YOLANDA CHIMBORAZO SISA soltera, domiciliada en el recinto Piedra Grande del cantón Echeandía y de paso por esta ciudad de Guaranda, celular 0967464304, correo electrónico es mirianchimborazo@gmail.com por sus propios y personales derechos, obligarse a quien de conocerla doy fe en virtud de haberme exhibido sus documentos de identificación y con su autorización se ha procedido a verificar la información en el Sistema Nacional de Identificación Ciudadana; bien instruida por mí el Notario con el objeto y resultado de esta escritura pública a la que procede libre y voluntariamente, advertida de la gravedad del juramento y las penas de perjurio, me presenta su declaración Bajo Juramento declaran lo siguientes "Previo a la obtención del título de Ingeniera Agrónoma, manifiesto que el criterio e ideas emitidas en el presente trabajo de investigación titulado "VALIDACIÓN DE DOS TIPOS DE CITOQUININAS Y TRES DOSIS DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DEL ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) (O.Berg) Mc Vaugh", es de mi exclusiva responsabilidad en calidad de autores". Es todo cuanto puedo declarar en honor a la verdad, la misma que la hago para los fines legales pertinentes. HASTA AQUÍ LA DECLARACIÓN JURADA. La misma que elevada a escritura pública con todo su valor legal. Para el otorgamiento de la presente escritura pública se observaron todos los preceptos legales del caso, leída que les fue a la compareciente por mí el Notario en unidad de acto, aquel se ratifica y firma conmigo de todo lo cual doy Fe.

MIRIAN YOLANDA CHIMBORAZO SISA
C.C. 0202237251

AB. HENRY ROJAS NARVAEZ

NOTARIO PUBLICO TERCERO DEL CANTON GUARANDA





URKUND

Documento: [TESIS MIRIAN CHIMBORAZO.docx](#) (D78923920)
Presentado: 2020-09-10 18:20 (-07:00)
Presentado por: mirianchimborazo@gmail.com
Recibido: nmonar.ueb@analysis.orkund.com
Mensaje: Análisis del Urkund [Mostrar el mensaje completo](#)
5% de estas 40 páginas, se componen de texto presente en 10 fuentes.

Lista de fuentes	Bloques
	a0404abc-2399-49aa-abfc-6006d3713bf
	https://docolayer.es/55684767-ingeniera-en-biotecnologia.html
	https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%2C%20Audoin%2C%20Leigue%20...
	submission.pdf
	https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1195/1/T-ESPE-014978.pdf
	https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/530/1/T-ESPE-019539.pdf
	Tesis_Borrador_Chacón.docx

1 Advertencias Reiniciar Exportar Compartir

UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA: VALIDACIÓN DE DOS TIPOS DE CITOQUININAS Y TRES DOSIS DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DEL ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE: INGENIERA AGRÓNOMA, OTORGADO POR LA UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR, A TRAVÉS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS NATURALES DEL AMBIENTE, CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

AUTORA: MIRIAN YOLANDA CHIMBORAZO SISA DIRECTORA: ING. SONIA FIERRO BORJA Mg.

GUARANDA – ECUADOR 2020

VALIDACIÓN DE DOS TIPOS DE CITOQUININAS Y TRES DOSIS DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DEL ARRAYÁN (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh.

REVISADO Y APROBADO POR

Activar Windows
Ve a Configuración para activar Windows.

DEDICATORIA

A Dios, por haberme guiado por el camino de la felicidad y permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. A mis amados padres Carlos Chimborazo y María Sisa por ser los pilares fundamentales, inspiración y ejemplo, quienes me han acompañado en cada paso que doy, enseñándome a no desfallecer ni rendirme ante nada.

También dedico este proyecto a mi esposo, compañero inseparable de cada jornada, el represento gran esfuerzo en momentos de decline y cansancio. A ellos este proyecto, que, sin ellos, no hubiese podido ser posible.

Mirian Yolanda

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias Recurso Naturales y del ambiente en especial a la Carrera de Ingeniería Agronómica y a sus docentes por haber contribuido con los conocimientos teóricos - prácticos para mi formación profesional.

Al laboratorio de Biotecnología, por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto, especialmente al Ing. Víctor Hugo Cortez quien me brindó su apoyo en todo momento con sugerencias y recomendaciones para el desarrollo de la fase de laboratorio.

De igual manera a los miembros del Tribunal: Ing. Sonia Fierro B, Ing. Kleber Espinoza y el Ing. Nelson Monar, por sus valiosas sugerencias realizadas a la presente investigación.

A mis queridas hermanas Ana, Karina y Verónica por su cariño, confianza y apoyo brindado.

Mirian Yolanda

ÌNDICE GENERAL

CONTENIDOS	PAG.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PROBLEMA	4
III. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1. Origen.....	6
3.2. Clasificación taxonómica.....	6
3.3. Sinónimos.....	7
3.4. Nombres vernaculares	7
3.5. Distribución geográfica.....	7
3.6. Localización	8
3.7. Descripción botánica.....	8
3.7.1. Árbol	8
3.7.2. Hojas	8
3.7.3. Flores.....	8
3.7.4. Frutos	8
3.7.5. Semillas.....	9
3.8. Importancia	9
3.9. Usos.....	10
3.9.1. Alimenticio.....	10
3.9.2. Combustible	10
3.9.3. Materia prima	10
3.9.4. Medicinal.....	11
3.9.5. Ambiental.....	11
3.9.6. Otros usos.....	11
3.10. Métodos de propagación	11

3.10.1. Multiplicación sexual	12
3.10.2. Multiplicación asexual	12
3.11. Reguladores de crecimiento vegetal.....	12
3.11.1. Auxinas	13
3.11.2. Citoquininas	14
3.11.3. Giberelinas	14
3.11.4. Ácido abcísico (ABA).....	15
3.11.5. Etileno	15
3.12. Medio de cultivo	16
3.12.1. Clasificación de los medios de cultivo.....	16
3.13. Micro propagación	17
3.13.1. Ventajas de la propagación	18
3.13.2. Desventajas	18
3.14. Cultivo in vitro de plantas	19
3.14.1. Principales problemas en el cultivo in vitro.....	19
3.14.2. Cultivo in vitro de tejidos vegetales.....	20
3.14.3 Cultivo de meristemas y yemas axilares.....	21
3.15. Etapas de la propagación in vitro	21
3.15.1. Etapa I.....	21
3.15.2. Etapa II.....	21
3.15.3. Etapa III.....	22
3.15.4. Etapa IV	22
3.16. Requerimientos para un laboratorio de cultivos de tejidos	22
3.16.1. Área de preparación de medios de cultivo	23
3.16.2. Área de lavado y de esterilización	23
3.16.3. Área de Transferencia	24

3.16.4. Área de incubación.....	24
3.16.5. Área de crecimiento in vivo	25
3.16.6. Áreas de cuarentena y de control fitosanitario.....	25
3.16.7. Área de oficina	25
IV. MARCO METODOLÓGICO.....	26
4.1 Materiales.....	26
4.1.1 Ubicación de la investigación	26
4.1.2 Situación climática y geográfica	26
4.1.3 Zona de vida.....	26
4.1.4 Material experimental	26
4.1.5 Materiales de campo	27
4.1.6 Equipo del laboratorio.....	27
4.1.7 Material de laboratorio.....	27
4.1.8 Materiales de oficina	28
4.1.9 Desinfectantes	28
4.2 Métodos.....	28
4.2.1 Tratamientos.....	28
4.3 Tipo de diseño experimental	29
4.3.1 Procedimiento	29
4.3.2 Tipos de análisis.....	29
4.4 Métodos de evaluación y datos tomados.....	30
4.4.1 Número de ex plantas contaminados (NEC).....	30
4.4.2 Días a la brotación (DB)	30
4.4.3 Número de brotes por explante (NBE)	30
4.4.4 Longitud de los brotes (LB)	30
4.4.5 Número de hojas por explante (NHE).....	30

4.4.6 Días a la emisión de raíces (DER)	31
4.4.7 Longitud de la raíz (LR).....	31
4.4.8 Volumen de la raíz (VR).....	31
4.5 MANEJO DEL EXPERIMENTO	31
4.5.1 Selección de la planta.....	31
4.5.2 Recolección de brotes en el campo	31
4.5.3 Evitar deshidratación del material vegetativo	31
4.5.4 Desinfección del material en el laboratorio	32
4.5.5 Selección del medio a utilizar	32
4.5.6 Introducción del material in vitro.....	33
4.5.7 Preparación del medio de cultivo para crecimiento	34
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS	61
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
7.1. CONCLUSIONES	62
7.2. RECOMENDACIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1.	Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables NEC y DB.	35
TABLA N°2.	Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del factor A: Variables, NEC evaluados a los 15 días y DB.	37
TABLA N°3.	Resultados de a prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamientos FB de las variables Número de explantes contaminados (NEC) y días a la brotación (DB).	38
TABLA N°4.	Resultados de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables Número de brotes por explante (NBE), Longitud de brote (LB), Número de hojas de explante (NHE), a los 30, 60 y 90 días.	40
TABLA N° 5.	Análisis de efecto para comparar promedios de Factor A en las variables Número de brotes por explante (NBE) Longitud del brote (LB) y las variables Número de hojas por explantes (NHE), a los 30, 60 y 90 días.	44
TABLA N°6.	Resultados de la prueba de Tukey al 5% para evaluar promedios del Factor B: En las variables Número de brotes por explantes (NBE), Longitud del brote (LB) Número de hojas por explantes (NHE), a los 30, 60 y 90 días.	47
TABLA N°7.	Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables Días a la emisión de raíces (DER), Longitud de raíz (LR), Volumen de raíz (VR) los dos últimos evaluados a los 90 días.	51
TABLA N°8.	Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del factor A: Variables, Días a la emisión de	

raíces (DER), Longitud de raíz (LR) y Volumen de raíz (VR) las dos últimas variables evaluadas a los 90 días.	55
TABLA N°9. Prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de Factor B dosis en las variables Días a la emisión de raíces (DER), Longitud de raíz (LR) y Volumen de raíz (VR) las dos últimas variables evaluadas a los 90 días.	58
TABLA N° 10. Resultados del análisis de correlación y regresión lineal de la variable independiente (Xs) la misma que obtuvo una relación estadística significativa con la variable de pendiente Y.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1. Promedio de los tratamientos AxB de la variable número de explantes contaminados a los 15 días en el Cantón Guaranda, 2020.	35
FIGURA N°2. Promedio de la interacción AxB de la variable días a la brotación (DB) en el Cantón Guaranda, 2020.	36
FIGURA N°3. Tipo de reguladores de crecimiento en las variables Número de ex plantes contaminados y días a la brotación.	37
FIGURA N°4. Promedio de las variables Número de explantes contaminados (NEC) a los 15 días y Días a la Brotación (DB) en el Cantón Guaranda, 2020.	39
FIGURA N°5. Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en la variable Número de brotes explantes (NBE) en el Cantón Guaranda, 2020.	41
FIGURA N°6. Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en la variable Longitud del brote (LB) en el Cantón Guaranda, 2020.	42
FIGURA N°7. Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de interacción (AxB) en las variables Número de hojas por explante (NHE) en el Cantón Guaranda, 2020.	43
FIGURA N°8. Resultado de promedios del Factor A Citoquininas en la variable Numero de brotes por explante (NBE) 90 días, en el Cantón Guaranda 2020.	45
FIGURA N° 9. Resultados de promedios del factor A Citoquininas en la variable Longitud del brote (LB) a los 90 días, en el Cánton Guaranda, 2020.	45
FIGURA N° 10. Resultado de promedios del Factor A Citoquininas en la variable Número de hojas del explante (NHE) a los 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.	46

FIGURA N°11. Resultado de promedios del Factor B. Dosis en la variable Número de brotes del explante, a los 30,60 y 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.	48
FIGURA N°12. Resultado de promedios del Factor B. Dosis en la variable Longitud del brote a los 30,60 y 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.	49
FIGURA N°13. Resultado de promedios del Factor B. Dosis en la variable número de hojas del explante a los 30,60 y 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.	49
FIGURA N°14. Promedio de la interacción AxB en la variable Días a la emisión de raíces en el Cantón Guaranda, 2020.	52
FIGURA N°15. Promedio de la variable Longitud de raíz (LR), evaluados a los 90 días en el Cantón Guaranda 2020.	53
FIGURA N°16. Promedio de la variable volumen de raíz (VR) evaluados a los 90 días en el Cantón Guaranda 2020.	54
FIGURA N°17. Resultado de promedios del Factor A Cito quininas en la variable Días a la emisión de raíces, en el Cantón Guaranda, 2020.	55
FIGURA N°18. Resultado de promedios del Factor A Cito quininas en la variable, longitud de raíz a los 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.	56
FIGURA N°19. Resultado de promedios del Factor A Cito quininas en la variable, Volumen radicular a los 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.	57
FIGURA N°20. Promedio de las variables Días a la emisión de raíces (DER), Longitud de raíz (LR) y Volumen de raíz (VR) tomados a los 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.	59

ÌNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Mapa de ubicación del ensayo	70
Anexo 2. Base de datos de las variables del proyecto	71
Anexo 3. Fotografías del proceso de la investigación	72
Anexo 4. Glosario de términos técnicos	74

RESUMEN Y SUMMARY

RESUMEN

El arrayán (*Myrcianthes hallii*) (*O. Berg*) *Mc Vaugh*, posee una única época de fructificación anual, por lo tanto, la propagación sexual de esta especie resulta difícil, ya que las semillas de muchas Myrtaceas son extremadamente sensibles a la sequedad, perdiendo su capacidad de germinar en pocas semanas, factor que dificulta su propagación natural lo que resulta una limitante muy importante frente a la gran demanda que existe en el mercado. El arrayán es considerado como una de las especies maderables más valiosas del mundo y posee uno de los mayores índices de tala con un porcentaje mayor al 60%, y por ende haciendo indispensable su propagación mediante cultivo in vitro. La siguiente investigación tuvo como objetivos, 1. Determinar las características agronómicas de las plántulas de arrayán en cada uno de los tratamientos. 2. Evaluar en cuál de las dosis se obtiene un mayor número de plántulas de arrayán. 3 Conocer en que tratamiento se obtiene las mejores características agronómicas de las plántulas de arrayán. El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología de la UEB, los explantes fueron recolectados de la comunidad de Potrerirro perteneciente a la Parroquia San Simón Cantón Guaranda, esta investigación se desarrolló con la utilización de dos Citoquininas (Kinetina y Bencyl adenina) con tres dosis de 1,3 y 5mg en un diseño de Bloques completamente al azar (DCA). Posteriormente se evaluaron las diferentes variables endonde sobresalio en T2 (Kinetina con 3mg) , obteniendo las mejores características agronómicas de los explantes de arrayán evaluados a los 30,60 y 90 días, la hormona que represento menor número de plantas contaminadas fue el nivel A1 (Kinetina) y para la variable volumen de raíz sobresalio el nivel A2 (Bencyl adenina). Los tratamientos fueron evaluados en un medio de cultivo MS con macro, micro nutrientes, vitaminas.

Cultivo, Demanda, Mercado, Propagacion, Contaminacion.

SUMMARY

The myrtle (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh, has a unique time of annual fruiting, therefore, the sexual spread of this species is difficult, since the seeds of many Myrtaceas are extremely sensitive to dryness, losing their ability to germinate in a few weeks, a factor that it hinders its natural propagation, which is a very important limitation in the face of the great demand that exists in the market. The arrayan is considered as a of the most valuable timber species in the world and has one of the highest logging rates with a percentage greater than 60%, and therefore making it indispensable its propagation through in vitro culture. The following investigation had as objectives, 1 To determine the agronomic characteristics of myrtle seedlings in each of the treatments. 2 Evaluate in which of the doses you get a higher number of seedlings of myrtle. 3 Know in which treatment the best agronomic characteristics of myrtle seedlings are obtained. The research work was carried out in the biotechnology laboratory of the UEB, the explants they were collected from the community of Potrerirro belonging to the Parish San Simon Canton Guaranda, this research was carried out with the use of two cytokinins (Kinetina and Bencil adenine) with three doses of 1.3 and 5mg in a design of Blocks completely random (DCA). Subsequently, the different variables were evaluated where they excelled in T2 (Kinetin with 3mg), obtaining the best agronomic characteristics of the arrayan explants evaluated at 30,60 and 90 days, the hormone that represented the smallest number of contaminated plants was A1 (Kinetin) and for the variable Root volume the hormone A2 (Bencil adenine) stood out. The treatments were evaluated in an MS culture medium with macro, micronutrients, vitamins.

Culture, Demand, Market, Spread, Contamination.

I. INTRODUCCIÓN

Especie nativa nombrada en el año 1856 como *Eugenia hallii* por el botánico alemán Otto Berg; el nombre de la especie reconoce a su recolector, el coronel inglés Francis Hall, quien fue un botánico aficionado que recolectó cientos de especies de plantas en todo el Ecuador, el espécimen estudiado por Berg lo hizo en la planicie de Quito. Esta especie se encuentra reportada para Venezuela, Ecuador y Perú; probablemente también en Colombia. En nuestro país se encuentra a lo largo de la región andina, desde los 2500 hasta los 3000 msnm. (Fundación botánica de los Andes, 2019).

El Gobierno Nacional del Ecuador durante años viene ejecutando planes de forestación y reforestación a nivel nacional, los gobiernos provinciales fueron los delegados para realizar este trabajo en sus respectivas jurisdicciones lo cual llevo a la construcción de diversos viveros, en el que se incluye el vivero del Consejo Provincial de Bolívar ubicado en el cantón Chillanes, que produce tanto plantas nativas como exóticas, las cuales se utilizan para implementar plantaciones puras y de conservación de suelos.

El territorio de la provincia de Bolívar por su ubicación geográfica tiene diversidad de recursos naturales, distintas zonas de vida y ecosistemas, que van desde hábitats de altura, hasta selvas subtropicales, con niveles significativos de biodiversidad, recursos intangibles como paisaje, aire y potenciales turísticos y agropecuarias que basadas en sistemas de uso intensivo de recursos naturales ejercen presión sobre los diferentes ecosistemas, generando problemas como: deforestación, sobrexplotación, desertificación, erosión, contaminación, avance de la frontera agrícola, entre otros. (Gobierno de la Provincia de Pichincha, 2019).

Para la reforestación considera a las especies forestales representativos, como “Faique” (*Acacia macracanta*), “Yagual” (*Polylepis incana*) y “Arrayán” (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh, éste último perteneciente a la familia Myrtaceae, nativo de los bosques andinos de Ecuador.(Terraecuador, 2019).

Otra razón para que la especie sea considerada en el proyecto son sus características agronómicas pues es de crecimiento lento, alcanzando alturas de 15 metros, siendo

ideal para sembrarlo y admirarlo en los bosques de la sierra ecuatoriana. (Mora, F. 2005).

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro*, es una técnica de propagación en condiciones totalmente asépticas, en la que, a partir de un pequeño segmento inicial de tejido, es posible regenerar en poco tiempo miles de plantas genéticamente iguales, utilizando variables físicas y químicas controladas como medio de cultivo. Esta poderosa herramienta permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo, así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. (Gonzales, C. Vilca , J. 2016).

El cultivo “*in vitro*” permite multiplicar masivamente a esta importante especie a través de herramientas biotecnológicas, sin tener que esperar a su única época de fructificación, que es una limitante muy importante. (Jaramillo, K. 2013).

La micro propagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo de tejidos, es así una herramienta útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. (Olmos et al. 2010).

Esto es posible gracias a la “totipotencia celular” que es la capacidad inherente de una célula vegetal de dar origen a una planta completa, propiedad que a menudo es retenida, incluso después que una célula ha experimentado la diferenciación final en el cuerpo de la planta. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban. (Ortega, 2016).

Una hormona vegetal o fitohormona es un compuesto producido internamente por una planta, que trabaja en muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales. Las aplicaciones agronómicas de reguladores de crecimiento, compuestos en general mucho más potentes que sus análogos naturales, revisten aspectos críticos que deben ser considerados: oportunidad de aplicación, dosis, sensibilidad de la variedad, condición de la planta, etc. (De la semántica a la agronomía, 2019).

La micro propagación de especies arbóreas ofrece una vía rápida de producir a nivel industrial o semi industrial plantas clónales para reforestación, producción de biomasa leñosa y conservación de germoplasma elite y raro. La biotecnología es una alternativa para la preservación de especies aumenta la de multiplicación de plántulas para suplir la demanda comercial. (Gonzales, C. Vilca , J. 2016).

Los objetivos que se plantearon en la investigación son:

- Determinar las características agronómicas de las plántulas de arrayán en cada uno de los tratamientos.
- Evaluar en cuál de las dosis se obtiene un mayor número de plántulas de arrayán.
- Conocer en que tratamiento se obtiene las mejores características agronómicas de las plántulas de arrayán.

II. PROBLEMA

El continuo crecimiento poblacional ha desencadenado un consumo desigual y desmedido de los recursos naturales para poder cubrir sus necesidades, por lo cual en estos últimos años se ha llegado a tener un alto índice de suelos degradados, por cuanto los consejos provinciales tienen la labor de remediar estos con una continua producción de especies forestales para reforestar dichas zonas degradadas por el ser humano.

El arrayán es considerado como una de las especies maderables más valiosas del mundo y posee uno de los mayores índices de tala con un porcentaje mayor al 60% (Grogan, J. Verrissimo, P. 2002). Sus poblaciones muestran indicios de declive y fragmentación en la mayor parte de su área de distribución, provocando una disminución acelerada, además se encuentra incluida en la lista de especies en peligro vulnerable por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre. (CITES, 1994).

Uno de los grandes desafíos que afronta la técnica de cultivo “in vitro” es la propagación vegetativa de especies forestales, esto se debe a que la genética propia de la especie involucra largos ciclos de vida, ya que la producción de frutos del arrayán es muy rara, por lo tanto, la propagación de esta especie resulta difícil. (Ramirez, C. Romero, M. 1980).

Las semillas de muchas Myrtaceas son extremadamente sensibles a la sequedad, perdiendo su capacidad de germinar en pocas semanas, factor que dificulta su propagación.

Además, existen ciertas limitantes como el elevado índice de contaminación tanto endógena como exógena, ocasionada por diversos microorganismos propios del hábitat del arrayán, dificultando su establecimiento sexual natural de la planta, dando lugar a la pudrición y como consecuencia a su muerte de la semilla.

Resulta complicado encontrar ejemplares de la especie con características agronómicas deseables; ya que en el Ecuador es una especie que está en peligro de extinción debido a su explotación para materia prima y combustible. (Lojan , L. 1992).

Esta investigación se realizó porque se esta especie es muy apetecida, y se comercializa a precios muy elevados, así también existe gran demanda de semillas y plantas en el mercado, pero existe pocas fuentes semilleras dedicadas a la producción de esta especie ya que la fructificación es muy rara y las plántulas son muy sensibles al ataque de plagas y enfermedades, para lo cual pretendió encontrar la técnica para la micro propagación “in vitro” de “arrayán”, partiendo de extracción de brotes, por ello el cultivo in vitro permite multiplicarla masivamente a esta importante especie a través de herramientas biotecnológicas.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Origen

Descrita como árbol nativo de la serranía del Ecuador, el “Arrayán” es una planta doméstica y común que se encuentra en jardines, en algunas zonas forman rodales de la misma especie en compañía de pequeños arbustos. (Mora, F. 2005).

El “Arrayán” fue nombrada en el año 1856 como *Eugenia hallii* por el botánico alemán Otto Berg; el nombre de la especie reconoce a su recolector, el coronel inglés Francis Hall, quien participó en el proceso independentista del actual Ecuador y quien también fue miembro del grupo El Quiteño Libre. Hall como botánico aficionado recolectó cientos de especies de plantas en todo el Ecuador, el espécimen estudiado por Berg lo hizo en la planicie de Quito. Sus hojas son usadas como especia para aromatizar la tradicional colada morada, sus frutos son comestibles. Antiguamente era una práctica común la masticación de sus hojas para mantener limpia la dentadura y eliminar el mal aliento. El nombre científico reconocido actualmente por los botánicos para esta especie es *Myrcianthes hallii*. (Fundación botánica de los Andes, 2019).

3.2. Clasificación taxonómica

Taxonómicamente el Arrayán, se encuentra clasificado de la siguiente manera según (Gaibor, M, 2000) y (Govaerts, R. 2010).

Reino: Plantae

División: Fanerogamae

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledonae

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Género: *Myrcianthes*

Especie: *M. hallii*

Epíteto específico: *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh

3.3. Sinónimos

El nombre científico aceptado del arrayán es *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh, pero anteriormente fue identificado con otros nombres en los que el género cambio, a diferencia de la especie que se mantuvo. Por ello (Govaerts, R. 2010), lo tiene en su registro con los siguientes sinónimos:

Amyrsia hallii (O. Berg) Kausel

Eugenia hallii (O. Berg)

3.4. Nombres vernaculares

Conocido en varias comunidades andinas como: arrayán, arrayán de castilla (castellano), wawal hembra (castellano-kichwa), chiruito (lengua no especificada), (Gaibor, M. 2000)

3.5. Distribución geográfica

Se encuentra distribuido entre los 2.200-3.000 msnm. Alrededor de 130 géneros y 4500-5000 especies se encuentran en la región del Mediterráneo, el África, Madagascar, Asia tropical y templada, Australia, islas del Pacífico tropical y América del Sur donde se puede encontrar 10 géneros (cinco introducidas) y 121 especies (50 endémicas) en China. Muchas se cultivan ornamentalmente en jardines, árboles de la calle, o árboles de la plantación. (Bay Science Foundation. 2019).

El arrayán es una especie característica de las zonas andinas, está mejor representado en los andes del Ecuador. Encontrándose en los Bosques Húmedos Andinos con altitudes de 1600 a 3300 msnm; en el lado oriental, a veces a altitudes más bajas. Estratos Bosque Siempre Verde Andino Montano, Bosque Siempre Verde Andino Pie de Monte, Bosque Siempre Verde Andino de Ceja Andina, característica que lo hace útil para plantaciones y sistemas agroforestales. (Palacios , W. 2011).

Esta especie se encuentra reportada para Venezuela, Ecuador y Perú; probablemente también en Colombia. En nuestro país se encuentra a lo largo de la región andina, desde los 2500 hasta los 3000 msnm. (Fundacion botánica de los Andes, 2019).

3.6. Localización

Aunque los arrayanes prefieren lugares húmedos, también se los encuentra en sitios más secos, cuando han sido plantados. (Lojan, L. 1992).

3.7. Descripción botánica

3.7.1. Árbol

Árboles medianos a grandes, de 6 a 15 m de altura, diámetros de 30 a 40 cm, su tronco es irregular y retorcido con nudosidades, la corteza de color rosado rugoso con un espesor de 3 mm. Tienen ramificaciones opuestas, la copa es globosa, redonda, espesa y ovalada cuando se encuentra solitaria, al cortarlos producen rebrotes del tocón. (Palacios, W. 2011).

3.7.2. Hojas

Las hojas son típicamente pequeñas de forma ovalada, lisas, de ápice obtuso, base redonda, peciolada en el borde entero con nervaduras de tipo pinnatinervias, el haz tiene una coloración verde brillante, el envés verde claro, su textura es coriácea y por su posición son opuestas. La lámina foliar posee un promedio de 6.5 cm de longitud y 3.5 cm de diámetro, caracterizándose por ser perennes, verdes todo el año y si se las miran con cuidado a contra luz, se ven que están como perforadas con minúsculos puntos translúcidos que son la esencia (aceite esencial y taninos), motivo por el cual despiden un aroma característico al estrujarlas. (Mora, F. 2005).

3.7.3. Flores

Esta planta posee una flor mediana perfecta de sépalos unidos de color blanco a blanco amarillento, la corola libre de 4 a 5 pétalos con estambres numerosos, con un ovario ínfero de 5 lóculos con 1 a 3 semillas en cada lóculo. (Barragán, M. Remache, K. 1998).

3.7.4. Frutos

El fruto es una baya redonda a menudo violácea de 1 cm de diámetro de color negro cuando está maduro, comestible para el hombre y los animales, tiene un sabor dulce agradable. En la parte central de la sierra ecuatoriana produce frutos de color café que

contiene de 5 a 15 semillas; fructifica por los meses de marzo hasta abril, (Palacios, W. 2011).

3.7.5. Semillas

Semillas sin endospermo o endospermo escaso y fino; cartilaginosa, testa membranosa o fina, a veces ausente, embrión recto o curvo. La mayor parte de los frutos poseen una sola semilla, a pesar de ello en los ensayos realizados de germinación in vitro previos a la micro propagación se pudo observar poliembrionía que, es el fenómeno en el cual en una semilla existen presentes dos o más embriones. (Hartmann, H. Kester, D. 1997).

Es un árbol o arbusto silvestre nativo del Ecuador, posee una altura entre 10 – 15 m, de hojas opuestas, a veces alternas, de forma ovada, la lámina de la hoja tiene venas secundarias pinnadas o basal, a menudo con venas intramarginales cerca del margen. Tiene las inflorescencias axilares o terminales, posee flores bisexuales, a veces polígamas, actinomorfas, los lóbulos del cáliz 3 - 5 o más, son separados o connados en una caliptra. Tiene 4 o 5 Pétalos, estambres generalmente numerosos, filamentos separados o connados en 5 paquetes de pétalos opuestos; anteras 2-unicelulares, dorsifijas o basifijas, dehiscentes longitudinalmente, o rara vez terminal, por lo general terminan en conectores 1 o más glándulas apicales. Ovario inferior, semi-inferior, o muy pocas veces fusionados entre sí, superior, de 2 a más, lóbulos, muchas veces presenta placentación parietal axilar. Fruto en cápsula, baya, o drupas. Semillas sin endosperma o endospermo escaso y fino; cartilaginosa testa membranosa o finas, a veces ausente, embrión recto o curvo. (Bay Science Foundation. 2019).

3.8. Importancia

Es una especie que requiere de suelos fértiles y un ambiente húmedo a su alrededor. Por tal razón son ideales para ser sembrados a orillas de quebradas y otros cursos de agua, sin embargo, su crecimiento es muy lento, por lo que se le debe proporcionar las condiciones óptimas para un buen desarrollo. (Jaramillo, K. 2013).

Propiedades físicas y mecánicas del arrayán en el Ecuador

- Alta densidad y resistencia al cizallamiento, mediana resistencia a la compresión.

- Recomendada para elementos estructurales de construcción civil, puertas, ventanas, muebles, chapas decorativas y parquet.
- También se utiliza para elaborar carbón de excelente calidad. (Lojan , L. 1992).

3.9. Usos

Los arrayanes tienen muchos usos, los frutos son comestibles, la madera es de buena calidad, rebrotan fácilmente al cortarlos y se utilizan en agroforestería para obtener varios beneficios. (Borja, F. 1992).

Para ésta planta se han definido algunos componentes fitoquímicos: aceite aromático, glucósidos de fenol, antraquinónico, ramnosantina, saponinas, taninos. (Cerón, C. 1993).

3.9.1. Alimenticio

En el Ecuador, las hojas frescas de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh, son una especia indispensable en la colada morada del día de difuntos. En las industrias cárnicas caseras se utilizan las hojas como condimento para darles un sabor especial. Las hojas se usan como especia en la preparación de champuz (tipo de chicha de maíz molido), colada y dulces de sambo en Cotopaxi, Carchi, Imbabura, Pichincha y Bolívar. (De La Torre, L. Navarrete, P. 2008).

3.9.2. Combustible

Sirve de combustible, ya sea como leña o para fabricar carbón. Las ramas secas, al igual que las hojas, son usadas como leña, los árboles viejos, ramas o troncos gruesos para fabricar carbón. Encontrándose en peligro de extinción en su hábitad debido a la explotación incontrolada a través de los años. (Mora, F. 2005).

3.9.3. Materia prima

Sus diversos usos se deben a la dureza, peso y color rosado a crema de la madera. Sirve de materia prima para la fabricación de arados, timones, puyas, rejas, postes, pilares, muebles, puertas, estacas, vigas de calidad y en la construcción de casas. Se usa como madera en la elaboración de artesanías y adornos, en algunos casos para la construcción de cercas. También se utiliza para elaborar arcos de violín. Los agricultores la utilizan para cabos de las herramientas de labranza. (Monar, M. 2000).

3.9.4. Medicinal

Su propiedad medicinal se debe a la cualidad térmica caliente, sus hojas ricas en tanino y aceite volátil tienen principios activos como glucósido antraquinónico, ramosantina, saponina y glucósidos de fenol. Los efectos medicinales encontrados son astringente, aromático, tónicoestimulante, anti-inflamatorio, descongestionante ocular, analgésico, emoliente, anti-reumático, anti-espasmódico, anti-odontalgia, antigripal, antiséptico y para resolver problemas pulmonares, hepáticos y renales, (Central Ecuatoriana de Servicios Agropecuarios. CESA. 1993).

Al hervir la fruta en agua emana una cera de olor agradable con la cual se puede fabricar velas. Útil en el tratamiento de desarreglos pulmonares y para contrarrestar el sudor nocturno de la tisis. Es un tónico y se dice que estimula las partes o funciones que están en decadencia. Las hojas secas y molidas secan heridas, las hojas verdes con su sabor agridulce al ser masticadas mejoran las encías y blanquean los dientes. (Mora, F. 2005).

3.9.5. Ambiental

Los árboles grandes, con raíces sedientas, retienen el agua en el suelo, favoreciendo procesos químicos de neutralización; mientras que las plantas chicas, se convierten en auténticas esponjas al impedir que el agua circule libremente por la superficie del suelo, evitando problemas de inundación o deslaves. En Azuay se siembra el arrayán como cerca viva con fines agroforestales debido a su capacidad de rebrote. (De La Torre, L. Navarrete, P. 2008).

3.9.6. Otros usos

El “Arrayán” por ser una especie que crece en los Andes y presta utilidad, así; se lo encuentra en linderos, dentro de los potreros, cerca de las viviendas y aún dentro de las propiedades urbanas por su valor ornamental. (Lojan, L. 1992).

3.10. Métodos de propagación

Para realizar la propagación de (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh se puede optar por la multiplicación sexual o asexual que se describen a continuación:

3.10.1. Multiplicación sexual

El Arrayán se propaga por semillas, para su obtención se recoge frutos maduros y unos 15 días antes de la siembra se extrae la semilla. Para la siembra, se la coloca de 24 a 48 horas en agua para regular y para acelerar la germinación, ya que las semillas de *Myrcianthes hallii* (O. Berg) Mc Vaugh son recalcitrantes por lo que pierden viabilidad en poco tiempo, no soportan períodos de almacenamiento, razones suficientes que obligan a realizar la siembra después de su recolección. (Borja, F. 1992) y (Lojan , L. 1992).

3.10.2. Multiplicación asexual

Para la propagación vegetativa se debe utilizar estacas de 15 cm de largo y 1 a 2 cm de diámetro, que tengan al menos 3 yemas tomadas de la parte media de las ramas. Para un prendimiento óptimo debe tener humedad elevada y constante. (Reynel, C. 2019).

El uso de esquejes de 8 a 12 cm de largo que se toman de los árboles y tienen la forma de ramillete con las hojas verdes en la punta. Los esquejes se cortan con tijeras a 1 cm por debajo de la última protuberancia fresca y se guardan en un recipiente con agua. Se repican en bolsas con tierra preparada o directamente en el campo, antes del repique se cortan las hojas, dejando de 3 a 4 ramilletes. (Mora, F. 2005).

El arrayán rebrota con facilidad, se recolectan aquellas plantitas, rebrotes o macollos que están en el suelo extrayéndolos con algo de tierra se les lleva a un lugar especial para darle los cuidados necesarios y luego trasplantarlas al lugar definitivo, su crecimiento es lento, después del trasplante requiere buenos niveles de humedad. (Mora, F. 2005).

3.11. Reguladores de crecimiento vegetal

Son compuestos que se sintetizan naturalmente dentro del tejido de la planta, es decir endógenamente y cumplen un rol regulatorio más que nutricional en el crecimiento y desarrollo. Estos compuestos generalmente activos a muy bajas concentraciones, son conocidos como sustancias de crecimiento, fitohormonas u hormonas vegetales. Químicos sintéticos con similar actividad fisiológica para modificar el crecimiento y

desarrollo de la planta son denominados también como reguladores de crecimiento. (Suarez, S. 2016).

Los reguladores de crecimiento vegetal se agrupan en cinco categorías: auxinas, citokininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Además de estas sustancias naturales de la planta existen otros productos que pueden utilizarse como reguladores de crecimiento para el cultivo in vitro. (Iañez, E. 2019).

3.11.1. Auxinas

Son utilizadas muy ampliamente en técnicas in vitro y son agregados al medio nutritivo para estimular el crecimiento de callo, órganos, suspensión de células y para regular la morfogénesis.

Se sintetizan en ápices de tallos jóvenes, por lo tanto, tienen efecto en la dominancia apical y formación de órganos. Tienen movimiento basipétalo (descendente), estimulan la división y alargamiento celular tanto en yemas existentes como en la emergencia de yemas adventicias, también promueven el enraizamiento. (Barragán, M; Remache, K. 1998).

Dentro de las auxinas más utilizadas en cultivo de tejidos se puede mencionar

1. Ácido indolacético (AIA)
2. Ácido naftalenacético (ANA)
3. Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)
4. Ácido indolbutírico (AIB)

De las auxinas antes mencionadas la más utilizada en cultivo de tejidos es el ANA cantidades altas favorecen el crecimiento de callos.

El 2,4-D es la auxina más fuerte, induce también a la formación de callos, puesto que tiende a suprimir la organogénesis. Puede causar rápido incremento de ploidia y de pérdida de cromosomas resultando en aneuploidia. (Rodriguez , M. Torres, M. 2018).

3.11.2. Citoquininas

Son compuestos que también intervienen como sustancias de desarrollo. Son muy importantes para la regulación de crecimiento y morfogénesis en cultivo de tejidos. En las plantas las raíces son el principal centro para la biosíntesis de citoquininas de allí son traslocadas hacia los brotes y hojas, tienen movimiento acropétalo (ascendente), tienen efecto en la citocinesis o división celular, de allí el nombre de Citoquininas, interactúan con auxinas en la formación de órganos como la floración; retarda la senescencia, rompe la dominancia apical estimulando el desarrollo de tallos laterales y en el movimiento de nutrientes. (De La Torre, L. Navarrete, P. 2008).

Son constituyentes del ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) y de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y tienen interacción sinérgica con las auxinas. Cuando la proporción citoquinina/auxina es alta favorece la formación de tallos y si es baja favorece la formación de raíces.

Dentro de las citoquininas más utilizadas tenemos

1. Kinetina (KIN)
2. Bencilaminopurina (BAP)
3. 2-isopentil adenina (2ip)
4. Benciladenina (BA)

El BAP, es una buena fuente de citoquininas por eso es la más utilizada en los laboratorios de cultivo de tejidos. (Sergrein, M. 2017).

3.11.3. Giberelinas

Constituyen otra clase de sustancias de crecimiento de plantas. Dentro de las Giberelinas el ácido giberélico (AG3) es el producto más frecuentemente empleado en el cultivo in vitro. Se sintetiza en puntos de crecimiento como meristemas. Las Giberelinas influyen en el crecimiento y desarrollo de diferentes maneras: promueven el crecimiento de entrenudos, estimulan y aceleran la floración, inducen la fructificación. También actúa inhibiendo el crecimiento normal de raíces y tallos en

cultivo de callos. Posee efectos similares a las auxinas, pero su distribución no es polar, y trabaja en los puntos donde las auxinas son inactivas. (Patiet, C. Humberto, L. 2018).

3.11.4. Ácido abscísico (ABA)

Es otra sustancia inhibidora de crecimiento y por ende bloquea el efecto de las Giberelinas y Citoquininas, promueve el estado de dormancia, inhibe la síntesis del ácido ribonucleico (ARN) pero no la del ácido Desoxirribonucleico (ADN). También promueve el cierre de las estomas, tiene efecto sinérgico con auxinas en el enraizamiento de esquejes. Es sintetizado en los cloroplastos. (Gonzales, C. Vilca, J. 2016)

Como su nombre indica, esta hormona está implicada directamente en la senescencia y abscisión de hojas, flores y frutos, así como en la latencia de algunas semillas. Al igual que el etileno, esta fitohormona induce la expresión de genes de resistencia a diversos tipos de estrés. Un efecto del ABA es que provoca el cierre de las estomas ante situaciones de sequía, lo que evita la deshidratación de la planta. (Pierik, R. 2017)

3.11.5. Etileno

La presencia del gas etileno (C_2H_4) en la atmósfera causa anomalías en el crecimiento de las plantas. Se reporta que es producido por la planta y puede actuar como una sustancia de crecimiento con algunas funciones reguladoras.

Varias sustancias químicas relacionadas al etileno han sido sintetizadas. La más utilizada en cultivo de tejidos es el etefon (2-CEPA o ácido 2cloroetilfosfónico). El etileno es producido por las células, tejidos y órganos. Alcanzan mayor proporción en medios sólidos que en medios líquidos o en agitación. Su producción es la misma tanto en la oscuridad como con iluminación, pero sí varía con la especie vegetal. Cantidades de este gas son producidas por las plantas y se acumulan en el cuello de los frascos, aun más, cuando la tapa de los frascos está sellada con para film, esta acumulación puede ser suficiente para modificar la morfogénesis o desarrollo de las plántulas. Flamee momentáneamente la boca de los frascos en el mechero de alcohol para su eliminación durante la micro propagación. (Olmos, S. 2019).

El etileno juega un papel muy importante, junto con el ácido jasmónico, en estimular la producción de sustancias que protegen a la planta de estreses bióticos y abióticos, (Racines, M. 2012).

3.12. Medio de cultivo

Es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias. (Suarez, S. 2016).

Los medios de cultivo más frecuentemente usados para la producción de brotes en angiospermas son WP Woody Plant, y MS murashige & skoog suplementado con BAP (bencilamino purina). Cambiando los nutrientes del medio de cultivo se puede alterar el porcentaje de explantes que formen brotes adventicios y/o el número de brotes adventicios o vástagos. Medios con baja calidad de sales como el WP Woody Plant, 1970 y GD Gresshoff & Doy, 1972 incrementan algunas veces el porcentaje de enraizamiento de brotes axilares en árboles. (Thorpe, J. 2017).

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias. (López, L. 2016).

3.12.1. Clasificación de los medios de cultivo

. En el su estado físico lo clasifica en:

1. Medios líquidos: se utilizan preferentemente para favorecer el desarrollo bacteriano de células estresadas. En determinadas ocasiones no se pueden sustituir por los medios sólidos, por ejemplo, en la síntesis de exotoxinas, pigmentos, enzimas, etc. Ejemplo: Agua peptonada, caldo común, caldo cerebro corazón, caldo saboureaud, etc.

2. Medios sólidos: se utilizan para obtener bacterias aisladas por la formación de colonias sobre la superficie del medio de cultivo y para el estudio de la morfología de las colonias, lo que no permiten los medios líquidos. Se diferencian porque tienen una

sustancia de sostén, que puede ser agar-agar. - Ejemplo: Agar común, agar SS, agar cerebro corazón, agar saboureaud, etc.

3. Medios semisólidos: se utilizan para estudiar la motilidad de las bacterias. Tienen un menor porcentaje de agar, por lo que no solidifican totalmente a la temperatura ambiente. Ejemplo: agar MIO, agar SIM. (Patiño, M. 2019).

3.13. Micro propagación

La micro propagación es el término que hace referencia a la técnica universal de clonación masiva de plantas. Ésta es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica, puesto que permite cultivar células de diversos tipos celulares (tejidos, órganos, semillas, embriones, etc...) produciendo plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada, gracias a la totipotencialidad de dichos tipos celulares. Los cultivos son realizados en medios enriquecidos específicos que permiten las condiciones necesarias para la embriogénesis u organogénesis, siendo necesario un estricto control de las condiciones ambientales. Además, una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso y multiplicar la producción. (Rodriguez , M. Torres, M. 2018).

El cultivo in vitro permite el crecimiento y desarrollo del material vegetal en recipientes que lo separan del ambiente exterior y lo mantienen en condiciones controladas y asépticas. Entre las diversas técnicas del cultivo in vitro, la micro propagación consiste en la producción clonal de vegetales a partir, generalmente, de ápices o espantos nodales de una planta madre. La gran producción de nuevas plantas se ve favorecidas gracias al rápido crecimiento del material vegetal in vitro y a la proliferación de tallos durante los subcultivos, (Patiet, C. Humberto, L. 2018).

Para la propagación in vitro o micro propagación de plantas los protocolos utilizados, se pueden distinguir las siguientes etapas:

- Elección de la planta y/o tejido donante de los explantes
- Establecimiento: desinfección de los explantes y su posterior adaptación al medio artificial de modo de inducir callo, brote o raíz, embrión somático o según se desee.

- **Multiplicación:** generar una masa vegetal suficiente para la regeneración del número de plantas necesarias.
- **Formación de raíces:** con el fin de convertir los brotes o embriones en plántulas completas.
- **Aclimatación:** endurecer las plántulas producidas a las condiciones ambientales donde se desarrollará normalmente. (Perea, D. 2015).

3.13.1. Ventajas de la propagación

En relación con las características ya descritas para los biorreactores, podemos destacar las siguientes ventajas que los convierten en una poderosa herramienta para los cultivos in vitro de células vegetales:

- 1.** Durante el proceso productivo se pueden regular y controlar las condiciones de cultivo, lo cual permite corregirlas en caso de necesidad, aumentando la productividad, seguridad y calidad en todo el proceso.
- 2.** Los procesos de iniciación y colecta son mucho más fáciles lo que ahorra tiempo.
- 3.** Cabe destacar el cultivo celular en suspensión que, al facilitar el intercambio nutritivo entre las células y el medio, aumenta la tasa de replicación y con ello la síntesis de MSs.
- 4.** También permite escalar la producción de cultivos celulares de una forma controlada a partir de unos parámetros establecidos para favorecer la síntesis de compuestos bioactivos. (Enrique, C. 2015).

3.13.2. Desventajas

Entre las desventajas de este método de cultivo cabe mencionar:

- 1.** La posibilidad de contaminación de la muestra, debido por ejemplo a una muerte celular descontrolada. Esto va a afectar la calidad y seguridad del lote volviéndolo inservible para su comercialización. Es un riesgo bastante frecuente que puede aumentar mucho los costes de producción.
- 2.** La necesidad de elegir biorreactores especializados para el tipo de explanto propagado, lo cual puede aumentar los costes de producción y disminuir su

productividad. Además, es posible que el tipo de tejido que se desea propagar no sea lo suficientemente rentable.

3. Esta técnica es muy adecuada para la producción de metabolitos secundarios, puesto que muchos de ellos pueden encontrarse directamente en el medio de producción, facilitando enormemente su extracción. Sin embargo, para la organogénesis y embriogénesis la rentabilidad disminuye, al complicarse el facilitar la correcta nutrición de toda la planta. (Rodríguez, M. Torres, M. 2018).

3.14. Cultivo in vitro de plantas

El cultivo de tejidos en su acepción amplia puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos células desprovistas de pared celular células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. (Mroginski, L. 2019).

El cultivo in vitro de plantas consiste en reproducir numerosos ejemplares a partir de pequeñas partes de tejido de una planta madre, obteniendo plantas homogéneas, en grandes cantidades, libres de patógenos y en cualquier época del año. Esta técnica permite tener una mayor tasa de reproducción que en los cultivos tradicionales y es de gran ayuda para la conservación de especies que estén en peligro de extinción o en estado de vulnerabilidad. Existe una gran diferencia entre las plantas herbáceas y las plantas leñosas, debido a que estas últimas son difíciles de clonar porque tienen una capacidad regenerativa relativamente lenta Pierik, 1990. Las arbóreas (recalcitrantes) han presentado mayores dificultades por su condición estructural y porque los procesos morfológicos fisiológicos y biológicos han sido menos estudiados. (Perea, D. 2015).

3.14.1. Principales problemas en el cultivo in vitro

1. Vitropatógenos Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por explante-medio de cultivo-condiciones física de incubación es altamente

propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. (Pierik, R. 2017).

Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micro propagación se lo puede estimar en alrededor del 10 %. En el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos, pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican. (Olmos, S. 2019).

2. Vitrificación Tanto los medios líquidos como los sólidos pueden producir vitrificación. Fenómeno que se caracteriza por sus desórdenes morfológicos y fisiológicos de las plantas in vitro, se presentan en las hojas dando una apariencia cristalina, afectando la fotosíntesis y el intercambio gaseoso de CO₂ y vapor de agua, (González, S. 2019).

La vitrificación es también conocida como translucidez, hiperhidratación, transformación hiperhídrica, glaucosidad, encharcamiento, vitrosidad. La vitrificación aparece especialmente en las plantas que disponen de una gran cantidad de agua, como ocurre en los medios líquidos o con baja concentración de agar. (Pierik, R. 2017).

3. Oxidación El pardeamiento de los ex plantas es un problema que se presenta con mayor frecuencia en ex plantas de especies leñosas y se relacionan con la liberación al medio y oxidación de poli fenoles, que dan como resultado productos tóxicos para el explante. La luz y la especie son factores determinantes en la oxidación de ex plantas en cultivo in vitro. Este último tiene dos posibles orígenes: uno propio de la planta que produce muchos hidroxifenolesz EWA y taninos, causantes de la oxidación y otro que proviene del uso de algunos desinfectantes, los cuales inducen la oxidación. (Patiño, M. 2019).

3.14.2. Cultivo in vitro de tejidos vegetales

El cultivo in vitro consiste en tomar una porción de una planta (ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerará una o muchas plantas. Durante las últimas décadas, la técnica del cultivo “in vitro” ha ganado especial interés para el establecimiento de diversas plantas para

la producción de compuestos o la obtención de cultivos más sanos y con características genéticas específicas. El cultivo in vitro de vegetales se basa en el aislamiento de órganos, tejidos o células vegetales y en el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuestas fisiológicas o morfo génicas a partir de estos ex plantas. (Höxtermann, 2019).

El cultivo es una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esta técnica se basa en la toti potencia celular, esto es, la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo ciertas condiciones dadas en el cultivo in vitro, logrando una propagación rápida a partir de cualquier parte de una planta. (Palacios, W. 2011).

3.14.3 Cultivo de meristemos y yemas axilares

Se inició en los años 60, con el cultivo aséptico de los brotes y meristemos de la orquídea *Cybidium sp*, que cortados y sembrados correctamente in vitro, poseían la capacidad de producir protocormos que originaron en una plántula. Desde entonces, en diversos cultivos, se utiliza este sistema de propagación a partir de una punta de brote y meristemos, para obtener plantas completas o brotes múltiples. En cualquier caso, se espera la formación de ramas axilares, que puedan ser separadas y enraizadas, teniendo con este sistema una fuente permanente de yemas axilares capaces de producir una plántula, de forma rápida y en grandes cantidades. (Enrique, C. 2015).

3.15. Etapas de la propagación in vitro

3.15.1. Etapa I

Es la etapa en la cual se establece el cultivo inicial, es una etapa crucial, se selecciona el explante y se establece un pretratamiento de desinfección, puesto que los ex plantas obtenidos de plantas adultas pueden estar contaminados con hongos y/o bacterias. El medio utilizado en esta fase generalmente no contiene hormonas. (Olmos, S. 2019).

3.15.2. Etapa II

En esta fase de multiplicación simplemente o multiplicación de brotes y callos. En esta etapa se emplea medios con reguladores crecimiento como, las citoquininas y auxinas.

La fase de elongación se ve incluida en esta etapa (elongación de brotes), es de gran importancia puesto que prepara a las yemas para el enraizamiento, su duración es de 10-15 días, su medio tiene alto contenido de citoquininas. (Pierik, R. 2017).

3.15.3. Etapa III

En la fase de enraizamiento o de pretransplante, es la fase en la que pretende a planta sea autotrófica, para que sea capaz de adaptarse al medio externo Murashige,1974. Para la fase de enraizamiento se requiere un medio adicionado con auxinas, Ácido naftalen acético (ANA) Y Acido indo butírico (AIB) son más efectivos en rizogenesis que ácido indol acético (AIA), además requiere una fuente de carbohidratos, como lo es la sacarosa. (Cleand, E. 2019).

3.15.4. Etapa IV

Es la etapa de adaptación de la vitroplanta al medio externo o la fase de transferencia final. Esta fase es importante, ya que una planta regenerada in vitro, difiere en varios aspectos de una planta originada in vitro, por lo tanto, su adaptación al medio externo es complicada. La vitroplanta debido a la alta humedad relativa (90-100%), posee una cutícula poco desarrollada y su sistema de cierre de estomas esta atrofiado. Además, no realizan un proceso de fotosíntesis normal, ya que su fuente de carbono está dispuesta en el medio, tienen hojas delgadas y con menor contenido de clorofila, por lo tanto, es necesario activar paulatinamente su autótrofa para su adaptación al medio externo. El mecanismo de defensa de estas plantas no está activado, ya que se desarrollan en un ambiente estéril, por lo que resulta importante trabajar en condiciones escépticas, para obtener una lata tasa de sobrevivencia al cambiar las plantas in vitro al suelo. (Patiet, C. Humberto, L. 2018).

3.16. Requerimientos para un laboratorio de cultivos de tejidos

Un laboratorio de cultivo de tejidos se puede dividir esquemáticamente en áreas separadas para las diferentes funciones que se desarrollan en él. Sin embargo, algunas de las funciones pueden desarrollarse en un mismo ambiente. (Santana, A. 2016).

3.16.1. Área de preparación de medios de cultivo

Función: se utiliza principalmente para preparar los medios de cultivo, pero debe proveer también un espacio para almacenar los materiales de vidrio y de plástico y los reactivos químicos. Este ambiente debe contar con mesas de trabajo para la preparación de los medios y para colocar las balanzas, el medidor de pH, los platos calientes con agitación, y otros elementos; también debe incluir vitrinas, estanterías y espacio para el equipo de refrigeración, y para la incubadora o la cámara de crecimiento (o para ambas). (Enrique, C. 2015).

Material y equipo: refrigerador, balanzas, (macrobalanza y de precisión), potenciómetro, plancha eléctrica con agitador magnético, frascos erlenmeyer (125, 250 y 500 ml), botellas y material de vidrio o plástico. (Santana, A. 2016).

3.16.2. Área de lavado y de esterilización

Puede estar constituida por dos áreas conectadas entre sí, o por un solo ambiente, y puede estar localizada dentro del área general de preparación.

Funciones: El área de lavado debe incluir por lo menos un lavadero grande con agua caliente y agua fría y una fuente de agua de alto grado de pureza, preferiblemente agua doblemente destilada; para el efecto se debe usar un destilador de vidrio o de material no tóxico y un desionizador de agua colocado entre el destilador y el lavadero. Esta área debe disponer de un espacio para almacenar agua destilada en botellas de plástico; también debe proveer basureros adecuados para el material vegetal, inorgánico y de vidrio que se deseche. (Santana, C. 2019).

El área de destilación debe tener espacio para el autoclave vertical u horizontal, el cual puede ser pequeño (olla de presión) o grande (de carga frontal y de enfriamiento lento y rápido), según sea el volumen del material que se procese. Esta área también debe incluir espacio para estufas, secadores y un lavadero con agua caliente y fría.

Material y equipo: autoclave manual o automático, destilador de vidrio, gradillas para secado, bandejas de aluminio y de plásticos de varios tamaños, recipientes de plástico grandes, estufas para esterilización y secado. (González, S. 2019).

3.16.3. Área de transferencia

Función: En esta área del laboratorio se realiza el trabajo de excisión, inoculación, y transferencia de los explantes a los medios de cultivo. Dado que este trabajo demanda los más altos niveles de limpieza ambiental, se recomienda la instalación de gabinetes de flujo horizontal o vertical de aire filtrado bajo presión, o la construcción de cuartos de transferencia. Sin embargo, ciertas operaciones de inoculación, como la excisión y el cultivo de ápices y meristemas en tubos de ensayo de boca angosta, se pueden realizar sobre una mesa limpia, ubicada en un lugar del laboratorio libre de corrientes de aire y polvo.

Los gabinetes de flujo laminar deben ubicarse, en lo posible, en un lugar alejado de las puertas y con un mínimo de corriente de aire, con el fin de prolongar la vida útil de los filtros.

Material y equipo: Gabinete de flujo laminar, microscopio de disección con luz incidente, e instrumentos de disección: cuchillas # 10 y # 11, mangos para cuchillas, agujas de disección, pinzas, tijeras, navaja de afeitar. También se necesitan frascos con alcohol, máscaras, guantes, marcadores a prueba de agua, bandejas, y tacho para basuras. (Sergrein, M. 2017)

3.16.4. Área de incubación

Función: Los cultivos se incuban en un cuarto apropiado o en gabinetes o cámaras de crecimiento; estas pueden ser más eficientes en cuanto al control ambiental, pero son más costosas. El área de incubación o crecimiento in vitro debe proporcionar un buen control de la temperatura (20-28 °C), de la iluminación (variable, según las necesidades: 1000 a 5000 lux) y de la humedad relativa (70-80%). (Pierik, R. 2017).

En este cuarto de incubación se instalan estanterías metálicas o de madera para colocar los cultivos. Estas estanterías pueden tener dimensiones variables: el ancho entre 0.3 m 1 m, el largo de acuerdo con el tamaño del cuarto, y la altura total de 1.8 a 2.2 m; la distancia entre peldaños es de 0.2 a .5 m.

Esta área debe incluir, además, un espacio para cultivos en agitación y para cultivos estáticos en la oscuridad.

Es necesario propiciar una buena distribución del aire en este cuarto para evitar zonas de recalentamiento por efecto de luz. Cuando se utilizan tubos fluorescentes, es conveniente sacar los balastos fuera de este cuarto.

La regulación de la temperatura se puede logra por medio de aparatos de aire acondicionado de pared o de un sistema central. En cualquier caso, es necesario tomar precauciones para evitar el calentamiento excesivo, instalando alarmas y controles para cortar l iluminación cuando falle el aire acondicionado. (López , L. 2016).

Material y equipo: un cuarto con temperatura, iluminación y humedad relativas controladas; estanterías con iluminación para los cultivos, bandejas, termómetros de máxima y mínima, y gradillas para tubos de varios tamaños. (Santana, A. 2016).

3.16.5. Área de crecimiento in vivo

Función: Las plantas que se regeneran en el área de incubación se pueden acondicionar o aclimatar y luego trasplantar en macetas, bandejas o camas apropiadas. Estas operaciones se pueden llevar a cabo en tinglados, casas de malla o invernaderos, dependiendo de la condición climática del lugar donde está ubicado del laboratorio y de los requerimientos de aislamiento de los materiales por razones fitosanitarias.

Material y equipo: macetas, suelo, bandejas, cámaras de alta humedad, entre otros. (Suarez, S. 2016).

3.16.6. Áreas de cuarentena y de control fitosanitario

Se incluye en laboratorios con fines de producción de materiales elites de sanidad certificada. El área de cuarentena debe estar separada del resto del laboratorio, pero cercana del área de control fitosanitario.

En el área de control fitosanitario se realizan las pruebas necesarias para comprobar la sanidad de material vegetal, espacialmente causada por virus, hongos y bacterias. (Höxtermann, 2019).

3.16.7. Área de oficina Se debe incluir aquí, el mobiliario de oficina como escritorios, archivos y almacenamiento de datos, los libros de referencia y de control del laboratorio, los catálogos y otros documentos. También se coloca en ella el equipo de cálculo o computación. (Gonzales, C. Vilca, J. 2016).

IV. MARCO METODOLÓGICO

4.1 Materiales

4.1.1 Ubicación de la investigación

Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Parroquia	Veintimilla
Sitio	Laguacoto III

4.1.2 Situación climática y geográfica

Altitud	2622 msnm
Latitud	01° 36 88" S
Longitud	78° 59 88" W
Temperatura media anual	14.5°C
Temperatura máxima	23°C
Temperatura mínima	2°C
Precipitación media anual	880 mm
Heliófila	850(h/l) año
Humedad relativa	70%

(Fuente: Monar, C. 2018 y estación meteorológica Laguacoto II)

4.1.3 Zona de vida

La localidad en estudio de acuerdo a la zona de vida de HOLDRIGE, L, corresponden al bosque seco montano bajo (bs - MB).

4.1.4 Material experimental

- Dos tipos de citoquininas

- Tres dosis de reguladores de crecimiento
- Ex plantas de brotes apicales de arrayán

4.1.5 Materiales de campo

- Tijeras de podar
- Botas
- Papel periódico
- Baldes de 15 litros
- Agua

4.1.6 Equipo del laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Balanza analítica
- Autoclave
- pH metro
- Horno de microondas
- Agitador magnético
- Refrigerador
- Pinzas
- Mecheros
- Erlenmeyer

4.1.7 Material de laboratorio

- Reactivos
- Vasos de precipitación de 1000, 500 y 100 ml.
- Probetas aforadas de 500, 250, 100 y 25 ml.
- Cajas Petri de vidrio
- Tubos de ensayo
- Frascos de vidrio de 250ml.
- Pissetas
- Bisturís
- Papel aluminio

- Ropa de trabajo en laboratorio

4.1.8 Materiales de oficina

- Computadora
- Calculadora
- Cámara fotográfica
- Flash memory
- Papel boom
- Programas estadísticos
- Lápices
- Impresora

4.1.9 Desinfectantes

- Hipoclorito de sodio
- Alcohol antiséptico
- Alcohol industrial

4.2 Métodos

Factores en estudio

Factor A: Citoquininas

A1: Kinetina

A2: Bencyl adenina

Factor B: Dosis de reguladores de crecimiento

B1: 1 mg

B2: 3 mg

B3: 5 mg

4.2.1 Tratamientos

Combinación de factores A x B (2x3) como se detalla en la siguiente tabla.

Tratamiento	Código	Detalles
T1	A1B1	Kinetina + 1mg
T2	A1B2	Kinetina + 3mg
T3	A1B3	Kinetina + 5mg
T4	A2B1	Bencyl adenina + 1mg
T5	A2B2	Bencyl adenina + 3mg
T6	A2B3	Bencyl adenina + 5mg

4.3 Tipo de diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial 2x3x4 rep.

4.3.1 Procedimiento

Localidad	1
Número de tratamientos	6
Número de repeticiones	4
Número de unidades experimentales	24
Número de ex plantas	72

4.3.2 Tipos de análisis

- Análisis de varianza (ADEVA) según el siguiente detalle

Fuente de variación	Grados de libertad	CME
Factor A (a-1)	1	$fe^2 + 12 \Theta^2 A$
Factor B (b-1)	2	$fe^2 + 8 \Theta^2 B$
A x B (a-1) (b-1)	2	$fe^2 + 4 \Theta^2 A \times B$
Exp t(r-1)	18	fe^2
Total (t x r)-1	23	

Cuadrados medios esperados. Modelo fijo. Tratamientos seleccionados por el investigador.

- Prueba de Tukey al 5% para comprobar promedios de tratamientos y factor B.
- Análisis de efecto principal para factor A.
- Análisis de correlación y regresión lineal simple.

4.4 Métodos de evaluación y datos tomados

4.4.1 Número de ex plantes contaminados (NEC)

Variable que fue registrada a los 15 días de haber sido introducidos los brotes en los tubos de ensayo en el medio de cultivo, se realizó de forma visual contabilizando el número de ex plantes contaminados en cada tratamiento.

4.4.2 Días a la brotación (DB)

Dato que fue evaluado mediante observaciones continuas de los explantes en cada uno de los tratamientos, el tiempo se determinó contando los días transcurridos desde la aparición del primer brote a partir del día que se realizó el repique en el medio de cultivo.

4.4.3 Número de brotes por explante (NBE)

Esta variable se registró contabilizando los brotes de los explantes de forma visual de cada uno de los tratamientos a los 30, 60 y 90 días.

4.4.4 Longitud de los brotes (LB)

Se registró tomando 4 frascos al azar de cada uno de los tratamientos, la misma que fue medido desde la base del tallo hasta el ápice de los brotes, dato tomado por la parte exterior del frasco con la ayuda de una regla, variable que se expresó en mm a los 30, 60 y 90 días.

4.4.5 Número de hojas por explante (NHE)

Para evaluar esta variable se procedió a realizar un conteo directo el número total de hojas en los 4 frascos tomados de cada tratamiento a los 30, 60 y 90 días.

4.4.6 Días a la emisión de raíces (DER)

Esta variable se registró contando los días transcurridos desde la aparición de las primeras raicillas de los explantes en más del 50%, esta actividad se realizó a través de un conteo directo.

4.4.7 Longitud de la raíz (LR)

Fue registrado a los 90 días, con la ayuda de una regla en 4 frascos tomados al azar de cada tratamiento, dato que fue tomado desde el sitio de la unión al tallo hasta el ápice radicular, el resultado se expresó en mm.

4.4.8 Volumen de la raíz (VR)

Se registró a los 90 días tomando 4 frascos al azar de cada uno de los tratamientos, la misma que se realizó con la ayuda de una probeta aforada con un determinado nivel de agua, sumergiendo los brotes y de esta forma se obtuvo el volumen de la raíz, el resultado se expresó en cc.

4.5 Manejo del experimento

4.5.1 Selección de la planta

Para la extracción de los brotes se seleccionó la planta madre con menor área afectada de plagas y enfermedades, planta genéticamente óptima como es el vigor, tamaño y edad.

4.5.2 Recolección de brotes en el campo

De la planta madre se extrajeron las mejores ramas jóvenes y de crecimiento activo con longitud de 20 a 30 cm, el material vegetativo fue tomado de la comunidad de Potrerillos, Parroquia San Simón del Cantón Guaranda.

4.5.3 Evitar deshidratación del material vegetativo

Luego de la recolección del material vegetativo en el campo se procedió a cubrirlo con papel periódico humedecido para evitar deshidratación y muerte del explante ya que es muy delicado, esta actividad se realizó con el propósito de cuidar y no tener ningún tipo de pérdida por la muerte y obtener mejores resultados en la ejecución del experimento en estudio.

4.5.4 Desinfección del material en el laboratorio

Para la desinfección de los brotes se procedió a lavarlos con agua destilada y jabón líquido al 5% durante 20 min, luego se realizó enjuagues consecutivos para eliminar los residuos del jabón. Posteriormente en la cámara de flujo laminar desinfectamos los brotes en etanol al 50% durante 2 min, de igual manera se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) al 60% durante 10 min, finalmente se eliminaron los residuos del desinfectante con agua destilada esterilizada, luego de este proceso de desinfección se colocaron los explantes en tubos de ensayos que contienen el medio de cultivo previamente preparado.

4.5.5 Selección del medio a utilizar

Se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog, que sugiere añadir macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, agar y reguladores de crecimiento Kinetina y Bencil- adenina en tres concentraciones 1mg/l, 3mg/l y 5mg/l respectivamente con un pH de 5.6.

Constituyente	Concentraciones de la solución	Volumen de la solución por litro
Azúcar	30g	1000ml
Stoock 1	100ml	
Stoock 2	10ml	
Stoock 3	10ml	
Vitaminas	10ml	
Agar	7g	
pH	5.6- 5.7	

Para su preparación se realizó el siguiente procedimiento

- Se colocó en un vaso de precipitación de 1000 ml de agua destilada, una tercera parte del volumen final a preparar (240ml).
- Se procedió a pesar 30g de azúcar, 7g de agar, en estado sólido. El azúcar se añadió en ese momento y el agar se agregó cuando el medio contenía aproximadamente 80°C.

- Seguido se añadió los macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y reguladores de crecimiento (citoquininas), previamente preparados en tres concentraciones 1,3 y 5mg/l, de cada solución esto se realizó de manera exacta.
- Con la ayuda de un agitador magnético homogenizamos la solución añadiendo los reguladores de crecimiento con sus dosis establecidas para cada tratamiento.
- Con una probeta de 500ml se aforó con agua destilada hasta completar el volumen total de la solución.
- Se midió en pH de la solución, y se ajustó a 5.6
- En el horno microondas se calentó la solución preparada durante 5min y seguido se añadió el agar.
- Seguido se realizó un proceso de dispensación en los frascos de vidrio, 60cc aproximadamente en cada uno.
- Se procedió a la esterilización de los frascos que contienen la solución en la autoclave a 121°C durante 20min.
- Seguido se sacó los frascos de la autoclave en una bandeja metálica y se dejó enfriar durante 24h en el área de transferencia.
- Después del enfriamiento de la solución se realizó el cultivo in vitro de los explantes del arrayán.

4.5.6 Introducción del material in vitro

Luego de la desinfección superficial, de los explantes de arrayán se colocaron en el medio de cultivo estéril. Dentro de un lapso de tiempo comenzó el proceso de brotación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando así el ciclo de cultivo in vitro.

4.5.7 Preparación del medio de cultivo para crecimiento

Volumen 1000ml	
Azúcar	30g
Stook 1	100ml
Stook 2	10ml
Stook 3	10ml
Vitaminas	10ml
IBA	30ml
pH	5.6 – 5.7
Agar	7g

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tratamientos (AxB)

TABLA N°1. Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables NEC y DB.

NEC a los 15 días (NS)			Días a la brotación (*)		
Trat	Promedios	Rango	Trat	Promedios	Rango
T4	2.75	A	T6	25.75	A
T6	2.50	A	T5	16.5	B
T3	2.50	A	T4	13.00	BC
T1	2.25	A	T3	10.75	C
T5	2.10	A	T1	10.75	C
T2	2.00	A	T2	9.5	C
CV= 27.48%			CV= 20.50%		

Letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Chimborazo M, 2020.

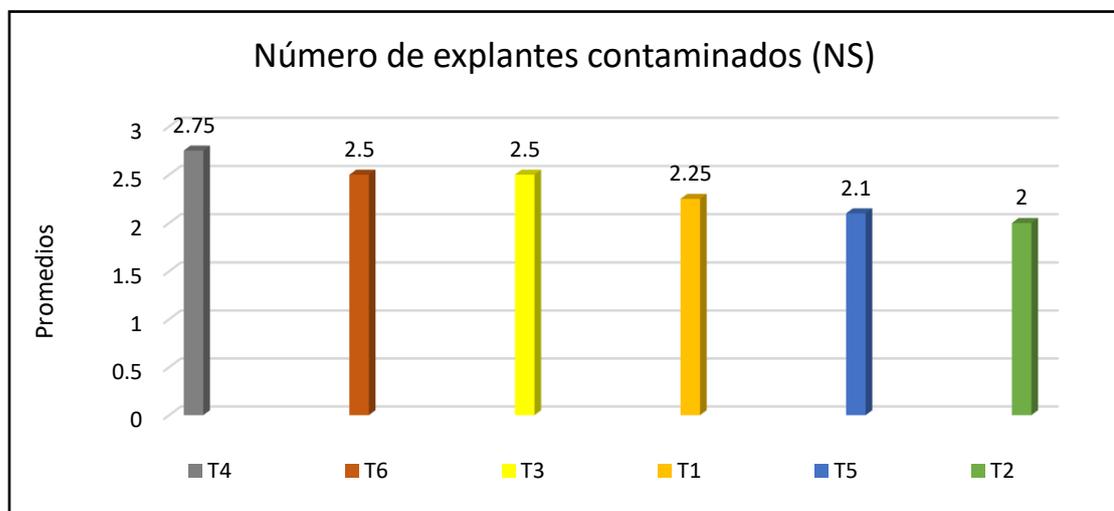


FIGURA N°1. Promedio de los tratamientos AxB de la variable número de explantes contaminados a los 15 días en el Cantón Guaranda, 2020.

En cuanto a la variable número de explantes contaminados (NEC) evaluado a los 15 días presento una media general de 2, 33 y un CV de 27, 48%. Donde el tratamiento que presento mayor contaminación fue el T4 2,75 (Bencil adenina 1mg) los frascos contaminados presentaron mortalidad a los 35 días de estar en estudio. El tratamiento

que obtuvo menor contaminación es el T2 con un promedio de 2 (Kinetina 3mg) siendo esta variable no significativa al 5% (Tabla N°1 y Figura N°1).

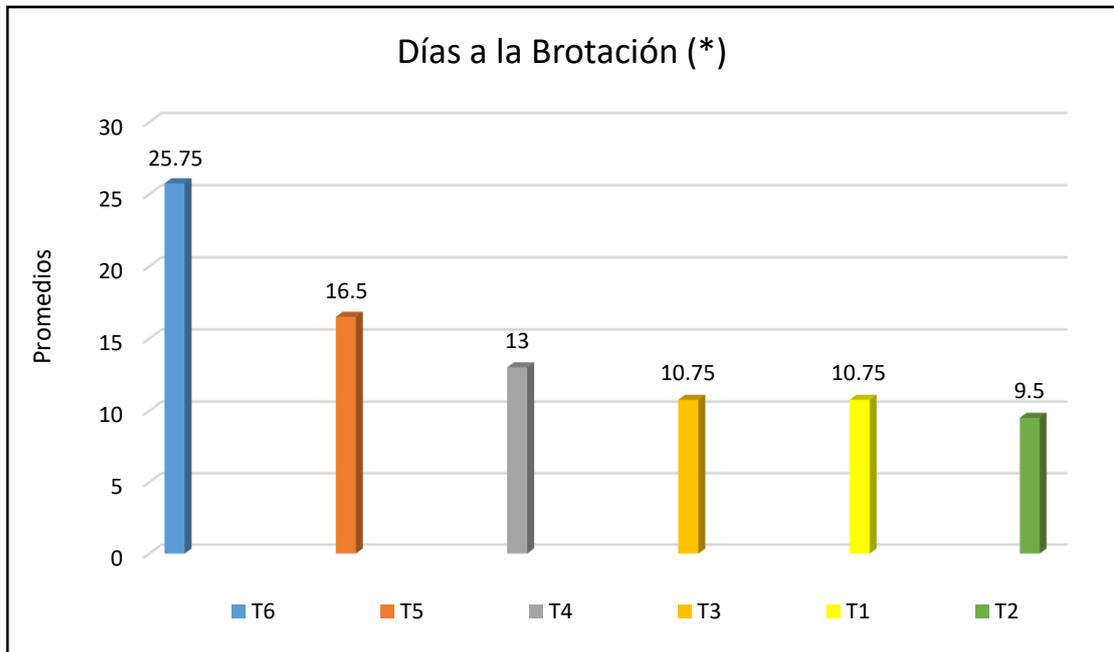


FIGURA N°2. Promedio de la interacción AxB de la variable días a la brotación (DB) en el Cantón Guaranda, 2020.

En cuanto a la variable días a la Brotación (DB) presento una media general de 14,37 y un CV de 20.50%. Donde el tratamiento que presento mayor tiempo para la brotación fue el T6 con un promedio de 25 días lo que indica que en el lapso de ese tiempo no existía mayor desarrollo de los explantes. El T2 obtuvo el menor promedio de 9 días para la brotación, existiendo una diferencia de 16 días entre estos dos tratamientos siendo esta variable significativa al 5% (Tabla N°1 y Figura N°2).

Factor A: Citoquininas

TABLA N°2. Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del factor A: Variables, NEC evaluados a los 15 días y DB.

NEC a los 15 días			DB		
FactorA: Citoquininas	Promedios	Rango	FactorA: Citoquininas	Promedios	Rango
A1: Kinetina	2.25	A	A1: Kinetina	10.33	B
A2: Bencyl adenina	2.41	A	A2: Bencyl adenina	19.86	A
Efecto principal: A2-A1= 0.16			Efecto principal: A2-A1= 9.53		

Letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Chimborazo M, 2020.

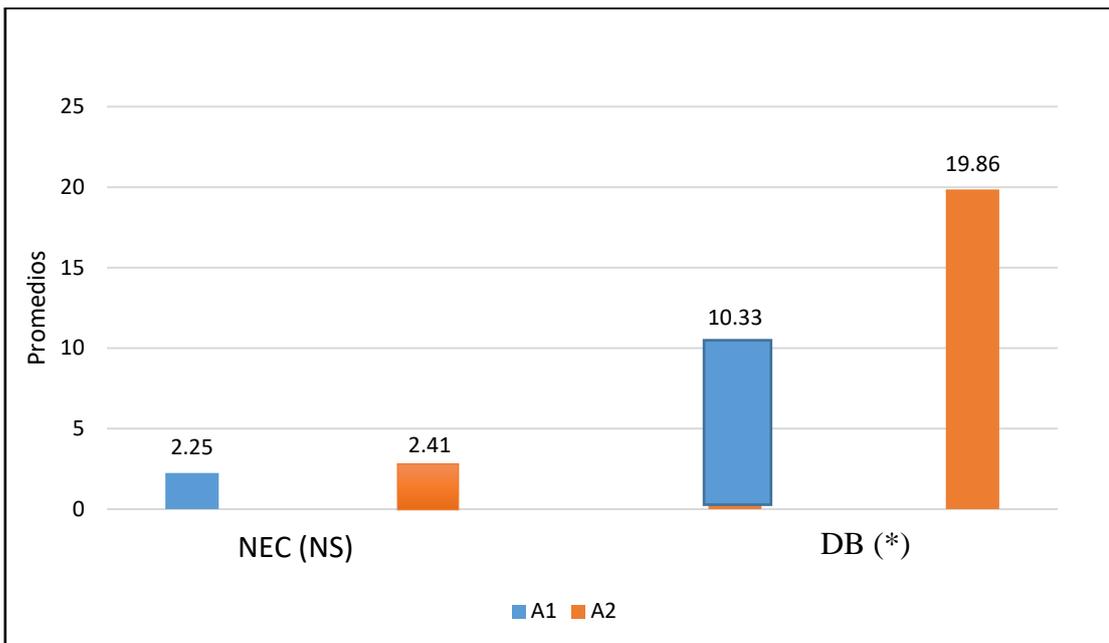


FIGURA N°3. Tipo de reguladores de crecimiento en las variables Número de ex plantas contaminados y días a la brotación.

Con el análisis del efecto principal factor A, en los reguladores de crecimiento Kinetina (A1) y Bencyl adenina (A2), para las variables Número de explantes contaminados evaluada a los 15 días sobresale la hormona Bencyl adenina (A2) con un porcentaje de 2.41% y con un valor inferior la Kinetina con 2.25% respectivamente, siendo estos no significativos (NS) (Tabla N° 2 y Figura N° 3).

Los explantes contaminados van a depender siempre de los cuidados sanitarios a los que estarán expuestos, es importante recalcar que también depende de la variedad de la planta madre de la cual fue extraída.

Para la variable Días a la Brotación la hormona A2 fue la que presento el mayor número de días para la brotación con un total de 19 días, a diferencia de la hormona A1 que presento un promedio de 10 días para la brotación, dando como resultado un total de 9 días de diferencia, debido a que la Kinetina es más activa y la Bencil adenina tiene un efecto más tardío en el movimiento de nutrientes, siendo esto estadísticamente significativo (Tabla N°2 y Figura N°3).

Factor B: Dosis

TABLA N°3. Resultados de a prueba de Tukey al 5% para comparar promedios de tratamientos FB de las variables Número de explantes contaminados (NEC) y días a la brotación (DB).

NEC a los 15 días (NS)			DB (*)		
Factor B: Dosis	Promedio	Rango	Factor B: Dosis	Promedio	Rango
B1= 1mg	2.5	A	B1= 1mg	14.04	B
B2= 3mg	2.0	A	B2= 3mg	13	B
B3= 5mg	2.5	A	B3= 5mg	18.25	A

Letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Chimborazo M, 2020.

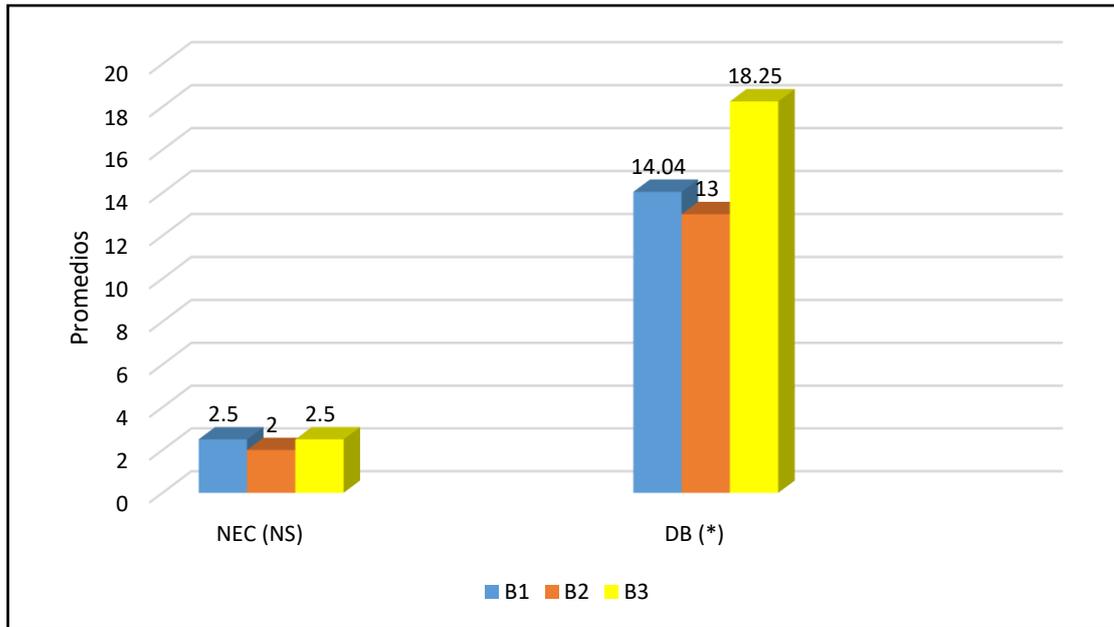


FIGURA N°4. Promedio de las variables Número de explantes contaminados (NEC) a los 15 días y Días a la Brotación (DB) en el Cantón Guaranda, 2020.

En cuanto a la variable número de explantes contaminados (NEC) evaluada a los 15 días se encontró los valores más altos de contaminación en el nivel B1 y B3 con un promedio de 2,5% a diferencia del nivel B2 la misma que presentó el promedio más bajo con 2% de contaminación siendo estas no significativas (Tabla N°3 y Figura N°4).

En la variable días a la brotación se encontró los promedios más altos en el nivel B3, con una dosis de 5mg teniendo un resultado de 18 días para la brotación a diferencia del nivel B2 la misma que presentó un promedio de 13 días para la brotación con una dosis de 3mg, siendo esta variable significativa al 5% (Tabla N°3 y Figura N°4). Las variables número de explantes contaminados y días a la brotación dependieron del medio de cultivo en el cual se desarrollaron, debido a su alto número de nutrientes y los cuidados para evitar todo tipo de contaminación.

TABLA N°4. Resultados de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables Número de brotes por explante (NBE), Longitud de brote (LB), Número de hojas de explante (NHE), a los 30, 60 y 90 días.

NBE							LB						NHB					
30 Días (**)			60 Días (NS)		90 Días (NS)		30 Días (NS)		60 Días (*)		90 Días (**)		30 Días (NS)		60 Días (*)		90 Días (*)	
Trat	Prom	Rag	Prom	Rag	Prom	Rag	Prom	Rag	Prom	Rag	Prom	Rag	Prom	Rag	Prom	Rag	Prom	Rag
T1	2	A	2.25	A	3.50	A	9	A	10	A	11.50	AB	2.50	B	5	BC	10	A
T2	2	A	2.75	A	4	A	10.25	A	11.75	A	13.50	A	3.75	A	7	A	11.75	A
T3	1.25	B	2	A	3.50	A	9.25	A	10	A	12.25	AB	2.25	B	5	BC	11.50	A
T4	1.75	AB	2	A	3.75	A	8.75	A	9.75	A	13	AB	2.50	B	6	AB	9.50	A
T5	1.5	AB	2.50	A	3.50	A	9.2	A	9.75	A	11	B	2.50	B	5.75	ABC	9.75	A
T6	2	A	2.25	A	3.25	A	9.25	A	11.25	A	11.50	AB	3	AB	4.25	C	9.79	A
CV= 21.30%			CV=18.54%		CV=13.95%		CV=15.91%		CV=10.85%		CV=10.24%		CV=24.99%		CV=16.87%		CV=14.22%	

Letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Chimborazo M, 2020.

Tratamientos (AxB)

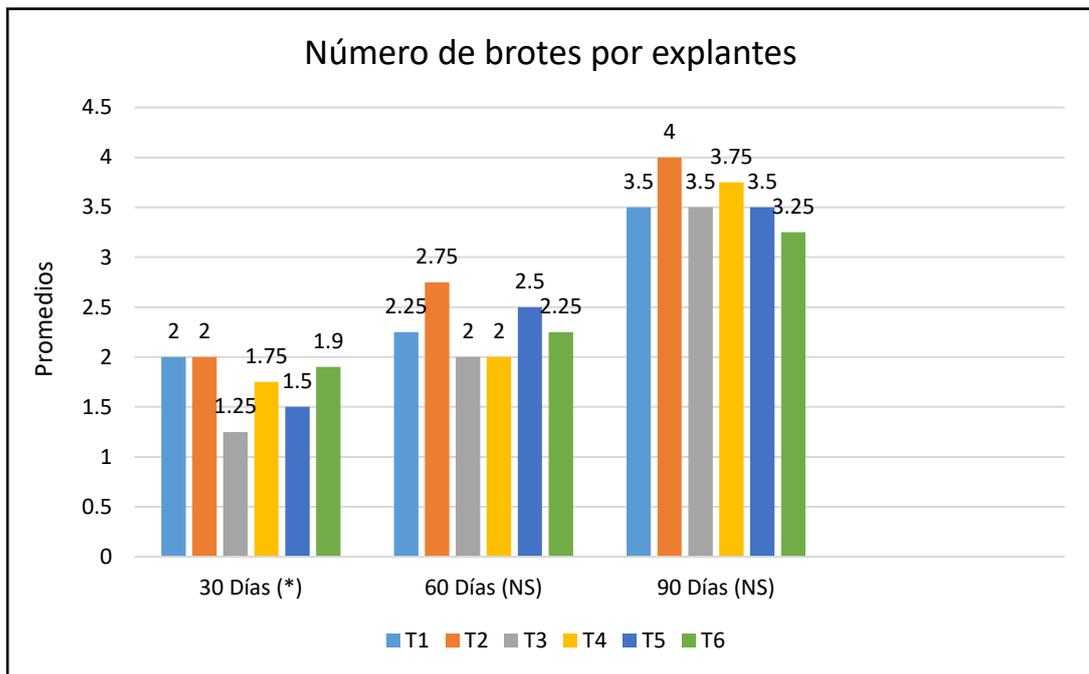


FIGURA N°5. Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en la variable Número de brotes explantes (NBE) en el Cantón Guaranda, 2020.

Con los datos de la prueba de Tukey al 5% para la variable Número de brotes por explantes (NBE) evaluado a los 30 días. El tratamiento que presentó un mayor promedio es T1 (Kinetina 1mg) y el T2 (Kinetina 3mg) con 2 brotes con un CV de 22.54%. a los 60 días el tratamiento que presentó un mayor promedio es T2 (Kinetina 3mg) con 3 brotes con un CV de 18.82% y a los 90 días el tratamiento que presentó un mayor promedio es T2 (Kinetina 3mg) con 4 brotes con un CV de 13.80%, siendo estos datos significativos al 5% a los 30 días en estudio. (Tabla N°4 y Figura N°5).

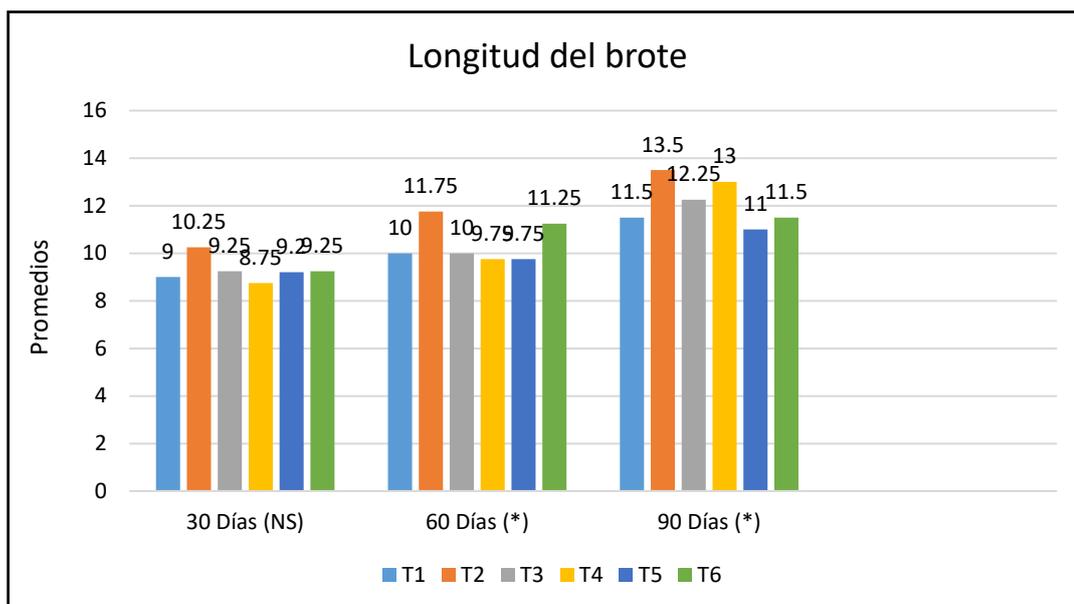


FIGURA N°6. Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en la variable Longitud del brote (LB) en el Cantón Guaranda, 2020.

Resultados de la prueba de Tukey al 5% para la variable Longitud de brotes (LB) en cuanto a los promedios obtenidos a los 30, 60 y 90 días registraron valores variados debido a su crecimiento, es importante indicar que a los 90 días los tratamientos que presentaron el mayor tamaño de brotes es el T2(Kinetina 3mg) con un total de 13,5mm de longitud y el tratamiento T5 (Bencyl adenina 3mg) es el que presento el menor promedio con un total de 11mm de longitud, obteniendo así una media general de 12,13mm y un CV de 11.06% siendo esta variable significativo al 5% (Tabla N°4 y Figura N°6).

La longitud del brote es una variable que dependió de la calidad del medio de cultivo en el que se desarrolló y de todos los cuidados sanitarios que se realizaron al momento de la preparación del medio a utilizar.

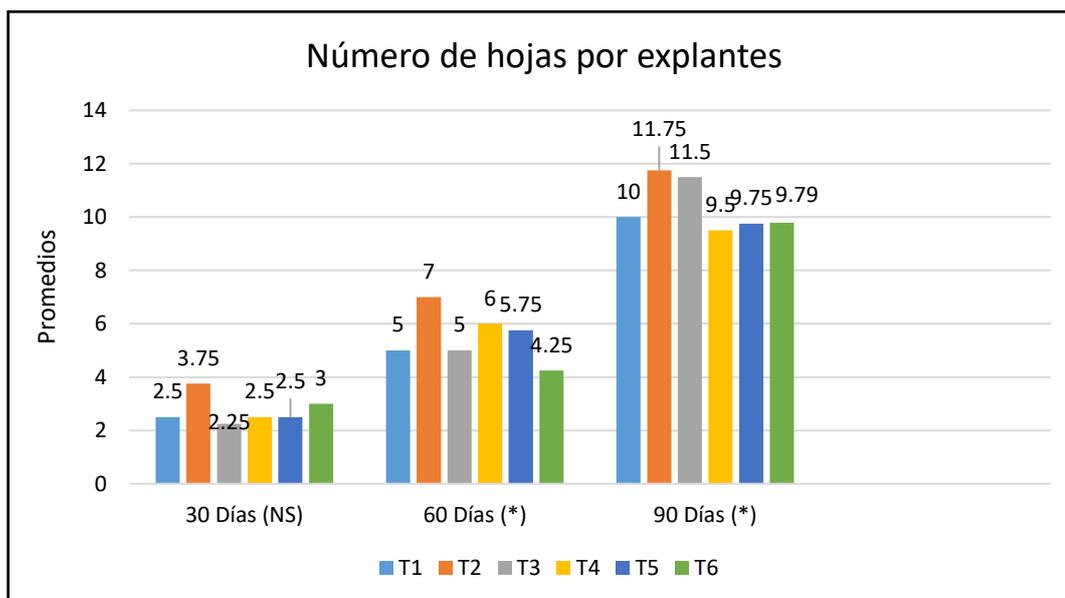


FIGURA N°7. Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de interacción (AxB) en las variables Número de hojas por explante (NHE) en el Cantón Guaranda, 2020.

Tukey al 5% para la variable Número de hojas del explante (NHE) en cuanto a los promedios obtenidos a los 30, 60 y 90 días se detectó diferencias significativas debido a su crecimiento, es importante indicar que a los 90 días los tratamientos que presentaron el mayor número de hojas es el T2-T3(Kinetina3-5mg) con un total de 11 hojas y el tratamiento T4-T5-T6 (Bencyl adenina 1-3-5mg) es el que presento el menor promedio con un total de 9 hojas, obteniendo así una media general de 10.38 y un CV de 14.22% que se considera muy bueno para este tipo de investigación, lo cual valida los resultados que se presentaron en esta variable (Tabla N°4 y Figura N°7).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación el número de hojas por explante dependió de la variable longitud del brote, ya que a mayor tamaño mayor números de hojas y su desarrollo se complementó con los nutrientes, proteínas que contiene el medio de cultivo utilizado.

TABLA N° 5. Análisis de efecto para comparar promedios de Factor A en las variables Número de brotes por explante (NBE) Longitud del brote (LB) y las variables Número de hojas por explantes (NHE), a los 30, 60 y 90 días.

NBE 90 Días (NS)			LB 90 Días (*)			NHE 90 Días (NS)		
Factor A:	Promedios	Rango	Factor A:	Promedios	Rango	Factor A:	Promedios	Rango
Citoquinas			Citoquininas			Citoquininas		
A1: Kinetina	3,67	A	A1: Kinetina	12,42	A	A1: Kinetina	11,08	A
A2: Bencyl adenina	3,50	A	A2: Bencyl adenina	11,83	A	A2: Bencyl adenina	9,75	B
Efecto principal: A2-A1= 0,01			Efecto principal: A2-A1= 0,59			Efecto Principal:A2-A1= 1,33		

Letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Chimborazo M, 2020.

Factor A: Citoquininas

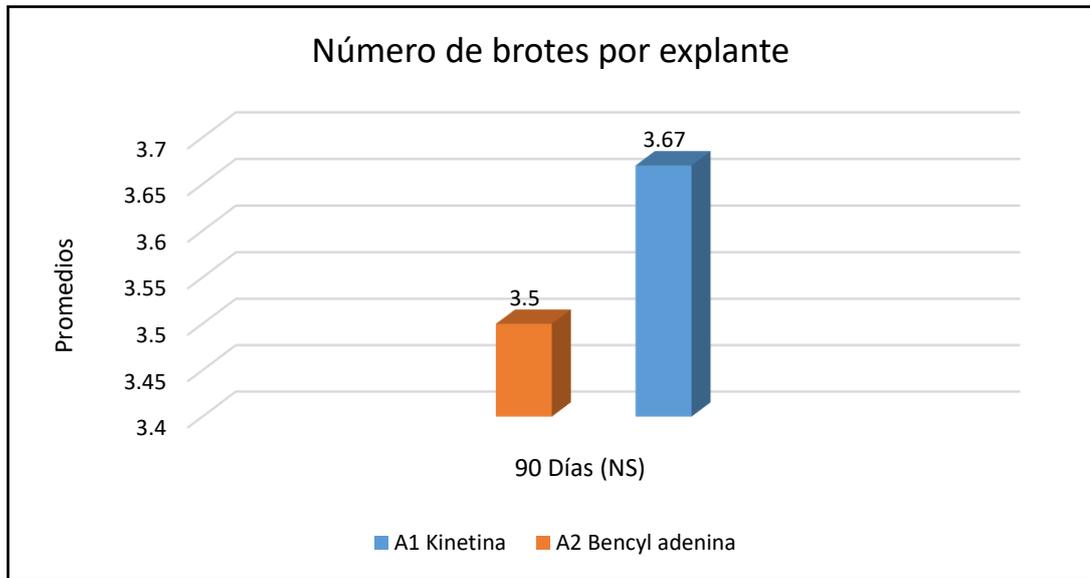


FIGURA N°8. Resultado de promedios del Factor A Citoquininas en la variable Número de brotes por explante (NBE) 90 días, en el Cantón Guaranda 2020.

Con el análisis del efecto principal del factor A, se observa que en la variable Número de brotes por explante a los 90 días las dos hormonas son iguales con un promedio de 3 brotes por explante siendo esta variable no significativa (Tabla N° 5 y Figura N°8)

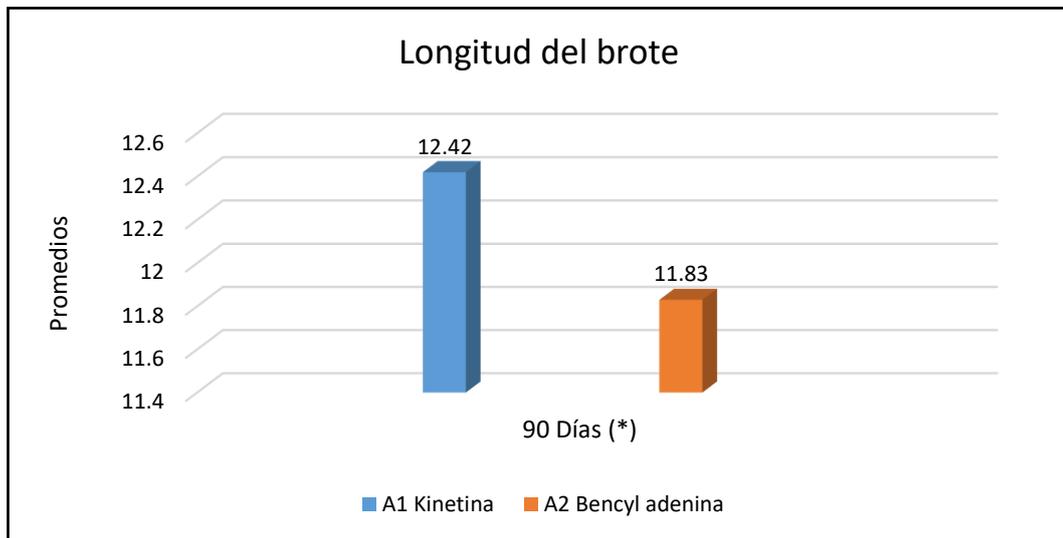


FIGURA N° 9. Resultados de promedios del factor A Citoquininas en la variable Longitud del brote (LB) a los 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.

Con el análisis del efecto principal del factor A, se observa que en la variable Longitud del brote (LB) a los 90, la hormona que presentó un mayor promedio es A1 Kinetina y un menor promedio A2 Bencil adenina, se registra una diferencia de 0,59 mm más en la longitud del brote siendo esta variable significativa al 5% (Tabla N°5 y Figura N°9).

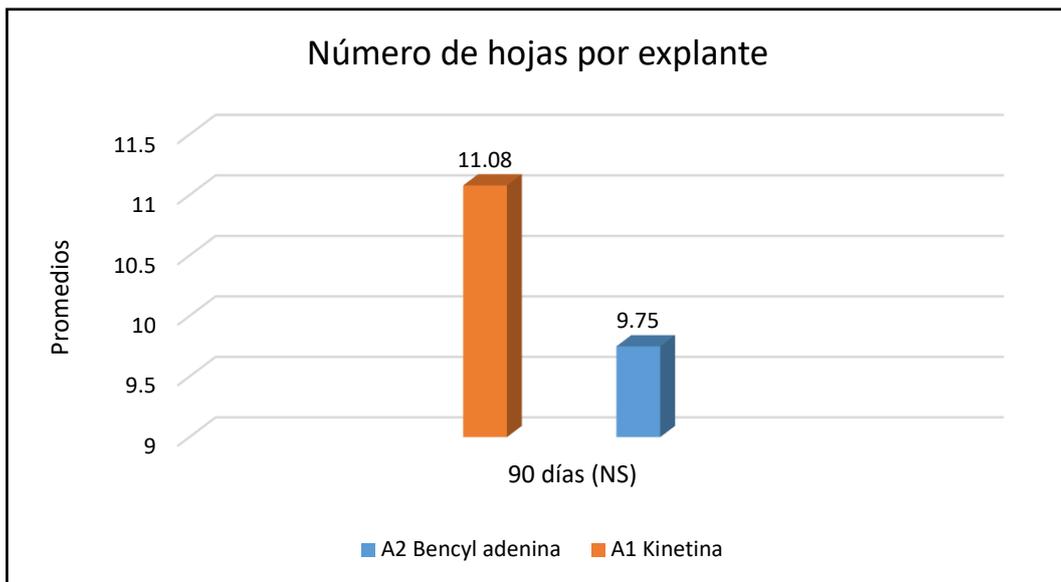


FIGURA N° 10. Resultado de promedios del Factor A Citoquininas en la variable Número de hojas del explante (NHE) a los 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.

En cuanto a la variable número de hojas del explante se encontró los valores más altos en el nivel A1 con un promedio de 11 hojas, a diferencia del nivel A2 la misma que presento el promedio más bajo de 9 hojas dándonos una diferencia de 2 hojas a los 90 días (Tabla N°5 y Figura N°10).

La respuesta en cuanto a las variables número de brotes por explante, longitud del brote, número de hojas del explante, son variables que dependen una de la otra ya que todas se forman y desarrollan por las hormonas que fueron utilizadas en esta investigación, el alto contenido de nutrientes y la dosificación establecida son las que complementan su desarrollo.

Cada uno de estas variables a nivel de laboratorio depende del desarrollo y condiciones en las que se formaron, el alto contenido de micro y macro nutrientes favorecen el desarrollo de cada uno de las variables en estudio, a mayor longitud del brote se obtuvo mayor número de hojas.

TABLA N°6. Resultados de la prueba de Tukey al 5% para evaluar promedios del Factor B: En las variables Número de brotes por explantes (NBE), Longitud del brote (LB) Número de hojas por explantes (NHE), a los 30, 60 y 90 días.

NBE				LB				NHE			
Factor:	30días	60días	90días	Factor:	30días	60días	90días	Factor:	30días	60días	90días
B Dosis	(*)	(NS)	(NS)	B Dosis	(NS)	(*)	(*)	B Dosis	(*)	(*)	(NS)
B1:	1.87 A	2.13A	3.63A	B1:	8.87 B	9.87 B	12.25 A	B1:	2.50 B	5.5 B	9.75 B
B2:	1.75 A	2.62A	3.75A	B2:	9.63A	10.75 A	12.25 A	B2:	3.13 A	6.38 A	10.75 A
B3:	1.62 A	2.12A	3.38A	B3:	4.63 C	9.25 B	11.37 B	B3:	2.63 B	4.63 C	10.74 A

Letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Chimborazo M, 2020.

Factor B: Dosis

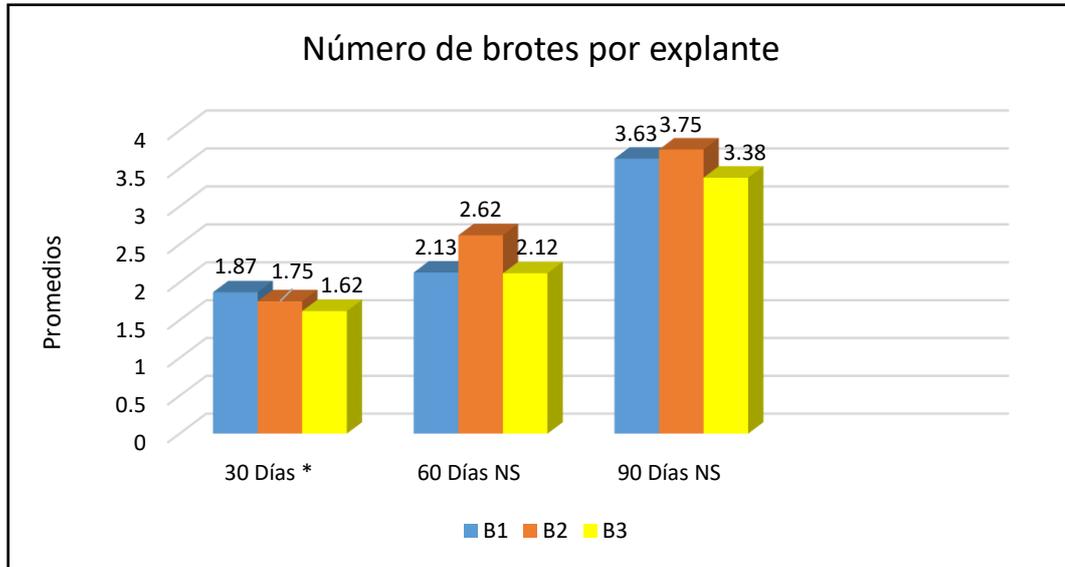


FIGURA N°11. Resultado de promedios del Factor B. Dosis en la variable Número de brotes del explante, a los 30,60 y 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.

La respuesta agronómica en cuanto a la dosis de las hormonas observada en la variable número de brotes por explante a los 30 días sobresale el nivel B1 (1mg) con un promedio de 1,87, a los 60 días sobresale el nivel B2 (3mg) con un promedio de 2,62 y a los 90 días el nivel B2 (3mg) con un promedio de 3,75, siendo estos los porcentajes más altos que influyeron en la dosificación para el desarrollo y formación de los brotes de los explantes en estudio (Tabla N°6 y Figura N°11).

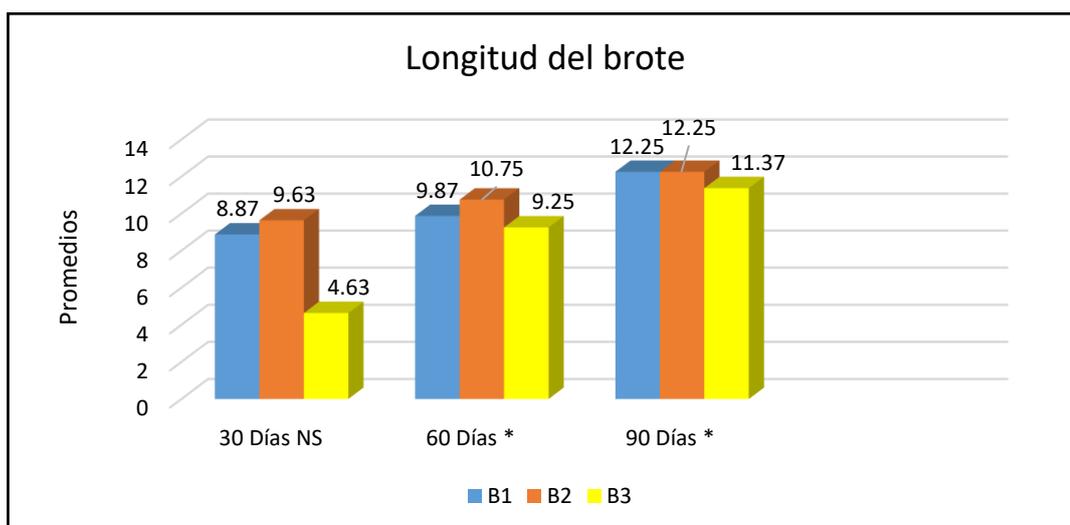


FIGURA N°12. Resultado de promedios del Factor B. Dosis en la variable Longitud del brote a los 30,60 y 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.

Con la prueba de Tukey al 5% se observa que en la variable longitud del brote a los 30 días sobresale el nivel B2 (3mg) con un promedio de 9,63 mm, a los 60 días sobresale el nivel B2 (3mg) con un promedio de 10,75mm y a los 90 días sobresale el nivel B1- B2 (1-3mg) con un promedio de 12,25mm, siendo estos los porcentajes más altos que influyeron en la dosificación para el desarrollo de los brotes por explantes en estudio (Tabla N°6 y Figura N°12).

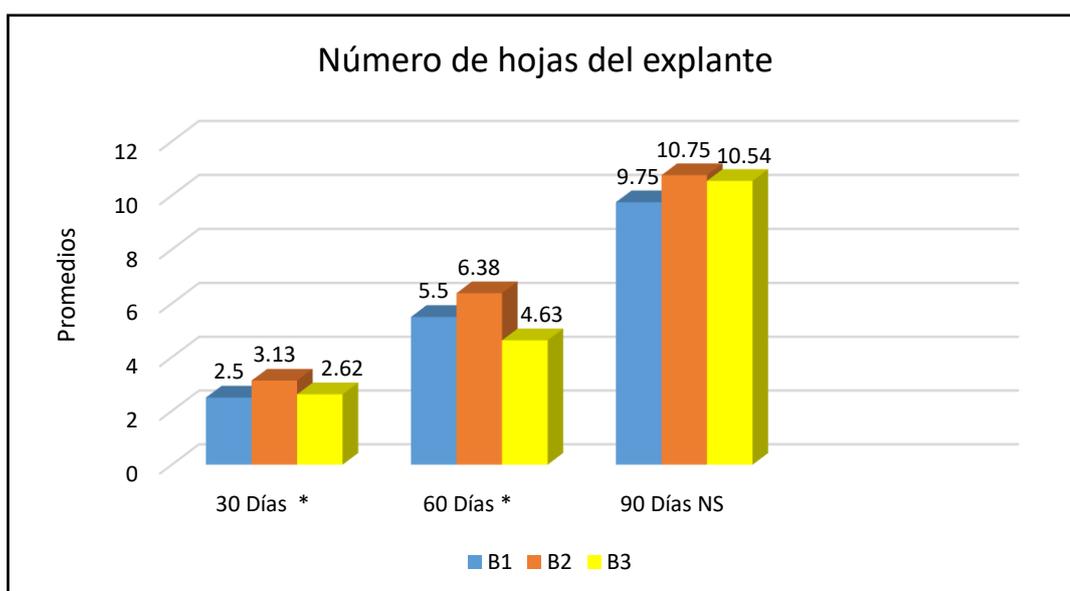


FIGURA N°13. Resultado de promedios del Factor B. Dosis en la variable número de hojas del explante a los 30,60 y 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.

Con la prueba de Tukey al 5% se observa que en la variable número de hojas por explante a los 30 días sobresale el nivel B2 (3mg) con un promedio de 3 hojas, a los 60 días sobresale el nivel B2 (3mg) con un promedio de 6 hojas y a los 90 días sobresalen los niveles B2- B3 (3-5mg) con un promedio de 11 hojas, siendo estos los porcentajes más altos que influyeron en la dosificación para el desarrollo de las hojas de los explantes en estudio (Tabla N°6 y Figura N°13).

La dosificación de hormonas que se estableció para cada variable ayudo al desarrollo y formación de cada uno de las variables en estudio. Dando como resultados los diferentes promedios de crecimientos a los 30, 60 y 90 días.

TABLA N°7. Resultado de la prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de la interacción (AxB) en las variables Días a la emisión de raíces (DER), Longitud de raíz (LR), Volumen de raíz (VR) los dos últimos evaluados a los 90 días.

DER (NS)			LR (**)mm			VR (**)		
Trat	Promedios	Rango	Tratamientos	Promedios	Rango	Tratamientos	Promedios	Rango
T5	27.50	A	T1	2.5	A	T1	0.65	A
T4	25	A	T2	2.23	A	T6	0.50	B
T3	25	A	T6	1.48	B	T4	0.45	BC
T2	25	A	T3	1.38	B	T2	0.45	BC
T6	24.5	A	T4	1.18	B	T3	0.37	C
T1	24	A	T5	0.35	C	T5	0.20	D
CV= 8.06%			CV= 16.88%			CV= 13.24%		

Letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Chimborazo M, 2020.

Tratamientos (AxB)

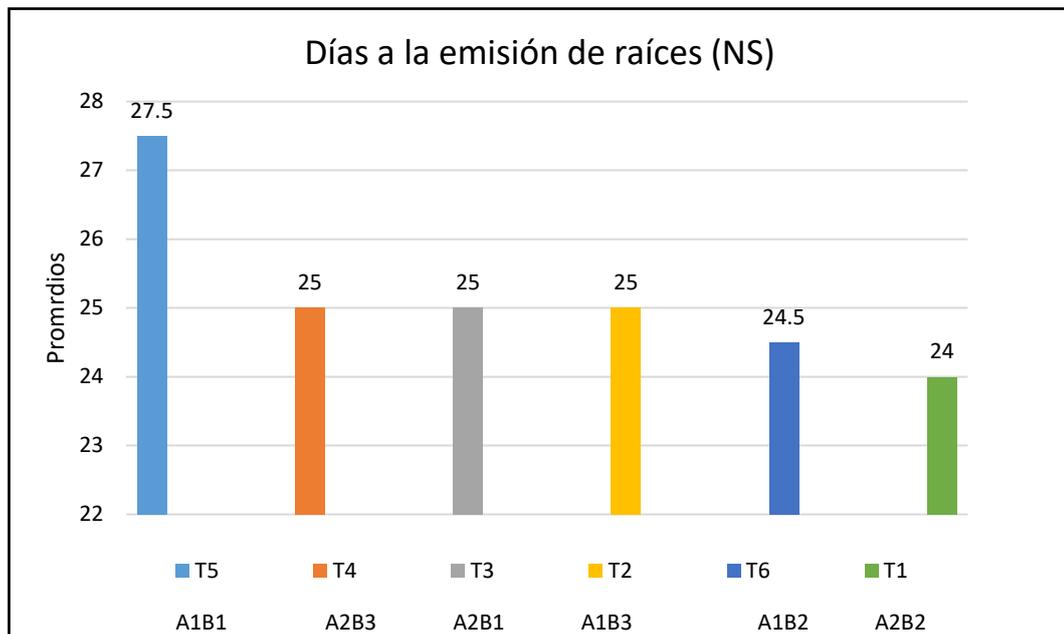


FIGURA N°14. Promedio de la interacción AxB en la variable Días a la emisión de raíces en el Cantón Guaranda, 2020.

En cuanto a la variable días a la emisión de raíces (DER) presentó una media general de 25 y un CV de 8,06%. Donde el tratamiento que presento mayor tiempo para la emisión de raíces fue el T5 con un promedio de 27 días, lo que indica que en el lapso de ese tiempo no existía mayor desarrollo de las raíces. El T1, T6 obtuvieron el menor promedio de 24 días para la emisión de raíces, existiendo una diferencia de 3 días entre estos tratamientos siendo esta variable no significativo al 5% (Tabla N°7 y Figura N°14).

La emisión de raíces depende de la variedad de la planta madre de donde se extrajo los explantes y de las condiciones físicas y del medio de cultivo para su desarrollo, es decir de los macro y micro nutrientes, los cuidados se asepsia y sanitarios.

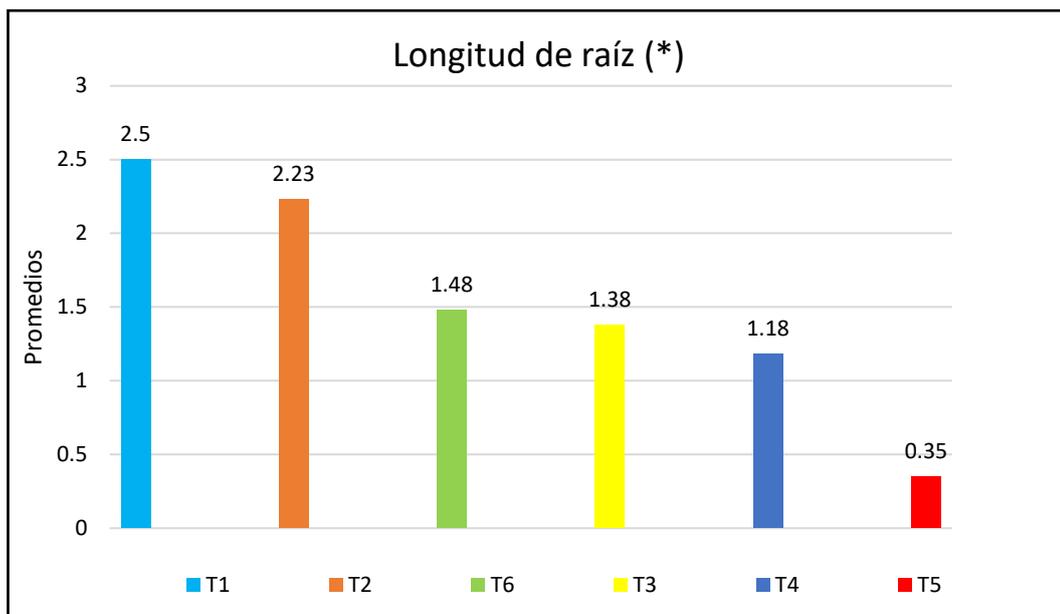


FIGURA N°15. Promedio de la variable Longitud de raíz (LR), evaluados a los 90 días en el Cantón Guaranda 2020.

En cuanto a la variable longitud de raíz (LR) evaluadas a los 90 días presentó una media general de 1,52mm y un CV de 16,88%, la cual indica que el tratamiento con mayor longitud de raíz fue el T1 (Kinetina 1mg) con 2.5mm, el tratamiento con menor crecimiento de raíz se presentó en el T5 (Bencyl adenina 3mg), con 0,35mm de longitud siendo estos datos significativos al 5% (Tabla N°7 y Figura N°15).

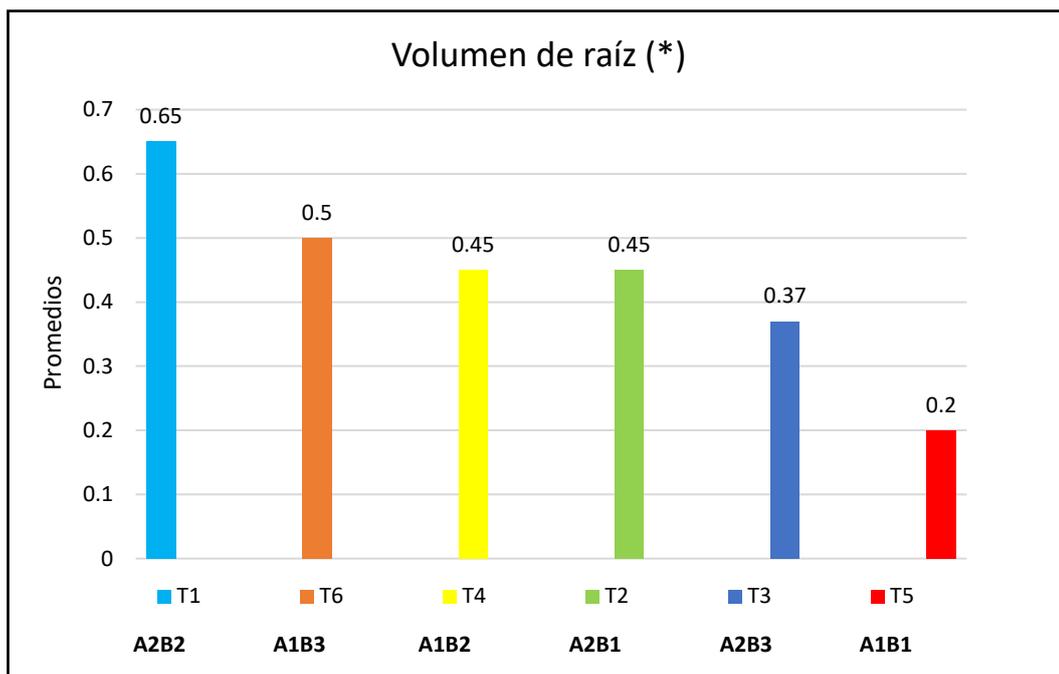


FIGURA N°16. Promedio de la variable volumen de raíz (VR) evaluados a los 90 días en el Cantón Guaranda 2020.

La respuesta de la interacción AxB para la variable volumen de raíz (VR) evaluados a los 90 días con una media general de 0,44cc y un CV de 13.29%, en donde el tratamiento que sobresale es el T1 (Kinetina 1mg) con 0,65cc de raíz y el menor promedio en el T5 (Bencyl adenina 3mg) con 0,2cc, por ende estos datos es significativo al 5% (Tabla N°7 y Figura N°16).

Se sabe que las variables LR y VR, son muy importantes para la absorción de nutrientes y sirve como sostén de las plantas ya que tiene una relación directa con el crecimiento y desarrollo de los órganos vegetales. El buen desarrollo del sistema radicular permite un mejor aprovechamiento del medio de cultivo.

Se puede decir que los tratamientos presentaron este volumen radicular en referencia a las variables (NBE), (LB) y (NHE) (Tabla N°1). Los resultados expuestos en los tratamientos en especial en las variables (LR) y (VR) dependieron de las Citoquininas y Dosis presentes en la investigación. Entrevista personal (Cortez, V, 2019).

TABLA N°8. Resultado del análisis del efecto principal para evaluar promedios del factor A: Variables, Días a la emisión de raíces (DER), Longitud de raíz (LR) y Volumen de raíz (VR) las dos últimas variables evaluadas a los 90 días.

DER		LR		VR	
Factor A: Citoquinas	Prom	Factor A: Citoquininas	Promedios	Factor A: Citoquininas	Prom
A1: Kinetina	25	A1: Kinetina	2.03	A1: Kinetina	0.49
A2: Bencyl adenina	26	A2: Bencyl adenina	1.00	A2: Bencyl adenina	0.38
Efecto P: A2-A1= 1.00		Efecto P: A2-A1= 1.03		Efecto P: A2-A1= 0.11	

Factor A: Cito quininas

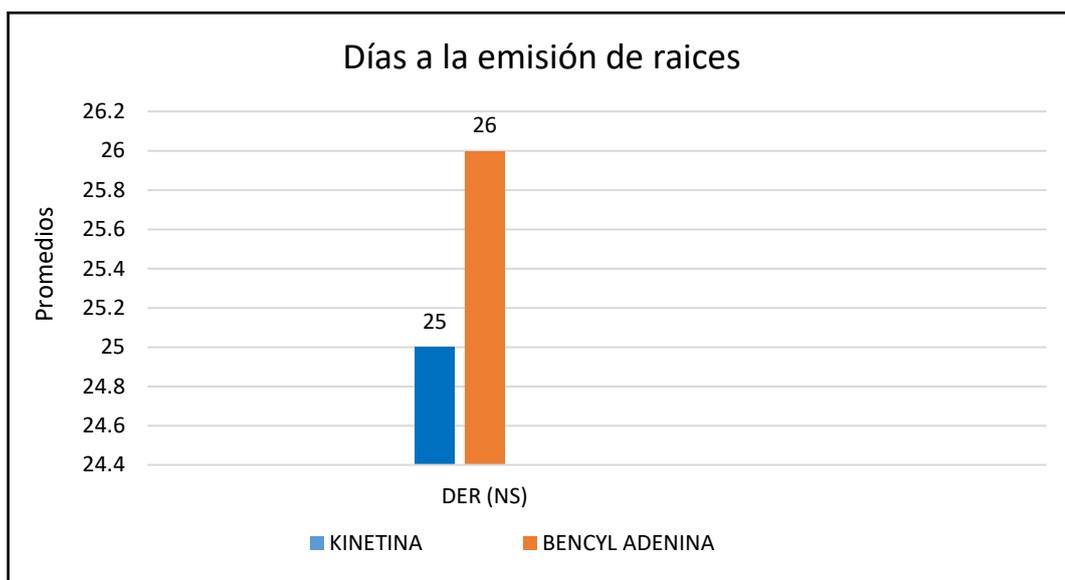


FIGURA N°17. Resultado de promedios del Factor A Cito quininas en la variable Días a la emisión de raíces, en el Cantón Guaranda, 2020.

Con el análisis del efecto principal factor A, en los reguladores de crecimiento para las variables días a la emisión de raíces, sobresale la hormona Bencyl adenina (A2) con un promedio de 26 días y con un valor inferior la Kinetina con promedio de 25 días existiendo una diferencia de un día respectivamente, este dato es no significativos al 5% (Tabla N° 8 y Figura N° 17).

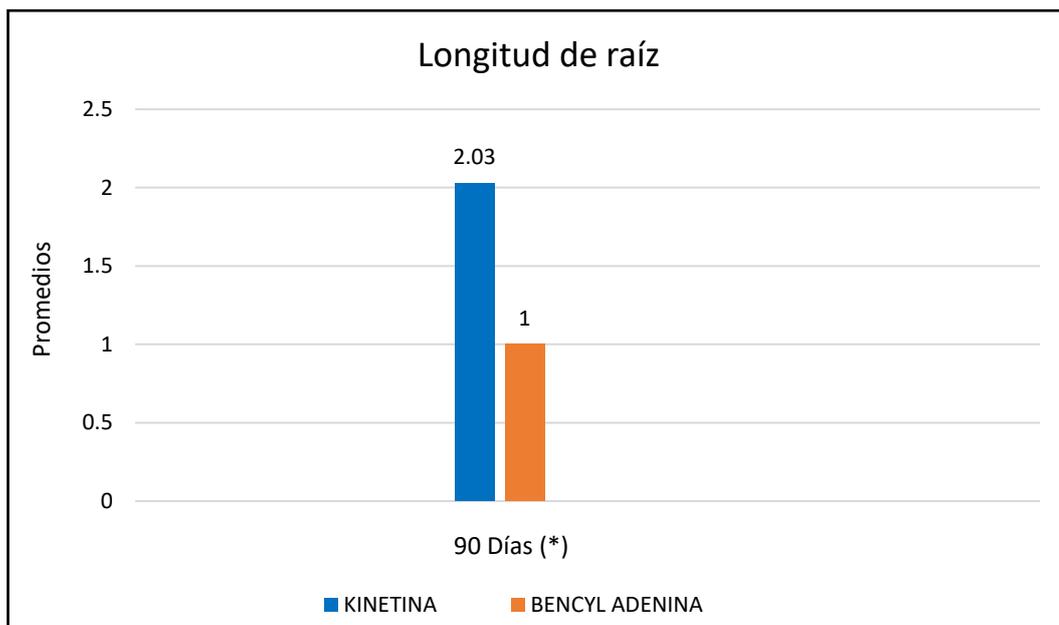


FIGURA N°18. Resultado de promedios del Factor A Cito quininas en la variable, longitud de raíz a los 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.

Tukey 5% para el factor A en la variable longitud de raíz (LR) tomada a los 90 días la hormona que sobresalió fue el nivel A1 (Kinetina) con un promedio de 2,03mm de longitud a diferencia del nivel A2 (Bencil adenina) con un promedio de 1,00mm dando esto una diferencia de 1.03mm entre las dos hormonas, estos datos son significativos al 5%. (Tabla N°8 y Figura N°18).

Para la formación de raíces, y en las variables antes mencionadas, el factor principal es el medio de cultivo en el cual se desarrolló el explante, ya que las raíces absorben los nutrientes y ayuda a la formación de todos los órganos vegetales.

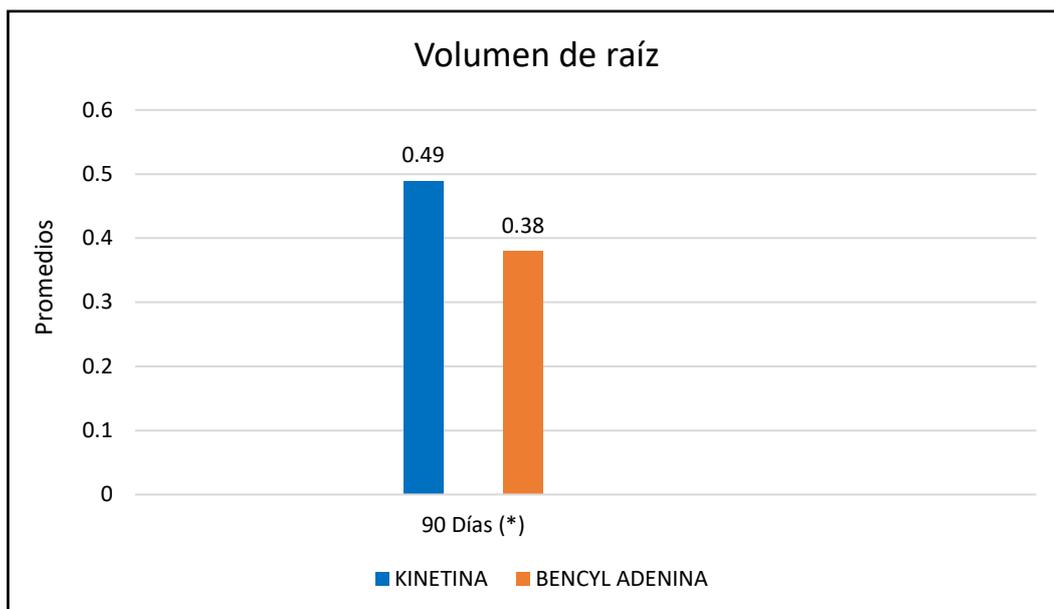


FIGURA N°19. Resultado de promedios del Factor A Cito quininas en la variable, Volumen radicular a los 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.

La variable volumen de raíz (VR) registrada a los 90 días es significativo al 5%, siendo el nivel A1 Kinetina la que presentó el mayor volumen de raíces con un promedio de 0,49cc a diferencia del nivel A2 Benyl adenina con un promedio de 0,38cc con un efecto principal de 0,11cc (Tabla N° 8 y Figura N°19).

Las raíces son responsables de la absorción de los macro y micro nutrientes para obtener un mejor desarrollo de los explantes en estudio.

Los componentes LR y VR, son atributos varietales los cuales dependen de los factores físicos, químicos y biológicos del medio de cultivo donde se desarrollan.

TABLA N°9. Prueba de Tukey al 5%, para comparar promedios de Factor B dosis en las variables Días a la emisión de raíces (DER), Longitud de raíz (LR) y Volumen de raíz (VR) las dos últimas variables evaluadas a los 90 días.

DER (NS)			LR (*)			VR (*)		
Factor B: Dosis	Promedio	Rango	Factor B: Dosis	Promedio	Rango	Factor B: Dosis	Promedio	Rango
B1= 1mg	25.50	A	B1= 1mg	1.84	A	B1= 1mg	0.55	A
B2= 3mg	26.25	A	B2= 3mg	1.85	C	B2= 3mg	0.32	AB
B3= 5mg	24.75	A	B3= 5mg	0.86	B	B3= 5mg	0.43	AB

Letras iguales indican que las diferencias estadísticas no son significativas.

Fuente: Chimborazo M, 2020.

Factor B: Dosis

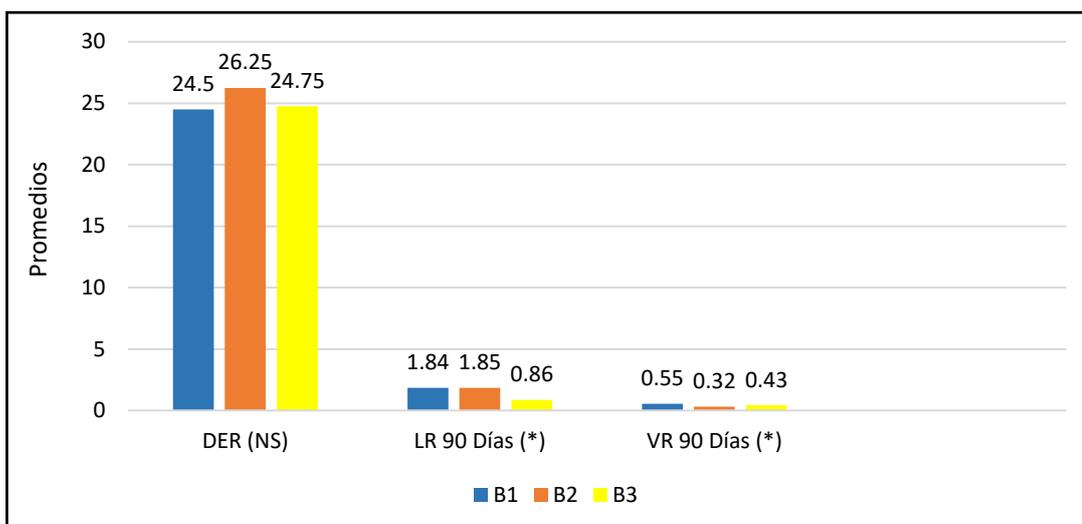


FIGURA N°20. Promedio de las variables Días a la emisión de raíces (DER), Longitud de raíz (LR) y Volumen de raíz (VR) tomados a los 90 días, en el Cantón Guaranda, 2020.

Los resultados de la prueba de Tukey al 5% para la variable días a la emisión de raíces, el nivel B1 (1mg) fue la que presentó un menor promedio de 24 días para la emisión de raíces.

Se observa que los valores nutricionales del medio de cultivo y los cuidados sanitarios presentes en el crecimiento de los explantes ayudo a la formación y emisión de raíces para cada dosis de hormonas.

El resultado de la variable longitud de raíces evaluadas a los 90 días el nivel B2 (3 mg), fue la que presentó un mayor promedio con 1,85mm de longitud y para la variable volumen de raíz el mayor promedio se observó en el nivel B1 (1mg) con 0,55cc (Tabla N° 9 y Figura N°20).

Esto es debido a que se encuentran en proceso de desarrollo y formación de las plántulas, es importante recalcar que los resultados obtenidos se deben a todos los cuidados asépticos para evitar la contaminación. La longitud de raíz y formación de las raíces son responsables del volumen y espesor de las mismas y por ende sirve de ayuda para el sostén de los explantes en el frasco.

Análisis de correlación y regresión lineal

TABLA N° 10. Resultados del análisis de correlación y regresión lineal de la variable independiente (Xs) la misma que obtuvo una relación estadística significativa con la variable de pendiente Y.

Variables independientes componentes del NBE (Xs)	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de regresión (b)	Coefficiente de determinación (R ² %)
Número de hojas por explantes.	0,723 (**)	2,23 (**)	52

Coefficiente de correlación (r)

En esta investigación se calculó correlaciones altamente significativas y positiva entre la variable Número de brotes por ex plantes versus la variable Número de hojas por ex plante.

Coefficiente de regresión (b)

En la investigación las variables que contribuyo el incremento de número de hojas por explante fue la variable número de brotes por explante. Es decir que, por cada brote se va a tener un incremento de 2 hojas por explante.

Coefficiente de determinación (R²)

En esta investigación el mayor incremento para la variable número de hojas por explante o mejor ajuste, se obtuvo en la variable número de brotes por explante con un incremento del 52%.

VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

De acuerdo a los resultados y discusiones obtenidos en esta investigación rechazo la hipótesis nula y acepto la hipótesis alterna ya que la mayoría de las variables fueron diferentes al 5% y 1%.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. CONCLUSIONES

Con los análisis e interpretaciones de los resultados obtenidos en esta investigación se llegan a las siguientes conclusiones.

1. La propagación del arrayán *Myrcianthes hallii* (*O. Berg*) *Mc Vaugh.* a través de la multiplicación in vitro es viable y segura.
2. El medio de cultivo empleado, M&S y como reguladores de crecimiento se utilizó la Kinetina y Bencil Adenina (1, 3 y 5ml/L), dio excelentes resultados en la formación de los explantes de arrayán.
3. En cuanto al factor A Citoquininas en factor A1 (Kinetina) presentó los mejores resultados en la formación de los explantes en cada una de las variables evaluadas.
4. Para el factor B dosis de hormonas la que sobresale es 3mg con la cual se obtuvo mayor número de plantas de arrayán.
5. El tratamiento que presentó mayor porcentaje de contaminación fue el T4 (Bencil adenina con 1mg).
6. En la interacción de factores AxB los mejores resultados en explantes de arrayán se obtuvo en A1B2 (A= Kinetina + B= 3mg) para todas las variables evaluadas.
7. En esta investigación se calculó correlaciones altamente significativas y positiva entre la variable número de brotes por ex plantes versus la variable número de hojas por ex plante, es decir que estas variables resultaron ser los componentes más importantes para lograr mayor estrechez con el rendimiento.
8. Trabajar en la formación de medios de multiplicación para obtener plántulas de buena calidad, libres de contaminación y aportar a la reforestación con especies nativas del medio con el fin de mejorar la flora ecuatoriana.

7.2. RECOMENDACIONES

En base a las diferentes conclusiones sintetizadas en esta investigación se hacen las siguientes recomendaciones.

1. En las futuras investigaciones se recomienda seleccionar la planta madre que tenga las mejores características agronómicas, y preferible que sean provenientes de un vivero.
2. Para la multiplicación del arrayán se recomienda utilizar los brotes de 2.5 a 3cm de longitud, para el mejor desarrollo y formación de la nueva planta in vitro.
3. No utilizar brotes muy jóvenes debido a que presentan una alta tasa de mortalidad.
4. Se recomienda la utilización de la hormona Kinetina (3mg), ya que dio excelentes resultados en la formación de los ex plantas de arrayán.
5. Continuar con la investigación sobre multiplicación in vitro de otras especies forestales nativas, para ayudar a la conservación del medio ambiente a través de la reforestación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barragán , M. Remache, K. (1998). Inventario Botánico Forestal de Especies Herbáceas Nativas de Sector Santiago pamba. Parroquia San Pablo. Cantón San Miguel: Universidad Estatal de Bolívar.
2. Borja, F. (1992). Investigación y propagación de especies nativas en los andes. Quito: Centro Andino de Acción Popular.
3. BSF. (20 de 11 de 2019). Plants. Obtenido de BayScience Foundation: <http://zipcodezoo.com/Plants/>
4. Cerón, C. (1993). Plantas medicinales de los Andes Ecuatorianos. Quito: Botánica.
5. CESA, C. (1993). Especies Forestales Nativas de los Andes Ecuatorianos. Quito: EC. CESA.
6. CITES. (1994). Proposal to include in Appendix II Neotropical populations of *Myrcianthes Hallii*. Nimth Meeting of the conference of the parties. Florida: Fort Lauderdale.
7. Cleand, E. (18 de 04 de 2019). Universitat Jaume I. Obtenido de Fisiología Vegetal (Vol.10): <http://usvarios.Netgate.com.uy/emonteiro/moral.htm>
8. De la semántica a la agronomía. (20 de 04 de 2019). Obtenido de REGULADORES DE CRECIMIENTO Y BIOESTIMULANTES:[http:// www.redagricola.com/cl/reguladores-de-crecimiento-y-bioestimulantes/](http://www.redagricola.com/cl/reguladores-de-crecimiento-y-bioestimulantes/)
9. De La Torre, L. Navarrete, P. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Quito: Universidad Católica del Ecuador.
- 10 EcuRed. (23 de 04 de 2019). Obtenido de EcuRed: https://www.ecured.cu/Micropropagaci%C3%B3n_de_plantas
11. Enrique, C. (2015). Microprotogación de Arundo donax a partir de yemas axilares y meristemas apicales. Zamorano, Honduras: Zamorano departamento de ciencias y producción agropecuaria.

12. Fundación botánica de los Andes . (19 de 04 de 2019). Bio comercio andino. Obtenido de Arrayán de Quito: <http://plantasnativas.visitavirtualjbq.com/index.php/emblematicas/6-myrcianthes-hallii>
13. Gaibor, M. (2000). Álbum de clasificación de las Angiospermas. Guaranda: Universidad Estatal de Bolívar.
14. Gobierno de la Provincia de Pichincha, G. (20 de enero de 2019). Pichincha verde. Obtenido de Quito, EC: <http://www.pichincha.gob.ec>.
15. Gonzales, C. Vilca , J. (2016). Micropropagación Vegetal In Vitro. Cajamarca-Perú: Edición Gráfica de ADEFOR.
16. González, S. (19 de 04 de 2019). Métodos de Propagación in vitro en plantas. Obtenido de Biotecnología vegetal: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/biotecnologia%20vegetal.pdf>.
17. Govaerts, R. (06 de Febrero de 2010). Catalogo de vida. Obtenido de Lista de verificacion anual: Disponible en www.catalogueoflife.org
18. Grogan, J. Verrissimo, P. (2002). Mahogany in the brazilian amazon: Ecology and perspectives on management. Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazonía.
19. Hartmann, H. Kester, D. (1997). Propagación de plantas. México: MX Continental.
20. Höxtermann. (26 de 10 de 2019). Cultivo In Vitro de células y tejidos vVegetales. Obtenido de Intagri S.C.: https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal?fbclid=IwAR_1VIJPYQ33B37A1zeHXu7DsmTb6N9OvZANQwBYKEL90pk4wjn0moi_0
21. Iañez, E. (18 de 04 de 2019). Hipertextos del área de la biología. Obtenido de Cursos de microbiología general: http://www.biología.edu.ar/microgeneral/microíanez/16_micro.htm
22. Jaramillo, K. (2013). Evaluación de métodos de cultivo para la micropropagación de Arryán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh. Quito: Universidad Central del Ecuador.

23. Lojan , L. (1992). El Verdor de los Andes. Árboles y Arbustos Nativos para el Desarrollo Forestal Alto Andino. Quito: s.e.
24. López , L. (2016). Microbiología General. Quito: Universidad del norte.
25. Monar, M. (2000). Proyecto de Cantonización de San Pablo de Atenas. Guaranda: Tesis Ing. Agrónomo. Bolívar, EC. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
26. Mora, F. (2005). Diagnóstico del rodal del Arrayán (*Eugenia myrteloides*) en la comunidad la Quinta. Guaranda: Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, Escuela de Ingeniería Agronómica.
27. Mroginski, L. (20 de 04 de 2019). La Plata. Obtenido de Establecimiento de cultivo de tegidos vegetales: www.argenbio.org/adc/uploads/Libro_INTA_II/Parte_I.pdf.
28. Olmos , S. (21 de 04 de 2019). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Obtenido de La Plata, AR: www.argenbio.org/adc/uploads/Libro_INTA_II/Parte_IV.pdf.
29. Palacios , W. (2011). Familias y géneros arbóreos del Ecuador. Quito: Ministerio del Ambiente del Ecuador.
30. Patiet, C. Humberto, L. (2018). Uso de una fitohormona y tres tipos de sustratos en el enraizamiento de estacas de mora de castilla. Quevedo: UTEQ.
31. Patiño, M. (18 de 04 de 2019). Tesis Ing. Forestal de Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Obtenido de Evaluación de Métodos de Desinfección y medios de cultivo para la multiplicación in vitro de guarango: dspace.esPOCH.edu.ec/.../33T0095%20PATIÑO%20MERCEDDES.pdf
32. Perea, D. (2015). Biotecnología agrícola mediante la utilización de los sistemas in vitro. Bogotá: Agricultura de las Américas.
33. Pierik, R. (2017). Cultivos in vitro de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa.

34. Plantas producidas in vitro . (20 de 04 de 2019). Obtenido de Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA): <http://centa.gob.sv/upload/laboratorios/biotecnologia/2018/CULTIVO%20IN%20VITRO.pdf>
35. Racines, M. (2012). Estudio de costos y rentabilidad de cuatro frutales andinos (aguacate, mora, durazno y tomate de árbol). INIAP.
36. Ramirez, C. & Romero, M. (1980). Estudios de germinación en semillas de mirtáceas chilenas. Concepción, CL. CDO. .
37. Reguladores de crecimiento y bioestimulantes . (20 de 04 de 2019). Obtenido de De la semántica a la agronomía: <http://www.redagricola.com/cl/reguladores-de-crecimiento-y-bioestimulantes/>
38. Reynel, C. (20 de 04 de 2019). Programa Regional para la Gestion Social de los Ecosistemas Forestales Andinos. Obtenido de Árboles de los Ecosistemas Forestales Andinos: <http://www.infoandina.org/sites/default/files/recursos/Arboles%20de%20los%20ecosistemas%20forestales%20andinos.pdf>
39. Rodriguez , M. Torres, M. (2018). Alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales. Universidad Complutense.
40. Santana C. Abimael. (15 de 11 de 2019). Auxinas. Obtenido de Reguladores de crecimiento: http://www.canna.es/reguladores_del_crecimiento_vegetal
41. Santana, A. (2016). Areas del laboratorio de cultivos de tejidos. Altamirano: Intituto Tecnológico de CD. Altamirano.
42. Sergrein, M. (2017). Los Cultivos Celulares y sus Aplicaciones II. Panamá: Argenbio.
43. Suarez, S. (2016). Medios de cultivo . La Habana: Departamento de Biología Vegetal.
44. Terraecuador. (22 de Enero de 2019). Una mirada diferentes del Ecuador. Obtenido de Quito, EC: http://www.terraecuador.net/revista_65/especies_quitenas.html.

45. Thorpe, J. (2017). Introducción al cultivo de tejidos y Biotecnología Vegetal. Caracas- Venezuela: Corporación Andina de Fomento.
46. Ulloa, C. (08 de marzo de 2019). Aromas y sabores andinos (en línea). Obtenido de La Paz, BO.: <http://www.mobot.org/mobot/research/curators/pdf/Aromas.pdf>

Anexos

Anexo 1. Mapa de ubicación del ensayo



Anexo 2. Base de datos de las variables del proyecto

						30 DÍAS	60 DÍAS	90 DÍAS	30 DÍAS	60 DÍAS	90 DÍAS	30 DÍAS	60 DÍAS	90 DÍAS		90 DÍAS	90 DÍAS
Trat	Obs	FA	FB	NEC	DB	NBE	NBE	NBE	NHB	NHB	NHB	LB	LB	LB	DER	LR	VR
T1	1	1	1	2	13	2	2	3	3	5	8	10	10	12	25	2.3	0.65
T1	2	1	2	2	12	2	2	4	2	4	9	9	10	11	20	2.2	0.65
T1	3	1	3	2	9	2	3	4	2	5	12	8	9	10	24	3.1	0.65
T1	4	2	1	3	9	2	2	3	3	6	11	9	11	13	27	2.4	0.65
T2	1	2	2	2	9	2	3	4	4	7	12	12	13	15	25	1.9	0.43
T2	2	2	3	2	8	2	3	4	4	6	13	10	11	14	21	2.0	0.45
T2	3	1	1	2	12	2	2	4	3	7	10	9	11	12	26	2.7	0.46
T2	4	1	2	2	9	2	3	4	4	8	12	10	12	13	28	2.3	0.46
T3	1	1	3	3	12	1	2	4	2	4	13	9	9	10	27	1.5	0.36
T3	2	2	1	3	9	1	2	4	2	6	11	8	9	13	24	1.2	0.37
T3	3	2	2	2	9	2	2	3	2	5	12	11	12	14	23	1.3	0.38
T3	4	2	3	2	13	1	2	3	3	5	10	9	10	12	26	1.5	0.37
T4	1	1	1	4	19	2	2	3	2	6	9	9	10	12	25	1.1	0.43
T4	2	1	2	2	12	2	2	4	4	5	10	8	9	13	26	1.2	0.44
T4	3	1	3	3	12	1	2	4	2	7	11	10	11	13	24	1.4	0.46
T4	4	2	1	2	9	2	2	4	2	6	8	8	9	14	25	1.0	0.47
T5	1	2	2	2	22	1	3	3	2	4	8	11	11	11	29	0.4	0.3
T5	2	2	3	2	17	2	3	4	2	7	11	10	10	12	28	0.3	0.2
T5	3	1	1	3	15	2	2	4	3	6	11	7	9	10	27	0.2	0.1
T5	4	1	2	1	12	1	2	3	3	6	9	8	9	11	26	0.5	0.2
T6	1	1	3	3	25	2	3	3	3	4	8	10	12	13	23	1.3	0.33
T6	2	2	1	3	27	2	2	3	3	3	12	12	13	11	25	1.4	0.55
T6	3	2	2	2	23	2	2	3	4	5	10	8	10	12	26	1.7	0.57
T6	4	2	3	2	28	2	2	4	2	5	10	7	10	10	24	1.5	0.55

Anexo 3. Fotografías del proceso de la investigación



Selección de la planta madre



Corte del explante



Explantos con yemas axilares



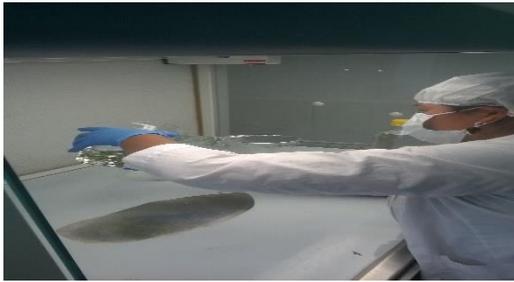
Explantos en solución del jabón líquido



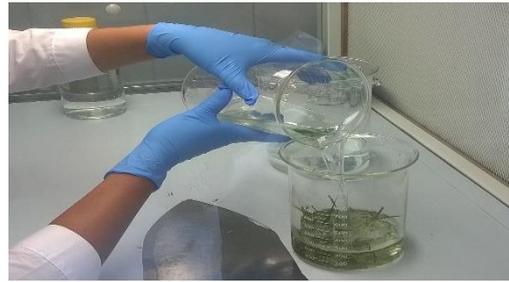
Preparación del etanol al 50% para la desinfección del ex plante.



Preparación del (NaClO) al 60% para la desinfección del ex plante.



Enjuague de los ex plantes en agua esterilizada



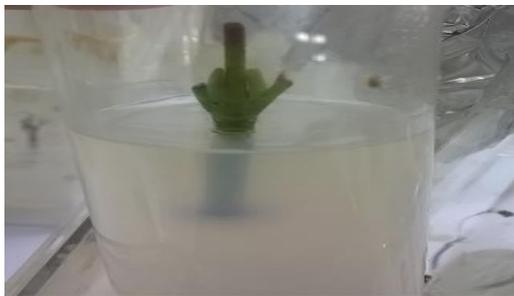
Adición del (NaClO) en los explantes



Explantos en medio de cultivo



Explantos contaminados



Brotación



Explantos en crecimiento



Identificación del proyecto



Producto de la micro propagación

Anexo 4. Glosario de términos técnicos

Cito quininas. -Las cito quininas o citocininas son un grupo de hormonas que promueven la división y la diferenciación celular. Son hormonas fundamentales en el proceso de organogénesis en las plantas y en la regulación de diversos procesos fisiológico como la fotosíntesis.

Contaminación. - Presencia de plagas u otros artículos reglamentados en un producto básico, lugar de almacenamiento, medio de transporte o contenedor, sin que constituya una infección.

Esqueje. - Es un trozo de tallo, hoja o raíz que se separa de una planta para madre para ponerlo a enraizar puede ser en la tierra o en un medio de cultivo in vitro y así dar origen a una nueva planta.

Explanto.- Tejido obtenido de un sitio original y transferido a un medio artificial para crecimiento (proliferación) o mantenimiento (conservación).

In vitro. - Esta técnica puede ser utilizadas en vegetales como herramientas para micro propagación, propagación rápida de clones, eliminación de virus y enfermedades, producción de haploides, aislamientos y utilización de protoplastos, cultivos de embriones, producción de fitoquímicos, ingeniería genética, producción de semillas sintéticas y estudios básicos de anatomía, desarrollo, fisiología y nutrición vegetal.

Laboratorio. - Es un lugar que se encuentra equipado con los medios necesarios para llevar a cabo experimentos, investigaciones o trabajos de carácter científico o técnico. En estos espacios las condiciones ambientales se controlan y se normalizan para evitar que se produzcan influencias extrañas a las previstas.

Meristemo brote apical. - Tejido indiferenciado, localizado dentro del brote apical, generalmente aparece como una estructura brillante distante del primordio foliar y mide menos de 0,1mm de longitud cuando se lo extrae.

Micro propagación. - Propagación clonal in vitro de plantas a partir de brotes apicales o explantes nodales, usualmente con proliferación acelerada de brotes durante los subcultivos.

Propagación in vitro. - Propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, usando recipientes plásticos, o de vidrio, técnicas de asepsia y un medio de crecimiento definido.

Reguladores de crecimiento. - Son sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas y que, por lo general, son activas a concentraciones muy pequeñas. Dentro de este grupo de moléculas podemos diferenciar entre las que son producidas por la planta y aquellas de origen sintético.

Testa. - Es usualmente de consistencia dura y resistente la capa más externa del tegumento su función es la de proteger a la semilla del medio ambiente.

Toti potencia. - Es la capacidad que tiene cualquier célula de la planta para dar origen a todos los tipos de células diferenciadas de un organismo vegetal.

Tejidos. - Se define como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que el explante, o sea, una parte separada del vegetal, tales como protoplastos, células, tejidos u órganos se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas.

Vitaminas. - Es un término compuesto formado por el vocablo latino vita (vida) y por el concepto químico amina. Las vitaminas son las sustancias orgánicas que están presentes en los alimentos y que resultan necesarias para el equilibrio de las funciones vitales.