

**“EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DESINFECCIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO
PARA LA MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE GUARANGO (*Caesalpinia spinosa* Mol.
O. Kuntz)”**

MERCEDES ROCÍO PATIÑO POMAVILLA

TESIS

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERA FORESTAL**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL**

RIOBAMBA – ECUADOR

2011

EL TRIBUNAL DE TESIS CERTIFICA QUE: el trabajo de investigación titulado: “EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DESINFECCIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE GUARANGO (*Caesalpinia spinosa* Mol. O. Kuntz)”, de responsabilidad de la señorita Egresada Mercedes Rocío Patiño Pomavilla ha sido prolijamente revisado, quedando autorizada su presentación.

TRIBUNAL DE TESIS:

Ing. Amalia Cabezas

DIRECTORA

Ing. Norma Erazo

MIEMBRO

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES

ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

Riobamba, 2011

DEDICATORIA

Con cariño a mis padres por su apoyo incondicional por confiar en mí y darme la oportunidad de superarme.

A mis hermanos y a toda mi familia que han sido el pilar fundamental en mi vida.

Mercedes

AGRADECIMIENTO

A Dios por regalarnos la vida, por ser la luz que guía mi camino y por darme unos padres maravillosos que con su cariño y esfuerzo me han apoyado siempre.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en especial a los docentes de la Escuela de Ingeniería Forestal por compartir sus conocimientos durante mi etapa de formación estudiantil.

A la Ing. Jenny Núñez responsable del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Bioforesta por la oportunidad brindada, por la confianza y las facilidades concedidas para realizar esta investigación.

A la Ing. Amalia Cabezas DIRECTORA e Ing. Norma Erazo MIEMBRO de tesis por sus conocimientos y sugerencias para la elaboración del presente trabajo de investigación.

A la Ing. Liliana Pila por impartir sus conocimientos en el área de Cultivo de Tejidos, a los ingenieros Fernando Romero y Miguel Gualpa por su colaboración en la realización de este trabajo.

A mis amigos, compañeros y a todas aquellas personas que de una u otra manera me han apoyado para lograr cumplir una de mis metas.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO		PÁGINA
	LISTA DE CUADROS	i
	LISTA DE GRÁFICOS	iv
	LISTA DE ANEXOS	vi
I	TÍTULO	1
II	INTRODUCCIÓN	1
III	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	4
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	24
V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
VI	CONCLUSIONES	69
VII	RECOMENDACIONES	71
VIII	RESUMEN	72
IX	SUMMARY	73
X	BIBLIOGRAFÍA	74
XI	ANEXOS	79

LISTA DE CUADROS

NÚMERO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Tratamientos para la desinfección de explantes provenientes de invernadero	27
2	Análisis de varianza (ADEVA) para explantes de invernadero	28
3	Tratamientos para la desinfección de explantes provenientes de árboles de campo	29
4	Análisis de varianza (ADEVA) para explantes de campo	30
5	Medio de cultivo para la fase de introducción de guarango	32
6	Métodos para la desinfección de explantes provenientes de invernadero	33
7	Métodos para la desinfección de explantes provenientes de árboles de campo	35
8	Tratamientos en Estudio en la fase de Multiplicación	36
9	Análisis de varianza (ADEVA) para la Fase de Multiplicación	37
10	Medios de cultivo para la multiplicación in vitro de guarango	49
11	Análisis de varianza a los 30 días para la variable días a la brotación en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes de invernadero	42
12	Separación de medias según Tukey al 5% para la variable días a la brotación en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes de invernadero	42
13	Porcentaje de contaminación en el establecimiento in vitro de guarango con explantes de invernadero.	44
14	Porcentaje de pérdida en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes provenientes de invernadero	45
15	Análisis de varianza a los 30 días para la variable días a la brotación en la introducción al sistema in vitro de guarango con	46

	explantes de árboles de campo	
16	Separación de medias según Tukey al 5% para la variable días a la brotación en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes de árboles de campo	47
17	Porcentaje de oxidación en yemas apicales y yemas axilares provenientes de árboles campo	49
18	Niveles de oxidación en explantes provenientes de campo	50
19	Porcentaje de contaminación en el establecimiento in vitro de guarango con explantes provenientes de campo	53
20	Porcentaje de pérdida en el establecimiento in vitro de guarango con explantes provenientes de árboles de campo	55
21	Análisis de varianza a los 30 días para la variable días a la brotación en la multiplicación in vitro de guarango	58
22	Separación de medias según Tukey al 5% para la variable días a la brotación en la multiplicación in vitro de guarango	59
23	Análisis de varianza para la variable número de brotes a los 30, 60 y 90 días de la multiplicación in vitro de guarango	60
24	Análisis de varianza para la variable altura de brotes a los 45, 60, 75 y 90 días de la multiplicación in vitro de guarango	60
25	Análisis de varianza para la variable número de nudos a los 60 y 90 días de la multiplicación in vitro de e guarango	61
26	Porcentaje de pérdida por contaminación y ausencia de brotes en la multiplicación in vitro de guarango	62
27	Índice de multiplicación (IM) in vitro en guarango	63
28	Costos que varían y beneficios netos US\$/m ² en el establecimiento in vitro de guarango con explantes provenientes de invernadero	64
29	Análisis de dominancia	65
30	Tasa de retorno marginal	65
31	Costos que varían y beneficios netos US\$/m ² en el	66

	establecimiento in vitro de guarango con explantes provenientes de árboles de campo	
32	Análisis de dominancia	66
33	Tasa de retorno marginal	67
34	Costos que varían y beneficios netos US\$/m ² en la multiplicación in vitro de guarango	67
35	Análisis de dominancia	68

LISTA DE GRÁFICOS

NÚMERO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Comparación de medias a los 30 días para la variable días a la brotación en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes de invernadero	43
2	Porcentaje de contaminación en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes provenientes de invernadero	44
3	Porcentaje de pérdida por ausencia de brotes y contaminación en explantes de invernadero	45
4	Comparación de medias a los 30 días para la variable días a la brotación en la introducción in vitro de guarango con explantes provenientes de árboles de campo	47
5	Porcentaje de oxidación en la introducción in vitro de yemas apicales de guarango provenientes de árboles de campo	49
6	Porcentaje de oxidación en la introducción in vitro de yemas axilares de guarango provenientes de árboles de campo	50
7	Niveles de oxidación en explantes provenientes de campo	51
8	Porcentaje de contaminación en la introducción in vitro de yemas apicales de guarango provenientes de árboles de campo	54
9	Porcentaje de contaminación en la introducción in vitro de yemas axilares de guarango provenientes de árboles de campo	54
10	Porcentaje de pérdida por oxidación y contaminación de yemas apicales de campo	56
11	Porcentaje de pérdida por oxidación, no brotación y contaminación de yemas axilares de campo	56

12	Días a la brotación en la multiplicación in vitro de guarango	59
13	Porcentaje de pérdida por tratamiento en la multiplicación in vitro de guarango	62
14	Índice de multiplicación in vitro en guarango	64

LISTA DE ANEXOS

NÚMERO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Composición de medios de cultivo utilizados en la multiplicación in vitro de guarango	79
2	Costos fijos para la introducción al sistema in vitro de guarango	80
3	Costos variables por tratamiento para la desinfección de explantes de invernadero	81
4	Costos variables por tratamiento para la desinfección de explantes de campo	82
5	Costos fijos para la fase de multiplicación	84
6	Costos variables por medio de cultivo utilizado para la fase de multiplicación	85
7	Brotos obtenidos en la introducción al sistema in vitro de guarango	86
8	Proceso de oxidación de explantes de campo	87
9	Brotos obtenidos en la fase de multiplicación	88

I. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DESINFECCIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE GUARANGO (*Caesalpinia spinosa* Mol. O. Kuntz).

II. INTRODUCCIÓN

El guarango (*Caesalpinia spinosa* Mol. O. Kuntz.) conocido como tara, taya, vinillo, acacia amarilla, es una especie forestal originaria de los valles andinos desde Venezuela a Chile, crece muy bien en suelos pobres. Produce unas vainas y semillas de las cuales se extrae una serie de productos, entre los más importantes un tanino utilizado para curtiembre y una goma utilizada en la industria alimenticia. Además al ser una leguminosa, aporta nitrógeno al suelo. Todas estas características hacen que esta especie se constituya en una excelente alternativa para la recuperación de áreas degradadas en los Andes y que a la vez mejore el ingreso de los productores.

La propagación en vivero implica un tiempo de 9 a 12 meses para obtener plantas desde la germinación de la semilla hasta la plantación. Además, se necesita mayor espacio, mayor inversión en mano de obra para las labores culturales y finalmente se obtiene un número limitado de individuos.

Al establecer plantaciones de guarango propagadas de manera convencional (germinación de semilla), las plántulas presentan gran diversidad fenotípica en la población. Esta heterogeneidad de plantas presenta masas forestales poco uniformes, con ejemplares que presentan características no deseadas, dificultando su manejo.

La biotecnología es una alternativa muy importante para regenerar y multiplicar las especies forestales en las cuales el proceso de regeneración es difícil y lento, así la micropropagación in vitro es una de las herramientas con la que se puede obtener plantas genéticamente idénticas, que se transforman en los llamados árboles elite, acortando los ciclos de producción, obteniendo material clonal en cualquier época del año y con una propagación masiva de plantas libres de enfermedades.

A. JUSTIFICACIÓN

A nivel internacional existe una gran demanda de los productos obtenidos del guarango, Perú es el mayor productor mundial de goma y harina, exportando alrededor de 23000 toneladas de harina, mientras que Ecuador exporta menos de 200 toneladas, sin embargo a nivel internacional existe una demanda insatisfecha de 57000 toneladas tanto en polvo como en goma (Medina, 2010).

Actualmente en el país existe el proyecto de plantar al menos cinco mil hectáreas de esta especie en diversos sistemas con el fin de agrupar a los productores para acopiar, procesar y exportar los subproductos de guarango principalmente taninos y gomas (Desde el Surco 2008).

Quienes cultivan guarango buscan plantas con alta producción de taninos para cumplir con la demanda internacional en cuanto a porcentaje de taninos presentes en la vaina, que idealmente debe estar entre el 58 y 62%.

La propagación “in vitro” es una alternativa que permitiría obtener plantas con las características deseadas, en cualquier época del año, libres de enfermedades y utilizando espacios pequeños, además no se utilizaría la semilla ya que esta es la fuente principal para la industria.

Por los múltiples usos y la importancia económica a nivel mundial de esta especie, el laboratorio del Centro Bioforesta de la Facultad de Recursos Naturales, está interesado en la producción más eficiente de plantas de guarango a través de la micropropagación in vitro.

B. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar métodos de desinfección y medios de cultivo para la multiplicación in vitro de Guarango *Caesalpinia spinosa* Mol. O. Kuntz.

2. Objetivos específicos

- a. Determinar el método apropiado para la desinfección de explantes de guarango.
- b. Determinar el medio de cultivo que permita la multiplicación in vitro de guarango.
- c. Realizar el análisis económico de los tratamientos.

III. REVISION BIBLIOGRÁFICA

A. GENERALIDADES

La Tara o Guarango (*Caesalpinia spinosa*), es una planta producida en varias zonas del país, que crece entre los 1000 y 2900 msnm, está presente en el callejón interandino donde se han identificado poblaciones naturales en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Azuay, Loja y Chimborazo (INRENA, 1997).

1. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Caesalpinaceae

Género: Caesalpinia

Especie: spinosa

Nombre científico: *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze

Nombre común: Tara, taya (Perú); divi divi de tierra fría, guarango, cuica, serrano, tara (Colombia); vinillo, guarango (Ecuador); tara (Bolivia, Chile, Venezuela), Acacia amarilla, Dividivi de los Andes (Europa) (Jorgensen, 1999).

Etimología: *Caesalpinia*, en honor de Andrea Caesalpini (1524-1603), botánico y filósofo italiano. *Spinosa*, del latín *spinosa-a-um*, con espinas.

2. **Distribución**

El guarango tiene una distribución entre 4° N y 32° S, desde Venezuela hasta el norte de Chile. Se encuentra principalmente en las formaciones conocidas como valles secos interandinos, en áreas que corresponden al ecosistema de Matorral Seco Montano desde los 1500 hasta 3000 metros sobre el nivel del mar (Baquero *et al.* 2004).

3. **Descripción botánica**

El guarango es una especie arbórea con amplia adaptación en los valles secos de la Sierra, alcanza una altura de hasta 12 metros en su estado adulto y su diámetro supera los 40 cm. a la altura del pecho.

Su tronco es de una madera dura y está provisto de una corteza gris espinosa y agrietada, con ramillas densamente pobladas cuando no se poda. La copa es irregular, aparasolada, densa y con ramas repartidas irregularmente.

Las hojas son compuestas y acopladas en un eje del tipo paripinada; las flores son irregulares de color amarillo-rojizo dispuestas en racimos de 8-15 cm. de largo; el fruto es una vaina de color variado desde el verde a un tono marrón rojizo de acuerdo al estado de madurez; las semillas son ovoides y ligeramente aplanadas de color café oscuro, los frutos y las semillas constituyen la parte aprovechable del árbol (fonag.org.ec/doc/pdf/6.pdf).

4. **Usos y bondades**

Se considera una especie bastante “rústica” que debe ser conservada y explotada de manera sustentable. Entre sus cualidades se destaca la presencia de taninos en la vaina, que son considerados una alternativa preferible al uso de cromo y otros productos tóxicos en el proceso de curtiembre de cuero; además, estos compuestos le confieren al cuero tratado resistencia y elasticidad (De la Cruz 2004).

Los taninos actualmente son utilizados en la fabricación de diversos productos como plásticos y adhesivos, galvanizados y galvanoplásticos, además se usa como clarificadores de vinos y como sustitutos de la malta para dar cuerpo a la cerveza; en la industria farmacéutica tienen un amplio uso terapéutico y también se utilizan en protección de metales, cosmetología, perforación petrolífera, industria del caucho, mantenimiento de pozos de petróleo y como parte de las pinturas por su acción anticorrosiva (De la Cruz 2004).

Otro producto obtenido de la especie es el ácido gálico, utilizado como antioxidante en la industria del aceite y en la industria cervecera como un elemento blanqueante o decolorante, así como en productos relacionados con fotografía, tintes, manufactura del papel, farmacia y grabado o litografía (De la Cruz 2004).

La semilla es fuente de aceites, goma (usada para dar consistencia a los helados), harina proteica y derivados como jabones, pinturas, barnices, esmaltes, tintes de imprenta, mantecas y margarinas comestibles, pues presenta un contenido de ácidos libres de 1,4% (ácido oleico); es aceptable comercialmente por su baja acidez (Mancero, 2008).

Todas las aplicaciones de esta especie le han merecido el nombre de “el oro de los Incas”, sobre todo en el Perú, país que ha hecho un manejo de la especie para abastecer en parte la demanda mundial de los productos. Otros países de la región, como Bolivia y Ecuador, han manifestado su interés en incentivar la plantación de la especie para entrar al mercado internacional (Mancero, 2008).

5. Estacionalidad de la producción

La producción se presenta durante cuatro períodos al año, en condiciones de cultivo u ornamentales generalmente producen casi todo el año. Sin embargo, existen ciertas variaciones, según la localidad, altitud, estación, temperatura, precipitación y suelo (Ariza & Lozada, 2004).

La productividad entre árboles puede variar de 20 a 40kg de vainas por año, en dos cosechas de 4 meses cada una. Los meses de producción y el rendimiento por hectárea, varían de acuerdo a la zona y están en función a la densidad. Para el caso de plantas silvestres agrupadas en pequeñas áreas o aisladas su producción llega a 10 kg/planta, pudiendo incrementarse con un adecuado riego y fertilización, generalmente un árbol de guarango da frutos a los tres años; y si es silvestre a los cuatro años. Su promedio de vida es de cien años y el área que ocupa cada árbol es de 10 metros cuadrados (Ariza & Lozada, 2004).

6. Importancia

El Guarango es una especie de múltiples propósitos. Sirve para la protección de áreas erosionadas, por ser una especie leguminosa fija nitrógeno del aire y mejora la fertilidad del suelo, es una planta rústica poco exigente en suelo y agua, sin embargo para lograr productividad requiere de abono, riego, poda de formación y un mantenimiento que implica una inversión económica como cualquier árbol frutícola (Barriga, 2008).

Permite la posibilidad de explotar el tanino, goma y otros productos a través de sus frutos sin generar daño al árbol a diferencia de la extracción del tanino a través de la corteza como sucede con otras especies forestales (www.desdeelsurco.com).

Es una especie forestal que produce madera dura y apta para la industria y la artesanía, sirve para programas de agroforestería, cercas vivas, barreras rompe vientos y para la protección de cuencas hidrográficas, cursos o fuentes de agua. Sin embargo, lo más sobresaliente de la especie es su adaptación a ecosistemas con signos de aridez o propensos a la desertificación, convirtiéndose en la opción de reforestación de suelos degradados en ambientes de bosque seco. (www.fonag.org.ec/doc).

En los mercados actuales hay mayor interés del comprador en usar productos más ecológicos, tanto para curtiembre como en la industria de alimentos. El método estándar para la curtiembre industrial de cueros, basado en compuestos de cromo, ha generado alarma por la

acumulación de estos compuestos en el ambiente y su potencial cancerígeno. Se hacen esfuerzos para promover nuevos métodos de curtiembre libres de cromo. Entre estos métodos se destaca la utilización de taninos vegetales, como los contenidos en el guarango (www.desdeelsurco.com).

Adicionalmente es una especie melífera y forrajera de mucho interés para la familia campesina que por lo general en los Andes, apuesta a la diversificación de sus sistemas de producción; se puede mejorar la calidad de vida de los sectores rurales marginados, haciendo eficiente su producción y productividad, para competir en el mercado, tanto en los precios como en la calidad del producto (Barriga, 2008).

El eventual inconveniente de esperar cinco años desde la siembra hasta el comienzo de la producción queda compensado porque, de ahí en adelante y siquiera por cuarenta años, se puede cosechar dos veces al año sin mayor mantenimiento ni inversión adicionales (www.fonag.org.ec/doc).

En fin el guarango es un espino nativo en peligro de extinción que promete mejorar los suelos pobres, reforestar paisajes despreciados, dar sustento a los marginados del campo y fortalecer la economía de nuestro país. (Dammer & Anhalzer).

7. Limitantes

En lo negativo se identifica el riesgo de que en la propagación por semilla se generen plantaciones con menor resistencia a plagas y enfermedades.

En lo que respecta a los mucílagos y espesativos vegetales, la demanda llega a 92 000 TM; sin embargo, la goma de tara compite con otros productos de similares características como ingredientes para la industria de alimentos. Se debe trabajar en reconocer y promocionar las ventajas de estos subproductos frente a sus competidores, a más de avanzar en la búsqueda de tecnologías alternativas de bajo costo para la generación de valor agregado y diversificación de la oferta regional (Barriga, 2008).

Las políticas nacionales no promueven directamente al guarango en programas de biocomercio o reforestación y la falta de información y difusión en el país para orientar el crecimiento de la producción.

A pesar de que el mercado internacional de la tara está en crecimiento, se menciona especialmente en Perú que China podría ser un competidor fuerte debido al incremento de zonas con plantaciones de tara y al desarrollo de tecnologías para el procesamiento, especialmente en ácido gálico (Barriga, 2008).

B. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

1. Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Roca & Mroginski).

Esta técnica se basa en la “totipotencialidad celular”, esto es, la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo ciertas condiciones, dadas en el cultivo *in vitro*. Así se logra la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original, a partir de cualquier parte de la planta, ya sea trozos de tejidos, ápices meristemáticos o incluso células aisladas (Reyes y Hewstone, 1994).

2. Micropropagación de especies leñosas

Debido a una gran variedad de propiedades intrínsecas a su biología, las plantas leñosas y los árboles forestales en particular, han sido un reto en la propagación *in vitro* comparadas a especies agronómicas y otras especies herbáceas (Trigiano, 1996).

La propagación in vitro de especies forestales es generalmente difícil, los explantes provenientes de árboles maduros son generalmente complicados de propagar in vitro. El material de tejido juvenil es morfo genéticamente más viable y responde mejor a la propagación in vitro, en varias especies forestales el uso de tejido juvenil ha facilitado su propagación clonal, sin embargo se ha logrado obtener resultados favorables a partir de tejido maduro en la micropropagación de algunas especies forestales (Ahuja, 1985).

Por otro lado, es necesario que los árboles usados como patrones sean lo suficientemente maduros que expresen su potencial genético (Sweet, 1973).

En estas últimas décadas se ha considerado la idea de realizar mejoramiento genético en árboles. Para poder alcanzar ganancia genética en especies forestales sería necesario criar árboles por algunas generaciones y cada generación requiere entre 15 y 50 años dependiendo de la especie. Una manera de captar ganancia genética es reproduciendo genotipos superiores a través de prácticas asexuales como la propagación vegetativa (Ahuja, 1985).

3. Técnicas del cultivo de tejidos

a. Cultivo de meristemos

El meristemo, es una estructura dinámica en la que continuamente se está produciendo crecimiento y división celular (Azcon – Bieto y Talón, 2001).

Los meristemos se pueden clasificar por su origen, posición y la estructura que originan. Los meristemos apicales o primarios del tallo y de la raíz conducen al desarrollo del cuerpo primario (raíces, tallos y hojas) de la planta y se forman durante la embriogénesis. Los meristemos secundarios como los axilares son similares a los primarios en estructura y desarrollo, aunque dan origen a raíces o tallos secundarios (Randall y Hake, 1997).

Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro*. Al respecto, los meristemas apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies (Villalobos et al., 1982).

b. Cultivo de callos

Callo es el conjunto de células vegetales no diferenciadas en división, inducido por un balance hormonal específico entre auxinas y citoquininas. Los callos obtenidos pueden ser embriogénicos y no embriogénicos, dependiendo del material inicial que se utilizó y en su mayor parte, del contenido del medio de cultivo (Thorpe, 1999).

c. Cultivo de células

Pueden ser establecidos a partir de las células unitarias separadas enzimáticamente y grupos de células (agregados), mediante la desagregación de los callos establecidos de distintos órganos de las plantas (Thorpe, 1999).

d. Cultivo de embrioides

Es comúnmente conocido como la obtención de plantas por vía embriogénesis somática, es decir, la formación de un embrión a partir de una célula sin necesidad de fusión de gametos; fue descubierto en 1878 y descrito por primera vez en 1958 por Reinert (Gautheret, 1999).

4. Fases del cultivo *in vitro*

A diferencia de las técnicas tradicionales 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. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos, en la producción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, etc. (Dixon, 1986).

Pierik, (1987) circunscribe a este proceso en cinco fases:

FASE 0: Preparación de la planta madre

FASE I: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia

FASE II: Multiplicación de brotes

FASE III: Enraizamiento

FASE IV: Aclimatación

a. FASE 0: Preparación de la planta madre.

El estado fisiológico de la planta que da el explante (planta madre) influye significativamente en su capacidad morfogénica. Los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Styer et al., 1983).

b. FASE I: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia.

Una vez escogida la planta madre, se extraen los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantos. Antes de extraer los explantos se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia (Pierik, 1987).

1) El explante

Es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. La selección del explante puede hacerse teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta (Villalobos, 1980).

El tamaño del explante no tiene aparentemente mayor influencia, la edad del explante es un factor crítico en las especies maderables (Bonga, 1982); en general, la micropropagación es relativamente fácil empleando tejidos juveniles, y es progresivamente más difícil con tejidos adolescentes y maduros (Pierik, 1987).

c. FASE II: Multiplicación de los brotes.

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron de la FASE I originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar (Pierik, 1987).

d. FASE III: Elección de un medio de enraizamiento de los explantes.

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente dos métodos:

1) Enraizamiento *in vitro*

Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas. Esta operación se realiza en la cámara de flujo laminar. Este método permite ser más flexible a la hora de escoger los brotes, ya que éstos obtienen del medio la fuente de energía para enraizar, y por tanto no es necesario que tengan las hojas muy bien desarrolladas para realizar la fotosíntesis (Pierik, 1987).

2) Enraizamiento *ex vitro*

Los explantes se deben transferir a un sustrato limpio, aunque no necesariamente estéril, que puede ser una mezcla de turba con perlita o vermiculita. Con este método es necesario que el medio de enraizamiento esté libre de organismos patógenos y que los brotes tengan las hojas

bien desarrolladas, ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse (Pierik, 1987).

e. FASE IV: Aclimatación de los explantes enraizados.

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación.

Si los explantes fueron enraizados *in vitro* como *ex vitro*, en el momento en que se extraen de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas perezosos para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explante (Pierik, 1987).

Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cerosa bien desarrollada, la barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. Los explantes deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz (Pierik, 1987).

5. Condiciones del cultivo in vitro

El cultivo *in vitro* de plantas superiores es una técnica que exige un control absoluto del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante. Conviene, por tanto, conocer cuáles son los principales factores que conforman el ambiente del explante y que deberán ser controlados (Castillo, 2004).

a. Desinfección y esterilización.

Es importante iniciar el cultivo en una condición de total asepsia (Hudson y Dale, 1968), lo cual implica realizar tratamientos para eliminar de su superficie microorganismos. Además el lugar de trabajo y los materiales deben cumplir con esta condición (Auge *et al.*, 1984).

La desinfección del material vegetal contaminado por bacterias y hongos del suelo, además de saprófitos es siempre difícil y aleatorio. El hipoclorito de sodio es un esterilizante muy recurrido en los trabajos de cultivo *in vitro* (Margara, 1988).

La esterilización del material a utilizar se realiza a través de tres formas posibles como son el autoclavado (a presión con vapor en un tiempo y temperatura determinados), irradiación y filtración (Pierik, 1987).

Para esterilizar en autoclave los materiales relacionados con el cultivo de tejidos incluyendo los medios de cultivo, se acostumbra usar una presión de 15 lb durante 20 minutos; a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente 121°C, suficiente para matar virtualmente todas las formas de vida en cinco minutos. Sin embargo, se debe recalcar que el tiempo de exposición requerido dependerá tanto del tipo de material que se va a esterilizar como de su cantidad (Roca et al., 1993).

b. Medio de cultivo

El éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física (Gamborg et al. 1976).

El 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 (Perece J. 1995 citado por Muñoz, 2003).

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in vitro* ni *in vivo*. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autótroficas cuando se desarrollan en estas condiciones.

Las sustancias que pueden formar parte de los medios nutritivos, para inducir el crecimiento y desarrollo se registran en el siguiente cuadro.

Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales		
Agua		
Sustancias orgánicas	Macro elementos	Micro elementos
Azúcares	N	Fe
Aminoácidos	P	Zn
Auxinas	K	B
Citoquininas	Ca	Mn
Giberelinas	Mg	Cu
Acido abcísico	S	Ni
		Co
		Al
		Mo
		I

Fuente. Pierik, 1987

El medio MS, o de Murashige y Skoog (1962), es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas; existen numerosas variaciones comerciales de este medio. El medio B5 o de Gamborg et al. (1968), o sus varios derivados, ha sido de un gran valor en el cultivo de células y protoplastos, y también es utilizado eficazmente en regeneración de plantas.

La diferencia principal entre los medios es que el medio MS, se considera como un medio rico en nitrógeno amoniacal y potasio, conteniendo cerca de 4 veces más nitrato que otros medios, el medio B5 tiene menor concentración de nitratos y el medio WPM (1980) de baja concentración de sales está especialmente indicado para especies leñosas (Perece J. 1995 citado por Muñoz, 2003).

1) Hormonas de las plantas

El desarrollo normal de una planta depende de la interacción de factores externos (luz, nutrientes, agua, temperatura) e internos (hormonas). Las fitohormonas u hormonas vegetales son sustancias químicas que son producidas por ciertas células vegetales en sitios estratégicos de la planta y son capaces de regular de manera predominante los fenómenos vegetales. (Gonzalez, 1999).

Pueden actuar en el propio tejido donde se generan o bien a largas distancias, mediante transporte a través de los vasos xilemáticos y floemáticos. Las hormonas vegetales controlan un gran número de sucesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación. Una fitohormona interviene en varios procesos, y del mismo modo todo proceso está regulado por la acción de varias fitohormonas. (Gonzalez, 1999).

a) Auxinas

Estimulan la elongación de las células, se sintetizan en las regiones meristemáticas del ápice de los tallos y se desplazan desde allí hacia otras zonas de la planta, principalmente hacia la base, estableciéndose así un gradiente de concentración. Este movimiento se realiza a través del parénquima que rodea los haces vasculares (Aguirre, 1999).

Su representante más abundante en la naturaleza es el ácido indolacético (IAA), sin embargo, evidencias recientes sugieren que existen otras auxinas indólicas naturales en plantas. (Kimura, 1985).

El principal uso de las auxinas ha sido en la multiplicación asexual de plantas, El AIB es la auxina más utilizada para este efecto por su estabilidad y poca movilidad, la otra utilizada ha sido el Ácido Naftalenacético (ANA), es una hormona sintética aunque es más móvil y menos consistente se utiliza en concentraciones mayores (1 a 10 mg/l), con un punto óptimo cerca de 2 mg/l. de las auxinas naturales. En cultivo de tejidos, las auxinas ANA y 2,4-D se utilizan

para inducir la formación de raíces en los callos no diferenciados, así como para estimular la división de células (Krikorian).

b) Citoquininas

Las citoquininas o citocininas constituyen un grupo de hormonas vegetales que promueven la división y la diferenciación celular.

Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemas en la punta de las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles. La zeatina es una hormona de esta clase y se encuentra en el maíz (*Zea*). Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes (Raisman, 1999).

Entre las citoquininas sintéticas esta la Kinetina sustancia estimuladora de la división celular y La BAP que es un compuesto muy activo, se utiliza más que la Kinetina o la Zeatina (Krikorian).

c) Giberelinas

Su nombre proviene del hongo *Gibberella fujikuroi* de donde fueron extraídas originalmente. El Ácido giberélico GA3 fue la primera de esta clase de hormonas en ser descubierta. Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo (Raisman, 1999).

d) Ácido abscísico

Inhibe el crecimiento celular y la fotosíntesis. El ácido abscísico (ABA), conocido anteriormente como dormina o abscisina, es un inhibidor del crecimiento natural presente en plantas (Gonzalez, 1999).

e) Etileno

El etileno, siendo un hidrocarburo, es muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Aunque se ha sabido desde principios de siglo que el etileno provoca respuestas tales como geotropismo y abscisión, no fue sino hasta los años 1960 que se empezó a aceptar como una hormona vegetal (Rost, 1979).

c. pH

Cuando se prepara un medio de cultivo, después de añadir todos sus componentes se procede a ajustar el pH final al valor deseado, añadiendo hidróxido de sodio (OHNa) al 0.1 N ó ácido clorhídrico (HCl) al 0.1N al medio, (Pelacho et al ,2002).

El pH es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de explantes y en general se ajusta entre 5,5 y 5,8. Con pH bajo se pueden producir problemas de inestabilidad de hormonas, vitamina, precipitación de ciertas sales (fosfatos y sales férricas) y licuación del medio (Quak, 1977).

SEEMANN (1993), indica que el pH se debe regular antes de adicionar el gelificante, y debe estar entre los valores 5 y 6,5, debido a que los valores menores o mayores pueden detener el crecimiento del explante. Por otra parte Murashige y Skoog (1962), reportaron que un pH de 5,7 a 5,8 es adecuado para mantener todas las sales en forma soluble, siempre con niveles relativamente altos de iones fosfato.

d. Temperatura

La temperatura a la que está expuesto el explante cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar. Cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo. Este intervalo puede variar en función del genotipo, del órgano del que se ha obtenido el explante, de la época del año, de la edad de la planta madre, del fotoperíodo, etc. (Marín et al., 1997).

En la mayoría de situaciones, se obtienen resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 y 28°C, aunque en ocasiones se exigen fríos de 4°C y también 28-30°C para plantas tropicales (Marín et al., 1997).

e. **Humedad relativa.**

Dentro del cuarto de incubación, debe fluctuar de 70 – 80%, valores más bajos, a menudo provocan una desecación del medio de cultivo (Seemann et al., 1993).

f. **Luz**

Las cámaras de cultivo disponen de una serie de unidades productoras de luz situadas de tal forma que iluminen toda la superficie útil de la cámara. Las unidades productoras de luz acostumbran a ser fluorescentes y pueden estar situadas de formas distintas (Marín et al., 1997).

Horizontales. Fluorescentes colocados sobre el techo de cada área de cultivo. Este sistema tiene la ventaja de que consigue una distribución más uniforme de la luz en toda el área, pero tiene el inconveniente de que calienta el techo y éste suele ser, a la vez, la base de otro nivel de cultivo, por lo cual puede dar lugar a una distribución irregular de la temperatura ([etsea2.udl.es/in vitro/camara.ht](http://etsea2.udl.es/in_vitro/camara.ht)).

Verticales. La batería de fluorescentes se coloca en los laterales de la cámara de cultivo de forma que producen una distribución más irregular de la luz en el área de cultivo pero generan menos problemas con la distribución del calor ([etsea2.udl.es/in vitro/camara.ht](http://etsea2.udl.es/in_vitro/camara.ht)).

1) **Control del fotoperiodo**

Tanto la intensidad de la luz, como el fotoperiodo pueden ser críticos para la formación de brotes en algunas especies (Hussey, 1980). Usualmente, un fotoperiodo de 12 a 16 horas con 1000 a 3000 lux es suficiente para inducir la organogénesis; por otra parte, un cambio en la

intensidad lumínica puede causar organogénesis, y pueden ocurrir cambios morfogénéticos específicos debidos a la longitud de onda de la iluminación. La regulación del fotoperiodo se consigue mediante un programador (analógico o digital) conectado al circuito de iluminación (Roca et al., 1991).

6. Principales problemas en el cultivo in vitro

a. Contaminación

La contaminación puede causar pérdidas económicas muy importantes dentro de la técnica de cultivo *in vitro*. La contaminación más que matar a los explantes directamente invade el cultivo haciendo que el explante no sea apto para su micropropagación (Cassells, 1991).

La mayor parte de los contaminantes en el cultivo de tejidos proceden de la planta donadora, dependiendo del explante que se utilice, se pueden transmitir microorganismos de la superficie del explante o de su interior. Con el cultivo de meristemos se pueden eliminar la mayoría de los organismos; sin embargo, en el caso de hojas, peciolo y tallos casi todos los microorganismos en el tejido pueden transmitirse (Bhojawani, 1996).

Los principales microorganismos asociados a las superficies de las plantas son hongos y bacterias (Toro, 2004).

b. Oxidación

El pardeamiento de los explantes es un problema que se presenta con mayor frecuencia en explantes de especies leñosas y se relaciona con la liberación al medio y oxidación de polifenoles, que dan como resultado productos tóxicos para el explante (Seemann y Barriga, 1993).

Según George y Sherrington (1984), la luz y la especie son factores determinantes en la oxidación de explantes en cultivo in vitro. Este último factor tiene dos posibles orígenes: uno propio de la planta que naturalmente produce muchos hidroxifenoles y taninos, causantes de la oxidación, y otro que proviene del uso de algunos desinfectantes; los cuales inducen la oxidación.

c. **Vitrificación**

La vitrificación se denomina también hiperhidricidad, translucidez, vitrosidad y es el resultado de un exceso de humedad en el recipiente de crecimiento, escasa concentración de agar en el medio sólido, o crecimiento en medio líquido (Ziv y Halevy, 1983).

7. **Ventajas del cultivo in vitro**

- Es el único método conocido actualmente para erradicar virus, viroides, micoplasmas y otros patógenos a partir de material enfermo.
- Mantiene el cultivo libre de plagas y enfermedades, porque se requiere mucha asepsia.
- Evita la erosión genética.
- Reduce costos de labores agronómicas en el mantenimiento de germoplasma en el campo.
- Facilidad para transportar el material in vitro de un país a otro, con menos restricciones aduaneras (Vilca, 2009).
- Clonación de individuos con características deseables durante todo el año
- Mejora genética de plantas, incluyendo obtención de plantas transgénicas
- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reduce el riesgo de pérdidas genéticas al evitar la mezcla del material por cruzamiento.
- Permite controlar las condiciones ambientales (Montoya et al., 1991).
- Propagación masiva de plantas, especialmente beneficiosa para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción.

- Facilita el cultivo de un gran número de plantas en una superficie pequeña.
- Permite la obtención de individuos uniformes.
- Mediante este método de propagación se puede incluir aspectos de fitomejoramiento (Villalobos, 1980).

8. Desventajas del cultivo in vitro

- Requiere de personal especializado, biólogos etc.
- Requiere infraestructura y equipamiento especiales.
- La adquisición de productos químicos es costosa.
- Difícil de instalar laboratorios “in vitro” donde no exista fluido eléctrico (Vilca, 2009).

C. ANTECEDENTES DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN GUARANGO

Existen pocos trabajos realizados en el cultivo de tejidos en guarango. Perú cubre la mayor parte de la demanda mundial de gomas y taninos por esta razón han desarrollado varias técnicas de propagación entre ellas está el cultivo de tejidos, los resultados se dieron a conocer en el Taller Internacional, MEJORAMIENTO Y MANEJO DEL CULTIVO DE LA TARA (*Caesalpinia spinosa*).

En estos trabajos sobre el cultivo in vitro de guarango se ha partido de yemas y microestacas, desinfectadas con alcohol al 35% por 1 minuto, hipoclorito de sodio al 3% durante 15 minutos para microestacas y 10 minutos para yemas (Vilca, 2009).

Los explantes han sido sembrados en medio de crecimiento (Murashige y Skoog (MS), + 0.25 mg/l BAP y 0.083 mg/l ANA). En la fase de multiplicación el medio utilizado es (MS, + 1.5 mg/l BAP y 1.5 mg/l Kinetina). Para el enraizamiento in vitro se ha utilizado el medio (MS/2 + 2 mg/l AIB y 2 mg/l ANA). Para la aclimatación las plántulas in vitro dentro de los tubos son llevadas del laboratorio al invernadero durante 6 días y posteriormente se trasplantan a bolsas de repique con sustrato estéril a base de humus + turba + arena en la proporción 1:1:1/2 (Vilca, 2009).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

1. Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Bioforesta de la Facultad de Recursos Naturales, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2. Ubicación geográfica¹

Latitud: 01° 38 ' 51" S

Longitud: 78° 46 ' 50 " W

Altitud: 2820 msnm.

3. Características del Cuarto de Crecimiento²

Temperatura promedio: 21 ± 2°C

Humedad relativa: 60 - 70 %

Fotoperiodo: 16 / 8 h con 3000 lux.

B. MATERIALES

1. Materiales de laboratorio

Vasos de precipitación, cajas petri, agitador de vidrio, pizeta, pinzas, tubos de ensayo de 20 mm por 150 mm, pipetas, probetas, mechero, papel aluminio, servilletas, bisturí, tijeras, gradillas, algodón, gotero, agar, povidin, alcohol, cloro comercial, carbón activado.

2. **Equipos**

Autoclave, cámara de cultivo, destilador, plato calentador con agitación, microscopio, termohigrómetro digital, pH-metro, refrigerador, balanza analítica.

3. **Medios de cultivo**

Medio Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (MS); McCown's Woody Plant Basal Salt Mixture; Murashige and Skoog Basal Medium with Gamborg's vitamins.

4. **Reguladores de crecimiento**

Ácido naftalenacético (ANA), benzil amino purina (BAP), Ácido Giberélico (AG3), kinetina.

5. **Antioxidantes**

Ácido cítrico, ácido ascórbico

6. **Fuente de explantes**

- a. Explantes de invernadero de plantas de cinco meses de edad provenientes de árboles semilleros.
- b. Explantes de campo de brotes de raíz de tres meses de edad formados en árboles de guarango.

C. METODOLOGÍA

La presente investigación se realizó en dos fases:

PRIMERA FASE: Introducción al sistema in vitro

1. Factores en estudio para explantes provenientes de invernadero

a. Factor A. Tipo de explante

a1: Yemas apicales

a2: Yemas axilares

b. Factor B. Métodos para desinfección

Se plantearon tres métodos de desinfección en base a recomendaciones del laboratorio Microplant - Quito (Ing. Liliana Pila) y de trabajos realizados en el Centro de Investigación ADEFOR en Cajamarca- Perú (Ing. Julio Vilca).

Método 1: Alcohol 75% por 1 minuto; cloro 75% por 2 min. y cloro 30% por 2 minutos.

Método 2: Alcohol 75% por 1 minuto; cloro 75% por 7 minutos.

Método 3: Alcohol 35% por 1 minuto; cloro 60% por 10 minutos para yemas apicales y 15 minutos para yemas axilares.

c. Tratamientos en estudio

Los tratamientos resultaron de la combinación de los factores en estudio que se especifican en el cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos para la desinfección de explantes provenientes de invernadero.

Tratamientos	Código	Descripción
T1	a1b1	Yema apical, Método de desinfección 1.
T2	a1b2	Yema apical, Método de desinfección 2.
T3	a1b3	Yema apical, Método de desinfección 3.
T4	a2b1	Yema axilar, Método de desinfección 1.
T5	a2b2	Yema axilar, Método de desinfección 2.
T6	a2b3	Yema axilar, Método de desinfección 3.

d. Unidad de observación

La unidad de observación estuvo constituida por un tubo de ensayo de 20 mm de diámetro por 150 mm de longitud, conteniendo 7 ml de medio de cultivo en donde se sembró un explante de cada uno de los tratamientos en estudio.

e. Diseño experimental**1) Tipo de Diseño para explantes provenientes de invernadero**

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar en arreglo bifactorial combinatorio 2x3 con cuatro repeticiones.

a) Especificaciones

Tratamientos	6
Repeticiones	4
Unidades Experimentales	24

b) Análisis Estadístico

Cuadro 2. Análisis de varianza (ADEVA) para explantes de invernadero.

Fuente de variación	Grados de libertad
Factor A	1
Factor B	2
AxB	2
Error	18
Total	23

c) Análisis Funcional

Se determinó el coeficiente de variación y se expresó en porcentaje.

Se realizó la prueba de Tukey al 5% para todas las variables cuantitativas.

2. Factores en estudio para explantes provenientes de árboles de campo

a. Factor A. Tipo de explante

a1: Yemas apicales

a2: Yemas axilares

b. Factor B. Métodos para desinfección de explantes.

Método 1: Alcohol 75% por 1 minuto; cloro 75% por 7 minutos.

Método 2: Alcohol 75% por 1 minuto; cloro 60% por 1 minutos y cloro 10% por 5 minutos.

Método 3: Alcohol 35% por 1 minuto; cloro 60% por 15 minutos.

c. Factor C. Antioxidantes

c1: Ácido Cítrico

c2: Ácido Ascórbico

c3: Sin Antioxidante

d. Tratamientos en Estudio

Los tratamientos resultaron de la combinación de los factores en estudio los mismos que se especifican en el cuadro 3.

Cuadro 3. Tratamientos para la desinfección de explantes provenientes de árboles de campo.

Tratamiento	Código	Descripción
T1	a1b1c1	Yema apical, Método de desinfección 1, Ácido Cítrico
T2	a1b2c1	Yema apical, Método de desinfección 2, Ácido Cítrico
T3	a1b3c1	Yema apical, Método de desinfección 3, Ácido Cítrico
T4	a1b1c2	Yema apical, Método de desinfección 1, Ácido Ascórbico
T4	a1b2c2	Yema apical, Método de desinfección 2, Ácido Ascórbico
T6	a1b3c2	Yema apical, Método de desinfección 3, Ácido Ascórbico
T7	a1b1c3	Yema apical, Método de desinfección 1, sin Antioxidante
T8	a1b2c3	Yema apical, Método de desinfección 2, sin Antioxidante
T9	a1b3c3	Yema apical, Método de desinfección 3, sin Antioxidante
T10	a2b1c1	Yema axilar, Método de desinfección 1, Ácido Cítrico
T11	a2b2c1	Yema axilar, Método de desinfección 2, Ácido Cítrico
T12	a2b3c1	Yema axilar, Método de desinfección 3, Ácido Cítrico
T13	a2b1c2	Yema axilar, Método de desinfección 1, Ácido Ascórbico
T14	a2b2c2	Yema axilar, Método de desinfección 2, Ácido Ascórbico
T15	a2b3c2	Yema axilar, Método de desinfección 3, Ácido Ascórbico
T16	a2b1c3	Yema axilar, Método de desinfección 1, sin Antioxidante
T17	a2b2c3	Yema axilar, Método de desinfección 2, sin Antioxidante
T18	a2b3c3	Yema axilar, Método de desinfección 3, sin Antioxidante

e. Diseño Experimental

1) Tipo de diseño para explantes provenientes de árboles de campo

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar en arreglo trifactorial combinatorio 2x3x3 con cuatro repeticiones.

a) Especificaciones

Tratamientos	18
Repeticiones	4
Unidades Experimentales	72

b) Análisis Estadístico

Cuadro 4. Análisis de varianza (ADEVA) para explantes de campo.

Fuente de variación	Grados de libertad
Factor A	1
Factor B	2
Factor C	2
AxB	2
BxC	4
AxC	2
AxBxC	4
Error	54
Total	71

c) Análisis Funcional

Se determinó el coeficiente de variación y se expresó en porcentaje.

Se realizó la prueba de Tukey al 5% para todas las variables cuantitativas.

d) **Análisis económico**

Para el análisis económico de los tratamientos se utilizó el método del presupuesto parcial de Perrin.

D. **VARIABLES Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN IN VITRO**

1. **Días a la brotación**

Se determinó mediante observaciones continuas de los tratamientos, contabilizando el tiempo transcurrido desde la siembra hasta la presencia de yemas durante 30 días.

2. **Porcentaje de explantes contaminados**

La evaluación se realizó durante 30 días mediante observaciones frecuentes de los explantes donde se identificó si la contaminación era causada por hongos, bacterias o ambos. Se contó el número de explantes contaminados y se expresó en porcentajes de acuerdo a la siguiente fórmula descrita por Cárdenas, 2011.

$$\% \text{ Contaminación} = \frac{\text{Explantes contaminados}}{\text{Total explantes}} \times 100$$

3. **Porcentaje de explantes oxidados**

Se contabilizó los explantes que presentaron oxidación a partir del primer día de siembra hasta los 10 días. Para la evaluación se utilizó la escala de oxidación aplicada por Jaramillo (2008), según la cual hay tres niveles distintos de oxidación que presentan los explantes.

1 = Oxidado muerto (Necrosamiento total).

2 = Oxidado vivo (Presenta necrosamiento pero no en un nivel avanzado permitiendo viabilidad del explante).

3 = No oxidado (El explante es viable y no presenta oxidación degenerativa de tejido).

Los resultados se expresaron en porcentaje, tomando como referencia las unidades experimentales que presentaron un nivel de oxidación 1, ya que en este nivel no hay posibilidad de regeneración del explante.

4. Porcentaje de pérdida de explantes

Se determinó mediante el registro del número de explantes perdidos en relación al número de explantes introducidos en la misma fase, en base a la siguiente fórmula.

$$\% P = \frac{\text{\# de explantes perdidos}}{\text{\# de explantes introducidos}} \times 100$$

Considerando como explantes perdidos aquellos que no han desarrollado brotes, los contaminados y los oxidados (CONIF, 2005).

E. MANEJO DEL EXPERIMENTO

1. Preparación del medio de cultivo

Para la primera fase se preparó 700 ml de medio basal MS diluido a la mitad, sin la adición de hormonas como se indica en el cuadro 5.

Cuadro 5. Medio de cultivo para la fase de introducción de guarango.

Cantidad	Medio basal	Sacarosa	Agar
700 ml	½ MS 4.3 g/l	30 g/l	7 g/l

Fuente: Recomendado por Ing. Liliana Pila Técnica Laboratorio Microplant 2010.

Luego de preparar el medio se ajustó el pH a 5.8, se calentó hasta que llegue al punto de ebullición y se añadió el agar, luego se dispensó 7 ml de medio en cada tubo de ensayo y finalmente se esterilizó en autoclave a 121°C, con 15 psi durante 15 minutos. Para conservar los medios se guardaron en refrigeración.

2. Elección de explantes de invernadero

Se obtuvo yemas apicales y yemas axilares por separado de plantas crecidas en el invernadero con cinco meses de edad, provenientes de árboles semilleros previamente identificados por investigadores de campo del centro Bioforesta.

a. **Desinfección de explantes**

En el laboratorio se realizó una primera desinfección de los explantes fuera de la cámara de flujo laminar para lo cual se utilizó jabón, fungicida y povidin en diferentes tiempos como se detalla en el cuadro 6, luego, los explantes se llevaron a la cámara de flujo laminar donde se desinfectó con alcohol potable (90°) y cloro comercial (concentración de NaOCl 5,25%) en diferentes concentraciones y tiempos según los tratamientos como se indica en el cuadro 6. Luego de cada desinfección los explantes se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Cuadro 6. Métodos para la desinfección de explantes provenientes de invernadero.

Tipo de explante	Desinfección de explantes					
	Desinfección fuera de la cámara de flujo laminar		Desinfección dentro de la cámara de flujo laminar			
	Producto	Tiempo	Trat.	Producto	Concentración	Tiempo
Yemas apicales y yemas axilares	Jabón	1 minuto	1	Alcohol potable	75%	1 minuto
	Fungicida	10 minutos		Cloro comercial	75%	2 min.
	Povidin	10 minutos		Cloro comercial	30%	2 min.
			2	Alcohol potable	75%	1 minuto
				Cloro comercial	75%	7 min.
			3	Alcohol potable	35%	1 minuto
		Cloro comercial		60%	10 y 15 min.	

1. Fuente: Previo pruebas en el Laboratorio del Centro Bioforesta, 2010.

2. Fuente: Recomendado por Ing. Liliana Pila Técnica Laboratorio Microplant 2010

3. Fuente: Vilca, 2009.

b. **Siembra**

Luego de la desinfección, se procedió a secar los explantes colocándolos en una servilleta para luego realizar los cortes eliminando las partes dañadas durante la desinfección, obteniendo

explantes de 1 a 1,5 cm portando una yema (apical o axilar). Se colocó un explante en cada tubo de ensayo que contenía medio de cultivo fresco y estéril. La siembra se realizó bajo condiciones asépticas y siguiendo el mismo procedimiento para todos los tratamientos en estudio, luego los tubos se llevaron al cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad (60-70%) y fotoperiodo (16/8 h), donde permanecieron dos meses hasta que desarrollen brotes.

3. Elección de explantes de árboles de campo

Los explantes se obtuvieron de brotes nuevos con tres meses de edad, formados en la base de árboles de guarango existentes en los predios del vivero forestal, a los cuales se les realizó una previa desinfección durante 15 días con un fungicida sistémico, con el fin de disminuir la contaminación. Se obtuvo yemas apicales y yemas axilares por separado y de tamaños uniformes.

a. Desinfección de explantes

En el laboratorio se realizó una primera desinfección de los explantes fuera de la cámara de flujo laminar para lo cual se utilizó jabón, fungicida y povidin en diferentes tiempos como se detalla en el cuadro 7, luego, los explantes se llevaron a la cámara de flujo laminar donde se desinfectó con alcohol potable (90°) y cloro comercial (concentración de NaOCl 5,25%) en diferentes tiempos y concentraciones de acuerdo a los tratamientos en estudio como se indica en el cuadro 7.

Luego de cada desinfección los explantes se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y en el último enjuague se utilizó los antioxidantes como el ácido cítrico y ácido ascórbico, añadiendo 5 gotas de antioxidante al agua donde se colocó los explantes durante dos minutos.

Cuadro 7. Métodos para la desinfección de explantes provenientes de árboles de campo.

Tipo de explante	Tratamiento de explantes					
	Desinfección fuera de la cámara de flujo laminar		Desinfección dentro de la cámara de flujo laminar			
	Producto	Tiempo	Trat.	Producto	Concentración	Tiempo
Yemas apicales y yemas axilares	Jabón	1 minuto	1	Alcohol potable	75%	1 minuto
	Fungicida	10 minutos		Cloro comercial	75%	7 min.
	Povidin	10 minutos	2	Alcohol potable	75%	1 minuto
				Cloro comercial	60%	1min.
				Cloro comercial	10%	5 min.
			3	Alcohol potable	35%	1 minuto
		Cloro comercial		60%	15 min.	

1. Fuente: Recomendado por Ing. Liliana Pila Técnica Laboratorio Microplant 2010

2. Fuente: Vilca, 2009.

3. Fuente: Vilca, 2009.

b. Siembra

Luego de colocar los explantes en el antioxidante, se procedió a secar colocándolos en una servilleta para luego cortar las partes dañadas durante la desinfección, obteniendo explantes de 2 cm con una yema axilar y explantes de 2,5 cm con una yema apical, se sembró un explante por tubo de ensayo con el medio de cultivo fresco y esterilizado. La siembra se realizó bajo condiciones asépticas y siguiendo el mismo procedimiento para todos los tratamientos en estudio.

Finalmente se identificó los tubos y se llevó al cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de humedad temperatura y fotoperiodo. Los explantes permanecieron dos meses en el cuarto de crecimiento hasta que desarrollen brotes que permitan su multiplicación posterior.

SEGUNDA FASE: Multiplicación in vitro

Para esta fase se utilizó las plántulas obtenidas en la primera fase.

1. Factores en Estudio

a. Factor A. Tipo de Explante

a1: Yemas apicales

a2: Yemas axilares

b. Factor B. Medios de Cultivo

Medio1: MS con Auxina y Citoquinina.

Medio2: Woody con Auxina, Citoquinina y carbón activado.

Medio3: MS con Auxina y Giberelina.

Medio4: MS con vitaminas Gamborg y Citoquininas.

c. Tratamientos en Estudio

Los tratamientos resultaron de la combinación de los factores en estudio y se especifican en el cuadro 8.

Cuadro 8. Tratamientos en Estudio en la fase de Multiplicación.

Tratamiento	Código	Descripción
T1	a1b1	Yema apical, medio 1
T2	a1b2	Yema apical, medio 2
T3	a1b3	Yema apical, medio 3.
T4	a1b4	Yema apical, medio 4
T5	a2b1	Yema axilar, medio 1
T6	a2b2	Yema axilar, medio 2
T7	a2b3	Yema axilar, medio 3
T8	a2b4	Yema axilar, medio 4

d. Unidad de Observación

La unidad de observación estuvo constituida por un tubo de ensayo de 20 mm de diámetro por 150 mm de longitud, conteniendo 7 ml de los diferentes medios de cultivo.

e. Diseño Experimental

1) Tipo de Diseño

En la fase de multiplicación se utilizó el Diseño Completamente al Azar en arreglo bifactorial combinatorio 2x4 con cuatro repeticiones.

a) Especificaciones

Tratamientos	8
Repeticiones	4
Unidades Experimentales	32

b) Análisis Estadístico

Cuadro 9. Análisis de varianza (ADEVA) para la Fase de Multiplicación.

Fuente de variación	Grados de libertad
Factor A	1
Factor B	3
AxB	3
Error	24
Total	31

c) Análisis Funcional

Se determinó el coeficiente de variación y se expresó en porcentaje.

Se realizó la prueba de Tukey al 5% para todas las variables cuantitativas.

d) Análisis Económico

El análisis económico de los tratamientos se realizó utilizando el método del presupuesto parcial de Perrin.

F. VARIABLES Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN**1. Días a la brotación**

Se evaluó durante 30 días mediante observaciones continuas de los tratamientos, y contabilizando el tiempo transcurrido desde la siembra en el medio hasta la presencia de yemas.

2. Número de brotes

Se evaluó a los 30, 60 y 90 días posteriores a la siembra, contabilizando el número de brotes presentes en cada explante.

3. Altura de brotes

La altura de brotes se midió con una regla milimetrada desde la inserción del brote hacia el ápice, la variable se registró en mm. Esta variable fue evaluada cada 15 días durante tres meses.

4. Número de nudos

Se contabilizó el número de nudos que presentaron los nuevos brotes a los 30, 60 y 90 días posteriores a la siembra.

5. Porcentaje de pérdida de explantes

Esta variable se evaluó al final de la investigación (90 días), se determinó dividiendo el número de explantes perdidos para el número de explantes introducidos, considerando como

explantes perdidos aquellos que no han desarrollado brotes, los explantes muertos y los contaminados, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula (CONIF, 2005).

$$\% P = \frac{\# \text{ de explantes perdidos}}{\# \text{ de explantes introducidos}} \times 100$$

6. Índice de multiplicación

El índice de multiplicación se evaluó a los 30, 60 y 90 días posteriores a la siembra, se determinó contando el número de nudos obtenidos por explante cada mes dividido para el número de plantas evaluadas, para lo cual se utilizó la fórmula descrita por Colmenares y Giménez, (2003).

$$IM = \frac{\text{Número de nudos a los (30, 60 y 90) días}}{\text{Número de plantas}}$$

G. MANEJO DEL EXPERIMENTO

1. Preparación de medios de cultivo

Para esta fase se preparó 100 ml de cada medio de cultivo suplementados con hormonas de crecimiento como se indica en el cuadro 10.

Cuadro 10. Medios de cultivo para la multiplicación in vitro de guarango.

Medio	Sacarosa	Hormonas			Agar	Otros
		Auxina	Citoquinina	AG3		
1 MS 4,3 g/l	20 g/l	ANA0,083 ppm	BAP 0,25 ppm	-	6 g/l	-
2 MC Woody 2,3 g/l	25 g/l	ANA 0,5 ppm	BAP 0,2 ppm	-	7 g/l	Carbón Activ. 2 g/l
3 MS 4,3 g/l	20 g/l	ANA 0,3 ppm	-	0,5 ppm	8 g/l	-
4 MS con vitaminas Gamborg 4,4g/l	25 g/l	-	BAP 1,5 y Kinetina 1,5 ppm	-	7 g/l	-

1. Fuente: Vilca, 2009.

2. Fuente: Perece, 1995.

3. Fuente: Recomendado por Ing. Liliana Pila Técnica Laboratorio Microplant 2010.

4. Fuente: Vilca, 2009.

Luego de ajustar el pH a 5.8, se calentó los medios por separado hasta que lleguen al punto de ebullición para añadir el agar, en el caso del medio 2 primero se añadió el carbón activado y luego el agar, se dispensó 7 ml de medio en los tubos de ensayo, se tapó con papel aluminio, se identificó y se esterilizó en autoclave a 121°C, con 15 psi durante 15 minutos. Los medios se conservaron en refrigeración.

2. Multiplicación de los explantes

Los brotes obtenidos en la primera fase fueron llevados a la cámara de flujo laminar previamente desinfectada, para retirarlos del tubo de ensayo y proceder a segmentar en micronudos de 0.5 a 1 cm conteniendo yemas (apicales o axilares), luego se sembró un micronudo por tubo de ensayo, posteriormente se llevó al cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de luminosidad, temperatura y humedad relativa, donde permanecieron durante tres meses.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. FASE DE INTRODUCCIÓN

1. Explantes provenientes de invernadero

a. Días a la brotación

Para realizar el análisis estadístico de esta variable, se consideró solo los tratamientos T1, T4 y T5 en los que se formaron brotes, mientras que los tratamientos T2, T3 y T6 se excluyeron por no obtener resultados. De acuerdo al análisis de varianza a los 30 días después de la siembra para la variable días a la brotación (Cuadro 11) se determinó que existen diferencias significativas al 5%, es decir que los tratamientos se comportan de forma diferente al introducir al sistema in vitro.

La media obtenida en esta variable fue de 14 días para el inicio de brotación de los explantes. El coeficiente de variación fue de 22,5%, este valor alto se debe a la variación de los datos obtenidos en la investigación. Las yemas axilares brotaron en menor tiempo mientras que las yemas apicales tardaron en brotar, estos resultados son contrarios a los obtenidos por Pila (2007) en yuca quien menciona que las yemas apicales presentan un crecimiento acelerado mientras los nudos tardan en brotar, esto indica que no todas las especies reaccionan de la misma manera al sistema in vitro.

Trigiano (2000), menciona que se debe tomar en cuenta que no todos los explantes de la misma planta poseen el mismo potencial de regeneración, normalmente hay uno o más genotipos dentro de una especie que responden rápidamente a protocolos de regeneración in vitro mientras que otros no presentan respuesta alguna.

Sin embargo SEEMANN y BARRIGA (1993), recomiendan yemas apicales o axilares por su activa división celular para producir organogénesis directa y por ende la brotación.

Cuadro 11. Análisis de varianza a los 30 días para la variable días a la brotación en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes de invernadero.

Fuente de Variación	G. L	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor de F
Tratamientos	2	139,25	69,63	7,36*
Error	6	56,75	9,46	
Total	8	196		
Media			14	
C.V. %			22,5	

* Significativo ($p < 0,05$)

Al realizar la prueba de Tukey al 5% para la variable días a la brotación (Cuadro 12 y gráfico 1), se determinó 3 rangos de significancia, ubicándose en el rango más bajo el tratamiento T5 (yema axilares, alcohol 75% por 1 minuto y CI 75% por 7 minutos) donde la brotación empezó a los 8 días después de la siembra, mientras que el rango más alto corresponde al tratamiento T1 (yemas apicales, alcohol 75% por 1 minuto, CI 75% y CI 30% por 2 minutos) en el que la brotación empezó a los 17 días después de la siembra.

CIAT (1980), indica que el desarrollo de una planta depende de la interacción entre el genotipo y el ambiente, por lo tanto las plantas presentan respuestas diferentes al ser cultivadas in vitro.

Cuadro 12. Separación de medias según Tukey al 5% para la variable días a la brotación en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes de invernadero.

Tratamientos	Media	Grupo
T5	8	a
T4	12	ab
T1	17	b

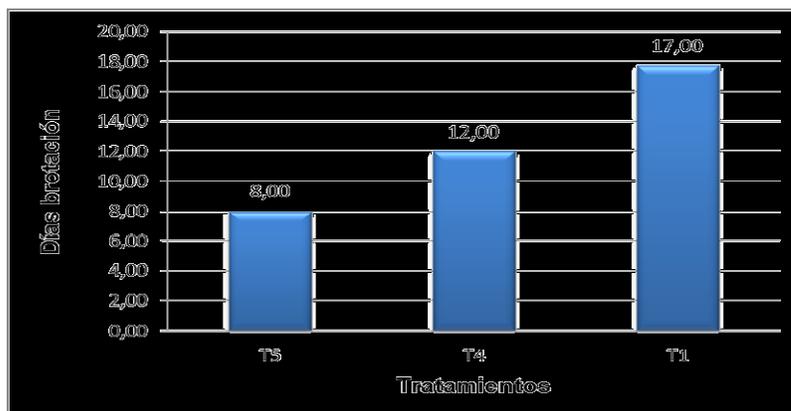


Gráfico 1. Comparación de medias a los 30 días para la variable días a la brotación en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes de invernadero.

b. Porcentaje de contaminación

En el cuadro 13 y gráfico 2, se resume el efecto de los diferentes tratamientos de desinfección con alcohol potable (90°) y cloro comercial (hipoclorito de sodio 5.25 %) en el establecimiento in vitro de yemas apicales y yemas axilares de guarango provenientes de invernadero.

Los resultados demuestran que los tratamientos T1 y T4 con las dosis de 75% de alcohol por 1 minuto y doble desinfección con cloro comercial (Cl 75% y Cl 30%) por 2 minutos fueron los mejores con el 0% de contaminación de los explantes y 44 % de supervivencia. Los tratamientos T2 y T5 desinfectados con Alcohol 75% por 1 minuto y Cl 75% por 7 minutos presentaron el 25% de contaminación y el 12,5% de supervivencia, mientras que los tratamientos T3 y T6 desinfectados con Alcohol 35% por 1 minuto y Cloro comercial 60% durante 10 minutos para yemas apicales y 15 minutos en yemas axilares se obtuvo el 50% y 25% de contaminación respectivamente con un 6,25% de supervivencia.

En la evaluación visual del tipo de microorganismo contaminante, se pudo apreciar que los explantes que presentaban contaminación, eran del tipo bacteriano por la forma en que se desarrollaron las bacterias, formando un halo blanquecino y transparente en el borde basal del explante introducido en el medio de cultivo, su procedencia pudiera tener origen endógeno en

el material vegetal, lo que permite que este tipo de bacterias escape al proceso de desinfección superficial y no se elimine totalmente de los explantes.

Resultados similares observaron Fitch et al. (2003), al realizar la micropropagación masiva de *Carica papaya*, encontrando incluso después de varios subcultivos la proliferación de bacterias endógenas que afectaron el proceso productivo.

Recientes investigaciones revelan la existencia de bacterias embebidas en el agua del tejido xilemático. Éstas logran sobrevivir el proceso de desinfección inicial debido a la poca penetración de dicho proceso. Con el paso del tiempo éstas logran desarrollarse y formar un “fantasma blanco” (Skirvin et al. 1999).

Cuadro 13. Porcentaje de contaminación en el establecimiento in vitro de guarango con explantes de invernadero.

Tratamiento	Porcentaje de contaminación	
	Bacterias %	Hongos %
T1	0	0
T2	25	0
T3	50	0
T4	0	0
T5	25	0
T6	25	0

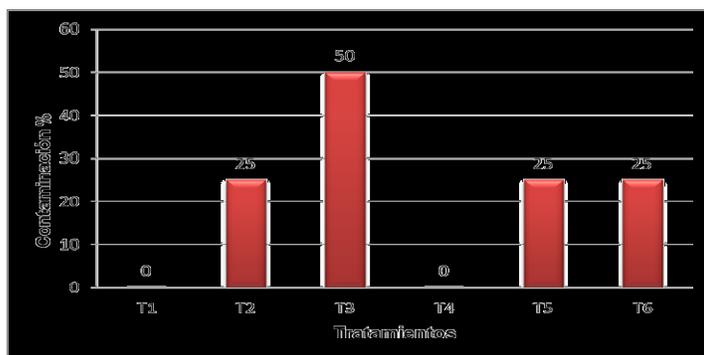


Gráfico 2. Porcentaje de contaminación en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes provenientes de invernadero.

c. Porcentaje de pérdida de explantes

El cuadro 14 y gráfico 3, muestran el porcentaje de pérdida obtenido al utilizar explantes de invernadero. Los tratamientos T2 y T3 presentaron el 100% de pérdida considerando principalmente la ausencia de brotes y en menor porcentaje por la contaminación. La ausencia de brotes puede deberse a que las yemas apicales no sobrevivieron a la exposición por mucho tiempo al cloro (7 y 10 minutos).

En los tratamientos T6, T5 y T4 el porcentaje de pérdida disminuyó a 75%, 50% y 25% respectivamente, mientras que el tratamiento T1 fue el único que no presentó pérdida. La doble desinfección con cloro permitió controlar la contaminación tanto en yemas apicales como en yemas axilares (T1 y T4) y se logró la supervivencia de los explantes.

Cuadro 14. Porcentaje de pérdida en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes provenientes de invernadero.

Tratamientos	Sin brote %	Contaminados %	Total %
T1	0	0	0
T2	75	25	100
T3	50	50	100
T4	25	0	25
T5	25	25	50
T6	50	25	75

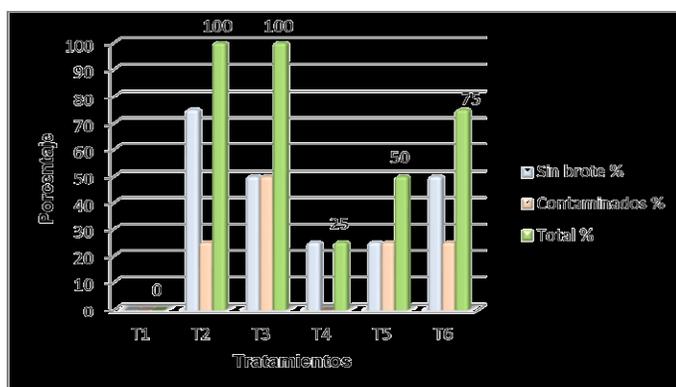


Gráfico 3. Porcentaje de pérdida por ausencia de brotes y contaminación en explantes de invernadero.

2. Explantos provenientes de campo

a. Días a la brotación

Para realizar el análisis estadístico se tomó en cuenta los tratamientos T2, T5, T11 y T14 donde se obtuvo brotes, mientras que el resto de tratamientos se excluyeron por no presentar resultados. Según el análisis de varianza a los 30 días después de la siembra para la variable días a la brotación (Cuadro 15), se puede observar diferencias altamente significativas en los tratamientos, lo que demuestra que los explantes provenientes de campo se comportan de forma diferente al introducir al sistema in vitro.

El coeficiente de variación fue de 16,05% con una media de 12 días a los que empieza la brotación de los explantes.

En los tratamientos donde no se obtuvo resultados, las yemas apicales no sobrevivieron a la oxidación y al proceso de desinfección durante tiempos prolongados, mientras que las yemas axilares sobrevivieron pero no desarrollaron los brotes.

Cuadro 15. Análisis de varianza a los 30 días para la variable días a la brotación en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes de árboles de campo.

Fuente de Variación	G.L	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor de F
Tratamientos	9	183,23	61,07	15,27**
Error	3	36	4,00	
Total	12	219,23		
Media			12	
C.V. %			16,05	

** Altamente significativo ($p < 0,01$)

Al realizar la prueba de Tukey al 5% para la variable días a la brotación (Cuadro 16 y gráfico 4), se determinó 4 rangos de significancia. Ubicándose en el rango más bajo el tratamiento T5 (yemas apicales con doble desinfección y ácido ascórbico) donde la brotación empezó a los 7 días después de la siembra, mientras que el rango más alto corresponde al tratamiento T11

(yemas axilares con doble desinfección y ácido cítrico), donde la brotación empezó a los 17 días después de la siembra.

Cuadro 16. Separación de medias según Tukey al 5% para la variable días a la brotación en la introducción al sistema in vitro de guarango con explantes de árboles de campo.

Tratamientos	Media	Grupo
T5	7	a
T14	13	b
T2	14	bc
T11	17	c

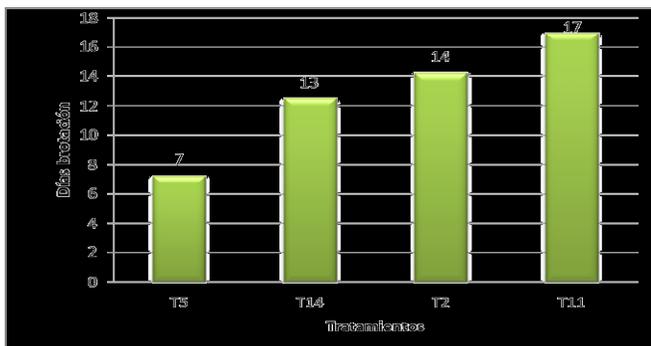


Gráfico 4. Comparación de medias a los 30 días para la variable días a la brotación en la introducción in vitro de guarango con explantes provenientes de árboles de campo.

b. Porcentaje de oxidación

En el cuadro 17 gráficos 5 y 6, se resume el porcentaje de oscurecimiento que presentaron los explantes provenientes de árboles campo.

Las yemas apicales presentaron altos porcentajes de oxidación, en los tratamientos T7, T8 y T9 donde no se utilizó antioxidantes se obtuvo el 100% de oxidación; los tratamientos T1, T3, T4 y T6 presentaron el 75% de oxidación a pesar de haber utilizado antioxidantes, el proceso de oxidación se debe principalmente a las concentraciones de cloro utilizados en la desinfección y los tiempos prolongados de exposición al desinfectante ya que se produjo un necrosamiento de los explantes y como consecuencia la oxidación, los tratamientos T2 y T5

son los únicos que no presentaron oxidación, debido a que el tiempo de exposición en el desinfectante fue corto y adicional a esto se utilizó ácido cítrico y ácido ascórbico respectivamente.

Las yemas axilares presentaron menores porcentajes de oxidación en relación a los ápices, así tenemos que los explantes del tratamiento T11 no presentaron oxidación, mientras que los tratamientos T10, T13 y T14 presentaron el 25% de oxidación, los tratamientos T12 y T15 presentaron el 50% de oxidación, los tratamientos T16, T17 en los que no se utilizó ningún antioxidante presentaron el 75% de oxidación y el tratamiento T18 fue el que presentó el porcentaje más alto con el 100% de oxidación.

Pirela y Mogollón (1996), de resultados obtenidos en guayabo indican que a medida que la distancia entre la posición nodal y el ápice terminal se hace mayor, la oxidación fenólica disminuye. En esa misma investigación, las yemas laterales del primer nudo se oxidaron completamente y los mejores resultados se obtuvieron con los segmentos nodales del tercer y cuarto nudo.

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con Pirela y Mogollón al comparar las posiciones nodales ya que las yemas apicales presentaron los valores más altos de oxidación mientras que las yemas axilares que corresponden al segundo y tercer nudo presentaron menor porcentaje oxidación.

Cuadro 17. Porcentaje de oxidación en yemas apicales y yemas axilares provenientes de árboles campo.

Tratamiento	Oxidación %
T1	75
T2	0
T3	75
T4	75
T5	0
T6	75
T7	100
T8	100
T9	100
T10	25
T11	0
T12	50
T13	25
T14	25
T15	50
T16	75
T17	75
T18	100

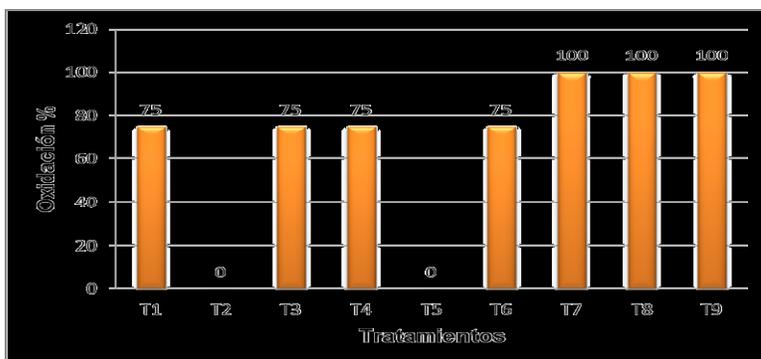


Gráfico 5. Porcentaje de oxidación en la introducción in vitro de yemas apicales de guarango provenientes de árboles de campo.

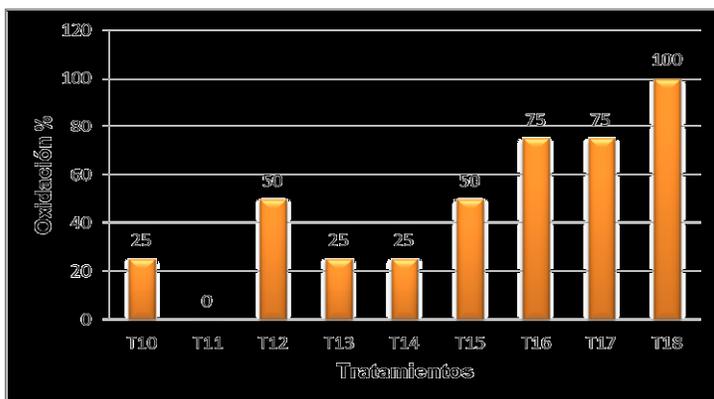


Gráfico 6. Porcentaje de oxidación en la introducción in vitro de yemas axilares de guarango provenientes de árboles de campo.

c. Niveles de oxidación

En el cuadro 18 y gráfico 7, se presentan los niveles de oxidación en porcentajes tomando como referencia la escala de oxidación aplicada por Jaramillo (2008).

En el nivel uno donde los explantes mueren por oxidación se obtuvo un alto porcentaje con el 54%, el proceso de oxidación en la mayor parte se presencié al primero y segundo día después de la siembra, y esta fue avanzando hasta el quinto día donde se mantuvo, en las yemas apicales la oxidación fue severa que avanzó al medio de cultivo, disminuyendo en las yemas axilares.

En el nivel dos donde se oxida una parte del explante se obtuvo un 3% de oxidación esto ocurre en las yemas apicales ya que estas se sembraron con una yema axilar adicional al ápice. La parte que se oxidó es el ápice y sobrevivió la yema axilar. Mientras que para el tercer nivel donde los explantes no presentan oxidación el porcentaje fue de 43%.

Cuadro 18. Niveles de oxidación en explantes provenientes de campo.

Nivel de oxidación	Porcentaje
Oxidado muerto	54,17
Oxidado vivo	2,78
No oxidado	43,06

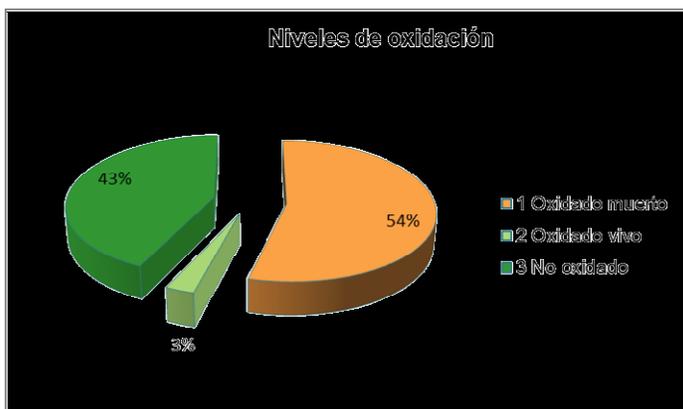


Gráfico 7. Niveles de oxidación en explantes provenientes de campo.

d. Porcentaje de contaminación

En el cuadro 19 y gráficos 8 y 9, se presentan los porcentajes de contaminación evaluados en los explantes provenientes de árboles de campo. El mayor porcentaje de contaminación fue causado por bacterias, la contaminación por hongos tuvo menor incidencia.

Las yemas apicales presentaron porcentajes bajos de contaminación. En los tratamientos T2, T5 y T8 que corresponde a una doble desinfección con cloro se obtuvo el 0% de contaminación excepto en el tratamiento T5 donde se presentó el 25% de contaminación por hongos, lo cual pudo ser causado por manejo durante la siembra, ya que los mejores resultados se obtuvieron con este tratamiento de desinfección donde se logró mayor sobrevivencia de los explantes por la baja concentración de cloro, excepto en el T8 donde no se utilizó antioxidante.

Los tratamientos T1, T4 y T7 en los que se utilizó el cloro al 75% durante 7 minutos no presentaron contaminación, excepto el tratamiento T4 donde se presentó un 25% de contaminación por bacterias, el proceso de desinfección tuvo un efecto contrario ya que se produjo necrosamiento de los explantes lo cual influyó en la oxidación de los mismos.

En los tratamientos T3, T6 y T9 donde se bajó la concentración de alcohol a 35% por 1 minuto y cloro a 60% durante 15 minutos no presentaron contaminación, pero debido al

tiempo de permanencia de los explantes en cloro se produjo un necrosamiento de los tejidos y la posterior oxidación.

Utilizando yemas apicales como fuente de explante, se registró bajos porcentajes de contaminación con los tres tratamientos de desinfección utilizados, sin embargo, la exposición en cloro por tiempos prolongados causó daños a los tejidos del explante. La menor contaminación de las yemas apicales se debe, a que son zonas de crecimiento activo, lo que hace que tanto los hongos como las bacterias se localicen en los primordios externos, que son precisamente los que se eliminan durante los procesos de desinfección y disección (Araya, 2000).

Las yemas axilares presentaron mayores porcentajes de contaminación. En los tratamientos, donde se utilizó el cloro al 75% por 7 minutos se obtuvo el 0% de contaminación en el tratamiento T10, seguido por el 25% en el tratamiento T13 y el 50% de contaminación en el tratamiento T16.

En los tratamientos T11, T14 y T17 donde se realizó una doble desinfección, presentó el 50% de contaminación en cada tratamiento, probablemente debido a las bajas concentraciones de cloro utilizado.

En los tratamientos donde se bajó la concentración de alcohol a 35% y cloro a 60% se presentó 25% de contaminación en los tratamientos T12 y T18, mientras que el tratamiento T15 presentó el 0% de contaminación.

Estos resultados indican que las yemas axilares presentaron mayor contaminación, particularmente donde las concentraciones de NaOCl eran bajas, posiblemente debido a la procedencia y el estado fisiológico del explante.

Los resultados obtenidos justifican la aplicación de un fungicida previo a la obtención de los explantes, con lo cual se disminuye la incidencia de patógenos, principalmente en las yemas apicales, como lo recomiendan Deore & Sudhakar (2008).

El proceso de desinfección involucra factores como el producto químico a utilizar, el tiempo de exposición del explante al desinfectante, el tipo de explante y las condiciones en que se encuentra el material donador de explantes.

A mayor concentración y mayor tiempo de exposición, mayores serán las posibilidades de eliminación de los contaminantes; pero de la misma manera, mayores son las posibilidades de dañar los tejidos, lo cual está íntimamente relacionado con el tipo de explante, dependiendo del tamaño, las características físicas y morfológicas de la superficie de los mismos, así serán las posibilidades de daño (George y Sherrington, 1984; Pierik, 1987).

Cuadro 19. Porcentaje de contaminación en el establecimiento in vitro de guarango con explantes provenientes de campo.

Tratamiento	Porcentaje de contaminación	
	Bacterias %	Hongos %
T1	0	0
T2	0	0
T3	0	0
T4	25	0
T5	0	25
T6	0	0
T7	0	0
T8	0	0
T9	0	0
T10	0	0
T11	50	0
T12	25	0
T13	25	0
T14	25	25
T15	0	0
T16	50	0
T17	50	0
T18	25	0

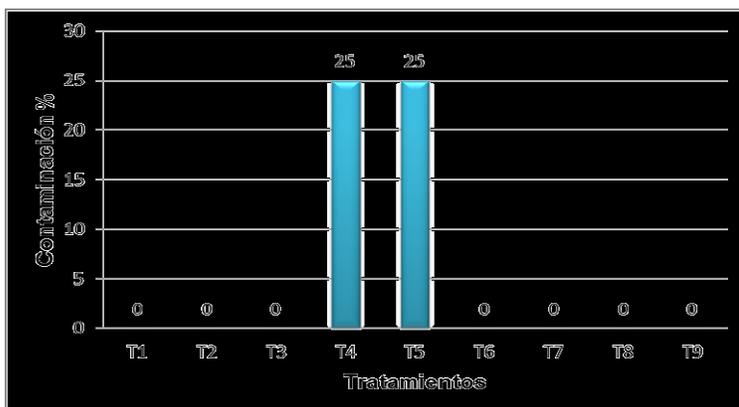


Gráfico 8. Porcentaje de contaminación en la introducción in vitro de yemas apicales de guarango provenientes de árboles de campo.

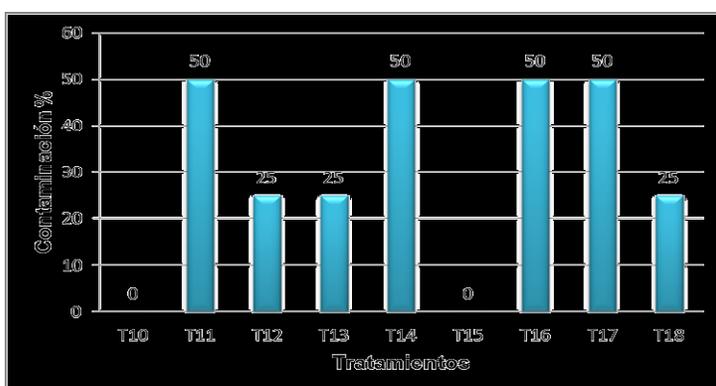


Gráfico 9. Porcentaje de contaminación en la introducción in vitro de yemas axilares de guarango provenientes de árboles de campo.

e. Porcentaje de pérdida de explantes.

En los explantes provenientes de campo, la mayor tasa de pérdida fue producto de la oxidación (Cuadro 20 y gráfico 10). En las yemas apicales se produjo el 75% de pérdida por oxidación en los tratamientos que se utilizó antioxidante, excepto en los tratamientos T2 y T5, mientras que los tratamientos donde no se utilizó antioxidante la pérdida por oxidación fue del 100%. En las yemas axilares la pérdida por oxidación fue menor en relación a las yemas apicales, también existió pérdidas considerables por contaminación y por no presentar brotes.

En el tratamiento T2 que corresponde a yemas apicales tratadas con ácido cítrico y doble desinfección, no presentó pérdida, seguido por el tratamiento T5 (yemas apicales) con el mismo proceso de desinfección que el anterior y tratadas con ácido ascórbico donde se reportó el 25% de pérdida por contaminación. En el caso de yemas axilares el tratamiento T11 (doble desinfección con Cl y ácido cítrico) presentó el 50% de pérdida por contaminación, mientras que el 75% de pérdida se registró en los tratamientos T12 (alcohol 35% por 1 minuto y Cl 60% por 15 minutos con ácido cítrico) y el tratamiento T14 (alcohol 75% por 1 minuto, doble desinfección con Cl y ácido ascórbico), en los demás tratamientos se registró el 100% de pérdida producto de la oxidación en los tratamientos donde no se utilizó antioxidantes y en los que la exposición en Cl fue por tiempos prolongados seguido por la ausencia de brotes y por la contaminación.

Cuadro 20. Porcentaje de pérdida en el establecimiento in vitro de guarango con explantes provenientes de árboles de campo.

Tratamientos	Oxidación %	Contaminación %	Sin brotes	Total %
T1	75	0	0	75
T2	0	0	0	0
T3	75	0	0	75
T4	75	25	0	100
T5	0	25	0	25
T6	75	0	0	75
T7	100	0	0	100
T8	100	0	0	100
T9	100	0	0	100
T10	25	0	75	100
T11	0	50	0	50
T12	50	25	0	75
T13	25	0	75	100
T14	25	50	0	75
T15	50	0	50	100
T16	75	25	0	100
T17	75	25	0	100
T18	100	0	0	100

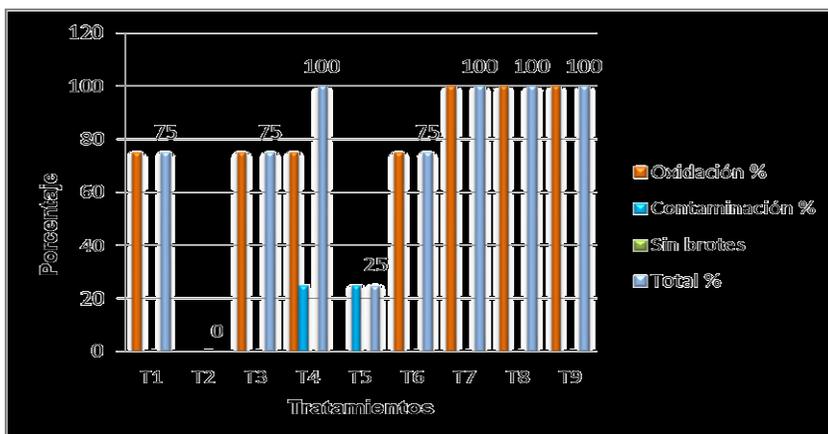


Gráfico 10. Porcentaje de pérdida por oxidación y contaminación de yemas apicales de campo.

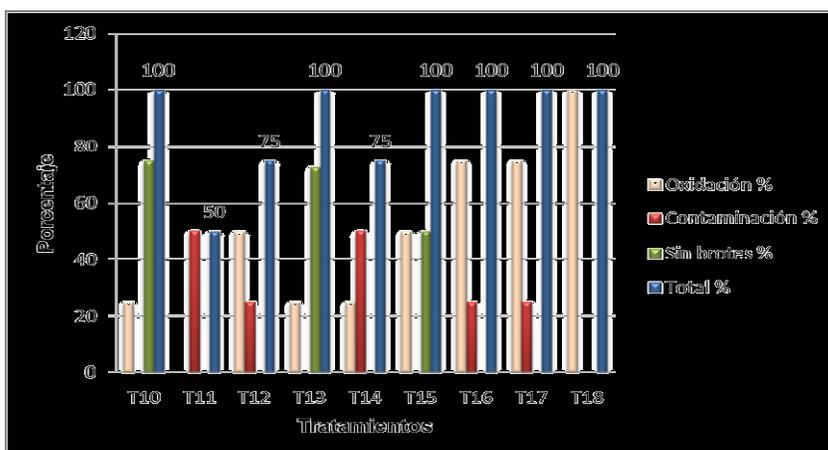


Gráfico 11. Porcentaje de pérdida por oxidación, no brotación y contaminación de yemas axilares de campo

B. FASE DE MULTIPLICACIÓN

El análisis estadístico en esta fase se realizó con los tratamientos T1 y T5 que corresponden al medio MS suplementado con 0,083 ppm de ANA y 0,25 ppm de BAP, y los tratamientos T4 y T8 que corresponden al medio MS con Vitaminas de Gamborg suplementado con 1,5 ppm de BAP y 1,5 ppm de Kinetina, con estos medios se logró la brotación y crecimiento de los explantes.

La gran variedad de especies en que se ha utilizado exitosamente el medio MS (1962), se debe particularmente al balance, muy bien proporcionado, que existe entre los elementos minerales (Tremblay y Lalonde, 1984).

Los tratamientos T2 y T6 que corresponden al medio McCown y Woody suplementado con 0,5 ppm de ANA y 0,2 ppm de BAP y 2 g/l de carbón activado no desarrollaron brotes permaneciendo los explantes como se sembraron al inicio de la multiplicación. Esto se puede deber a la baja concentración de sales minerales en el medio Woody, mientras que el medio MS es altamente salino y nitrogenado, además la deficiencia del ioduro de potasio en el medio Woody siendo considerado el K como macroelemento esencial (Zhang, 2001), lo cual pudo haber provocado efectos desfavorables al proceso de brotación de los segmentos nodales.

Estos resultados corroboran el efecto favorable del potasio como macroelemento esencial en la nutrición de las plantas, su concentración es de más del 1.0 % en la materia seca de los tejidos vegetales y desempeña un papel muy importante en la fotosíntesis, la respiración, el contenido de agua en las hojas, entre otras (Azcón-Bieto y Talón, 1996; Valdés y Balbín, 2000).

Por otra parte los tratamientos T3 y T7 que corresponden al medio MS suplementado con 0,3 ppm de ANA y 0,5 ppm de AG3 también se excluyeron por no obtener resultados. Esto posiblemente se debe a que el AG3 perdió su actividad después del autoclavado.

Al respecto, Salisbury y Ross (1994), mencionan que la giberelina de mayor uso es el GA3, pero se debe tener en cuenta por ser muy sensible al calor, pierde el 90 % de su actividad después del autoclavado. Comparado con las auxinas y citoquininas, las giberelinas se utilizan raramente.

1. Días a la brotación

El análisis de varianza (Cuadro 21), refleja diferencias altamente significativas entre los tratamientos para el factor días a la brotación a los 30 días, lo que significa que los tratamientos se comportaron de forma diferente en la multiplicación in vitro.

El coeficiente de variación fue de 22,83%, con una media de 12 días a los que empieza la brotación.

Cuadro 21. Análisis de varianza a los 30 días para la variable días a la brotación en la multiplicación in vitro de guarango.

Fuente de Variación	G. L	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor de F
Tratamientos	3	227,25	75,75	10,76**
Error	12	84,5	7,04	
Total	15	311,75		
Media			12	
C.V. %			22,83	

** Altamente significativo ($p < 0,01$)

Al realizar la prueba de Tukey al 5% para esta variable (Cuadro 22 y gráfico 12), a los 30 días de evaluación se determina tres rangos de significancia, el primer rango lo ocupa el tratamiento T4 (yemas apicales en MS con Vitaminas de Gamborg y 2 citoquininas) con una media de 8 días a los que empieza la brotación, mientras que el último rango es para el tratamiento T5 (yemas axilares en MS con ANA y BAP) en donde la brotación empezó a los 17 días posteriores a la siembra.

Se puede observar que las yemas apicales generaron brotes en menor tiempo en los dos medios de cultivo, debido a su activa división celular, mientras que las yemas axilares tardaron más tiempo en brotar.

Gran parte de las respuestas de totipotencia celular, de morfogénesis in vitro y de regeneración de plantas, ocurre en presencia de niveles apropiados de citocininas vs. auxinas (Coenen & Lomax 1997).

Cuadro 22. Separación de medias según Tukey al 5% para la variable días a la brotación en la multiplicación in vitro de guarango.

Tratamientos	Media	Grupo
T4	8	a
T1	9	a
T8	13	ab
T5	17	b

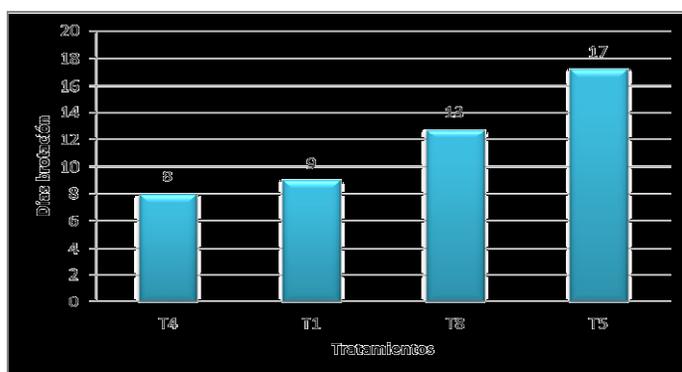


Gráfico 12. Días a la brotación en la multiplicación in vitro de guarango.

2. Número de brotes

El análisis de varianza (Cuadro 23), demuestra que no existen diferencias significativas entre tratamientos para el factor número de brotes a los 30, 60 y 90 días después de la siembra.

La media obtenida fue de 2 brotes a los 30, 60 y 90 días, lo que significa que los explantes mantienen el número de brotes con el transcurso del tiempo.

El coeficiente de variación fue de 51,96% a los 30 días, 44,49% a los 60 días y 39,54% a los 90 días. Los valores altos se debe a la variación de los datos obtenidos ya que algunos no desarrollaron brotes en el primer mes y retrasando el número de brotes en los meses posteriores, esto pudiera deberse a un fenómeno de habituación de los tejidos al crecimiento en medios de cultivo que contienen citoquininas, efecto encontrado en la caña de azúcar por Evans y Bravo, (1985) y en cafeto (*Coffea arabica* L.) por Rosales (2002).

Cuadro 23. Análisis de varianza para la variable número de brotes a los 30, 60 y 90 días de la multiplicación in vitro de guarango.

Fuente de Variación	G. L	30 días	G. L	60 días	90 días
Tratamientos	3	0,36 ns	3	1,50 ns	1,17 ns
Error	11	0,75	12	0,79	0,79
Total	14		15		
Media		2		2	2
C.V. %		51,96		44,49	39,54

ns No significativo ($p>0,05$)

3. Altura de brotes

El análisis de varianza (Cuadro 24), demuestra que no existen diferencias significativas para la variable altura de brotes a los 45, 60, 75 y 90 días de evaluación.

La media obtenida en esta variable fue de 3,42 mm a los 45 días, 3,93 mm a los 60 días, 5,13 mm a los 75 días y 6,31 mm a los 90 días, se puede observar el escaso crecimiento de los brotes con el transcurso de los días, ya que al tratarse de una especie forestal, éstas tienen un crecimiento lento comparado con especies de consistencia herbácea.

El coeficiente de variación fue de 19,13% a los 45 días, 37,58% a los 60 días, 37,99% a los 75 días y 36,66% a los 90 días.

Cuadro 24. Análisis de varianza para la variable altura de brotes a los 45, 60, 75 y 90 días de la multiplicación in vitro de guarango.

Fuente de Variación	G. L	45 días	G. L	60 días	G. L	75 días	90 días
Tratamientos	3	1,17 ns	3	1,59 ns	3	1,42 ns	2,40 ns
Error	8	0,43	11	2,20	12	3,79	5,35
Total	11		14		15		
Media		3,42		3,93		5,13	6,31
C.V. %		19,13		37,68		37,99	36,66

ns No significativo ($p>0,05$)

4. Número de nudos

Al realizar el análisis de varianza para la variable número de nudos a los 60 y 90 días (Cuadro 25), se observa que no existe diferencias significativas entre tratamientos.

La media obtenida en esta variable fue de 2 nudos a los 60 días y 3 nudos a los 90 días. Lo que significa que las altas concentraciones de BAP estimulan una mayor formación de brotes, pero estos brotes tienen poca longitud con entrenudos demasiado cortos.

El coeficiente de variación fue de 33,69% a los 60 días y 34,05% a los 90 días.

Cuadro 25. Análisis de varianza para la variable número de nudos a los 60 y 90 días de la multiplicación in vitro de e guarango.

Fuente de Variación	G. L	60 días	90 días
Tratamientos	3	0,089 ns	1,06 ns
Error	11	0,42	1,29
Total	14		
Media		2	3
C.V. %		33,69	34,05

ns No significativo ($p > 0,05$)

5. Porcentaje de pérdida de explantes

Los resultados del cuadro 26 y gráfico 13, indican el 100% de pérdida por ausencia de brotes en los tratamientos T2 y T6, mientras que los tratamientos T3 y T7 presentaron el 75 y 50% de pérdida respectivamente por la misma causa. Siendo los tratamientos T1, T4 y T8 los que no presentaron pérdida, mientras que el tratamiento T5 presentó el 25% de pérdida por contaminación bacteriana, pero esta no se expandió en el medio y permitió el crecimiento del brote.

Los resultados obtenidos indican que el medio MS sugerido por Murashige & Skoog (1962) con un balance hormonal adecuado permite el desarrollo de brotes en la multiplicación in vitro de guarango, además los métodos de desinfección realizados en la fase de introducción fueron los adecuados por lo que la contaminación en esta fase fue escasa.

Cuadro 26. Porcentaje de pérdida por contaminación y ausencia de brotes en la multiplicación in vitro de guarango.

Tratamientos	Sin brote %	Contaminados %	Total %
T1	0	0	0
T2	100	0	100
T3	75	0	75
T4	0	0	0
T5	0	25	25
T6	100	0	100
T7	50	0	50
T8	0	0	0

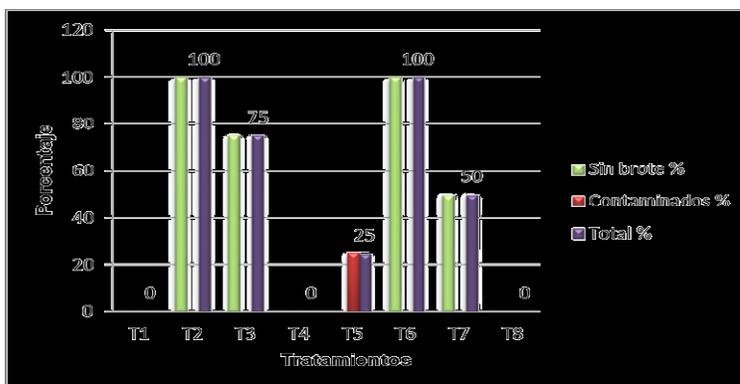


Gráfico 13. Porcentaje de pérdida por tratamiento en la multiplicación in vitro de guarango.

6. Índice de multiplicación

En el cuadro 27 y gráfico 14, se presenta el índice de multiplicación (IM) obtenido en los tratamientos que desarrollaron brotes. A los 30 días el índice de multiplicación es relativamente bajo en todos los tratamientos. A los 60 días en el tratamiento T1 (yemas apicales en MS con ANA y BAP) se obtuvo 2 vitroplantas por explante y en el tratamiento T5 que corresponde al mismo medio con yemas axilares se obtuvo 1,25 vitroplantas por explante; durante el mismo tiempo en los tratamiento T4 y T8 (yemas apicales y yemas axilares respectivamente en medio MS con Vitaminas de Gamborg con BAP y Kinetina) se obtuvo 2

vitroplantas por explante. A los 90 días el índice de multiplicación se incrementa en todos los tratamientos, pero el mayor número de vitroplantas (3,75) se obtiene en los tratamientos donde se utilizó el medio MS con Vitaminas de Gamborg suplementado con BAP y Kinetina, este índice de multiplicación se incrementa en los meses posteriores superando a los demás tratamientos en estudio (T1 y T5).

Daquinta et al., (2001) reportaron que el efecto combinado de Kinetina con BAP indujo una tasa de 2,4 a 2,6 nuevos brotes por explante en un periodo de seis semanas.

Otros resultados indican que no solamente el suplemento combinado de citocininas sino la combinación de citocininas y auxinas tiene efectos favorables en la multiplicación de especies forestales, como lo reportado por Tiwari et al., (2002) quienes observaron la mayor tasa de multiplicación en teca cultivando los explantes en medio MS con BAP y AIA.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado para la mayoría de especies forestales, las cuales por su naturaleza recalcitrante al crecimiento en condiciones in vitro son menores a otras plantas.

Cuadro 27. Índice de multiplicación (IM) in vitro en guarango.

Tratamientos	IM 30 días	IM 60 días	IM 90 días
T1	0	2	3
T4	0,5	2	3,75
T5	0,5	1,25	2,5
T8	0,25	2	3,75

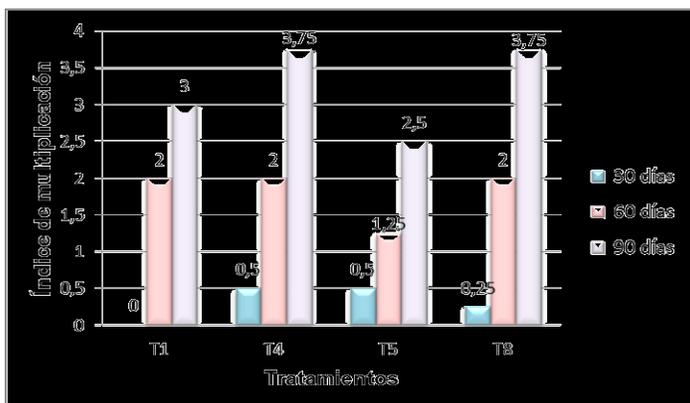


Gráfico 14. Índice de multiplicación in vitro en guarango.

C. ANÁLISIS ECONÓMICO

1. Análisis económico para explantes provenientes de invernadero.

El análisis económico se realizó mediante el método del presupuesto parcial de Perrin, tomando en cuenta los tratamientos donde se obtuvo resultados. Se definieron dos categorías de costos: los costos variables de producción y los costos fijos.

Con el fin de obtener el método de desinfección más conveniente, el análisis económico se realizó considerando los productos utilizados para la desinfección. En el cuadro 28 se puede observar los tratamientos estudiados con su rendimiento de plantas por m² correspondiente, el rendimiento ajustado al 10%, también se registra el beneficio bruto, los costos que varían y el beneficio neto; el valor unitario de planta en esta fase es de 0,95 ctv.

Cuadro 28. Costos que varían y beneficios netos US\$/m² en el establecimiento in vitro de guarango con explantes provenientes de invernadero.

Tratamientos	Rendimiento Plantas/ m ²	Rendimiento Ajustado 10%	Beneficio Bruto USD/ m ²	Total costos que varían USD/ m ²	Beneficio neto USD
T1	1576	1418,4	1347,48	817,75	529,73
T4	1182	1063,8	1010,61	817,75	192,86
T5	788	709,2	673,74	642,59	31,15

En el cuadro 29 se puede observar que el total de costos que varían osciló de US\$ 642,59 para el tratamiento T5 (Cl 75% por 7 min.) hasta US\$ 817,75 en los tratamientos T1 y T4 (doble desinfección con Cl). El beneficio neto varió de US\$ 31,15 para el tratamiento T5, hasta US\$ 592,73 por m2 en el tratamiento T1.

El análisis de dominancia se determinó según los tratamientos dominados y no dominados. Para realizar este análisis se ordenaron los tratamientos considerando los datos de costos que varían y beneficios netos, con un orden creciente de los costos que varían. Luego se identificaron los tratamientos no dominados, iniciando con el primer tratamiento que es no dominado por definición (T5), luego observamos si al pasar de un tratamiento a otro los beneficios aumentan es no dominado como sucede con el tratamiento T1 y si no aumentan es dominado como el caso del tratamiento T4.

Cuadro 29. Análisis de dominancia

Tratamientos	Beneficios netos	Total costos que varían	Análisis de dominancia
T5	31,15	642,59	ND
T1	529,73	817,75	ND
T4	192,86	817,75	D

En el cuadro 30 se muestran los tratamientos de mayor tasa de retorno marginal, destacando como el mejor tratamiento el T1 (yemas apicales desinfectadas con alcohol 75% por 1 min. Cl 75% y Cl 30% por 2 min.), el costo del tratamiento fue de US\$ 817,75 por m2 y generó un beneficio neto de US\$ 529,73 por m2, el cual incluye una tasa de retorno marginal de 284,63%, siendo económicamente el tratamiento más rentable.

Cuadro 30. Tasa de retorno marginal

Tratamientos	Total costos que varían	Incremento costos que varían	Beneficio neto (U.S.D)	Incremento beneficio neto	TRM %
T5	642,59		31,15		
T1	817,75	175,16	529,73	498,58	284,63

2. Análisis económico para explantes provenientes de campo

El análisis económico se hizo considerando los productos para desinfección y los antioxidantes utilizados. En el cuadro 31 se puede observar los tratamientos estudiados con su rendimiento de plantas por m², el rendimiento ajustado al 10%, también se registra el beneficio bruto, los costos que varían y el beneficio neto; el valor unitario de planta en esta fase es de 0,90 ctv.

Cuadro 31. Costos que varían y beneficios netos US\$/m² en el establecimiento in vitro de guarango con explantes provenientes de árboles de campo.

Tratamientos	Rendimiento Plantas/m ²	Rendimiento Ajustado 10%	Beneficio Bruto USD/m ²	Total costos que Varían USD/m ²	Beneficios Netos USD
T2	1480	1332	1198,8	690,12	508,68
T5	1558	1402,2	1261,98	749,01	512,97

En el cuadro 32 se puede observar que el total de costos que varían osciló de US\$ 690,12 para el tratamiento T2 (Alcohol 75% por 1 min. Cl 60% por 1 min. y Cl 10% por 5 min. con ácido cítrico) hasta US\$ 749,01 en el tratamiento T5 (igual desinfección que el anterior, con ácido ascórbico). El beneficio neto varió de US\$ 508,68 para el tratamiento T2, hasta US\$ 512,97 por m² en el tratamiento T5.

El análisis de dominancia se determinó según los tratamientos dominados y no dominados, siguiendo el mismo procedimiento que se realizó para explantes de invernadero.

Cuadro 32. Análisis de dominancia.

Tratamientos	Beneficios Netos	Total costos que Varían	Análisis de Dominancia
T2	508,68	690,12	ND
T5	512,97	749,01	ND

En el cuadro 33 se muestran los tratamientos de mayor tasa de retorno marginal, destacando como mejor al tratamiento T5 (yemas apicales desinfectadas con alcohol 75% por 1 min. Cl 60% por 1 min. y Cl 10% por 5 min. con ácido ascórbico), el costo del tratamiento fue de

US\$ 749,01 por m² y generó un beneficio neto de US\$ 512,97 por m², el cual incluye una tasa de retorno marginal de 7,28 %.

Cuadro 33. Tasa de retorno marginal.

Trat.	Total costos que varían	Incremento costos que varían	Beneficio neto (U.S.D.)	Incremento beneficio neto	TRM%
T2	690,12		508,68		
T5	749,01	58,89	512,97	4,29	7,28

3. Análisis económico para la fase de multiplicación.

Para el análisis económico en esta fase se consideró los medios de cultivo utilizados. En el cuadro 34 se puede observar los tratamientos estudiados con su rendimiento de plantas por m², el rendimiento ajustado al 10%, también se registra el beneficio bruto, los costos que varían y el beneficio neto; el valor unitario de planta en esta fase es de 0,90 ctv.

Cuadro 34. Costos que varían y beneficios netos US\$/m² en la multiplicación in vitro de guarango.

Tratamientos	Rendimiento plantas/m ²	Rendimiento ajustado 10%	Beneficio bruto USD/m ²	Total costos que varían USD/m ²	Beneficios netos USD
T1	1562	1405,8	1265,22	277,63	987,59
T4	1562	1405,8	1265,22	609,01	656,21
T5	1562	1405,8	1265,22	277,63	987,59
T8	1562	1405,8	1265,22	609,01	656,21

En el cuadro 35 se puede observar que el total de costos que varían osciló de US\$ 277,63 para los tratamientos T1 y T5 (MS con ANA y BAP) hasta US\$ 609,01 en los tratamientos T4 y T8 (MS con Vitaminas de Gamborg y dos citoquininas). El beneficio neto varió de US\$ 656,21 para los tratamientos T4 y T8, hasta US\$ 987,59 por m² con los tratamientos T1 y T5.

El análisis de dominancia se determinó según los tratamientos dominados y no dominados, siguiendo el mismo procedimiento que se realizó para explantes de invernadero y campo.

Cuadro 35. Análisis de dominancia

Tratamientos	Beneficios netos	Total costos que varían	Análisis de dominancia
T1	987,59	277,63	ND
T5	987,59	277,63	D
T4	656,21	609,01	D
T8	656,21	609,01	D

Al realizar el análisis de dominancia en la fase de multiplicación se obtuvo solo un tratamiento no dominado debido a lo cual no fue posible calcular la Tasa de Retorno Marginal.

VI. CONCLUSIONES

1. El mejor método para la desinfección de explantes provenientes de invernadero fue Alcohol al 75% por 1 minuto, Cloro 75% y Cloro 30% por dos minutos (T1y T4), en estos tratamientos no hubo contaminación de los explantes y se obtuvo el 44% de supervivencia. Para explantes de campo la doble desinfección cloro (60% por 1 minuto y 10% por 5 minutos) controló la contaminación y no generó daños en los tejidos de yemas apicales, mientras que para yemas axilares la desinfección con alcohol al 75% por un minuto y cloro al 75% por 7 minutos permitió disminuir la contaminación a 0% en el tratamiento T10 y 25% en el tratamiento T13.
2. El menor tiempo de brotación con explantes de invernadero fue de 8 días en el tratamiento T5(yemas axilares), sin embargo en este tratamiento se obtuvo el 50% de pérdida, mientras que con el tratamiento T1 (yemas apicales) no existió pérdida, pero el tiempo de brotación empezó a los 17 días.
3. Con el uso de antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico) no se presentó oxidación en los tratamientos T2 y T5 (yemas apicales). En el tratamiento T2 no se registró pérdida de explantes, pero en el tratamiento T5 se determinó el 25% de pérdida por contaminación. En las yemas axilares, con el tratamiento T11 se obtuvo el 0% de oxidación y el 50% de pérdida por contaminación.
4. Para la multiplicación in vitro de guarango los medios MS (ANA 0,083 ppm y BAP 0,25 ppm) y MS con Vitaminas de Gamborg (BAP y Kinetina 1,5 ppm) permitieron la brotación de los explantes tanto en yemas apicales como en yemas axilares. El menor tiempo para el inicio de la brotación se obtuvo con el tratamiento T4 (MS con Vitaminas de Gamborg) con una media de 8 días, mientras que en el tratamiento T5 (MS con ANA y BAP) la brotación empezó a los 17 días después de la multiplicación.

5. En cuanto al número de brotes, las yemas apicales y yemas axilares en los dos medios de cultivo desarrollaron un promedio de 2 brotes por explante. Los brotes obtenidos tuvieron un crecimiento lento durante el tiempo que se realizó la investigación con una media de 6,31 mm en el tercer mes, el crecimiento lento de los explantes influyó en el número de nudos alcanzando una media de 3 nudos por explante
6. La especie evaluada mostró mayor brotación en los medios MS y MS con Vitaminas de Gamborg donde no se presentaron pérdidas, mientras que en el medio WPM se evidenció el 100% de pérdida por no presentar brotes.
7. De acuerdo al análisis económico, en la fase de introducción el tratamiento T1 (yemas apicales provenientes de invernadero) es el más rentable puesto que permite obtener una Tasa Marginal de Retorno del 284,63%. En los explantes de campo el tratamiento T5 (yemas apicales) es el mejor, pero se obtiene una Tasa Marginal de Retorno baja (7,28%).

VII. RECOMENDACIONES

1. Para la desinfección de yemas apicales utilizar los tratamientos con doble desinfección en cloro puesto que controla la contaminación y no daña los tejidos, permitiendo la supervivencia de los mismos, además genera una Tasa Marginal de Retorno alta.
2. Al trabajar con especies que se oxidan fácilmente, se recomienda desinfectar las plantas madres días antes de obtener los explantes, esto ayudaría a reducir las concentraciones y tiempos del desinfectante, evitando dañar los tejidos de los explantes.
3. Para la obtención de los explantes, se debe considerar el estado fisiológico de los mismos, teniendo en cuenta que sean brotes juveniles y que no tengan las yemas despiertas, para evitar pérdidas durante la fase de introducción.
4. Para la multiplicación in vitro de guarango se recomienda utilizar el medio MS con Vitaminas de Gamborg suplementado con dos citoquinias debido a que este medio promueve el desarrollo de varios brotes laterales.
5. Con las vitroplantas obtenidas en esta investigación se debería continuar realizando ensayos de propagación hasta culminar con las fases de enraizamiento y aclimatación de las mismas.

VIII. RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Bioforesta-ESPOCH, planteando: evaluar métodos de desinfección y medios de cultivo para la multiplicación in vitro de guarango (*Caesalpiniaspinosa* Mol. O. Kuntz); en la fase de introducción se utilizó yemas apicales y yemas axilares provenientes de campo e invernadero, se realizó desinfecciones con cloro comercial (5,25% de NaOCl) y alcohol potable a 90° en diferentes tiempos y concentraciones. Los brotes obtenidos en la primera fase se segmentaron en micronudos de 0,5 a 1 cm. portando ya sea una yema apical o axilar, se sembró un explante por tubo de ensayo conteniendo los diferentes medios de cultivo. El mejor método de desinfección para explantes de invernadero fue Alcohol al 75% por 1 minuto, Cloro 75% por dos minutos y Cloro 30% por dos minutos, en estos tratamientos no hubo contaminación de los explantes y se obtuvo el 44% de supervivencia. Para explantes de campo la doble desinfección en cloro (60% por 1 minuto y 10% por 5 minutos) controló la contaminación y no generó daños en los tejidos de yemas apicales, mientras que para yemas axilares la desinfección con alcohol al 75% por un minuto y cloro al 75% por 7 minutos permitió disminuir la contaminación a 0% en el tratamiento T10 y 25% en el tratamiento T13. En la fase de multiplicación el medio MS con Vitaminas de Gamborg suplementado con 1,5 ppm de BAP y 1,5 ppm de Kinetina permitió la brotación de los explantes tanto en yemas apicales como en yemas axilares, además con este tratamiento se obtuvo mayor cantidad de brotes por explante.

IX. SUMMARY

The demand was carried out in cultivate laboratory bioforestall in ESPOCH Products from Guarango to cover the unsatisfied demand that exists at international level. The problem was the propagation from seed, it presents variability phenotypic plants, micro propagation in vitro, it allows to obtain plants with characteristics using small spaces and with massive production of plants free illnesses. The objectives were determining the disinfection methods adapted for the introduction to the system Guarango in vitro, determining the means of cultivation that allows increasing guarango in vitro carrying out the economic analysis of treatments. The methodology in this study was the analysis applied former plant of field and hothouse with clear and alcohol in different concentrations and times. The buds obtained in phase 1 segmented and were sowed in different cultivation means. As results the double disinfection in chlorine controlled the contamination of yolks fields apical, and hothouse. It maintained the survival of the same ones. In the auxiliary yolks disinfection in chlorine for 7 minutes controlled the contamination of explants. Increasing the means Murashige and Skoog (MS) with Vitamins from Gamborg supplemented with citochemistries allowed the growing explants. The means MS with vitamins of Gamborg and development of several buds for ex it plants. It concludes that this recommendation will be carried out duplicating the disinfection in chlorine in yolks apical since it doesn't generate damages fabrics; it maintains the survival the same ones and rate up marginal return is obtained. Also the means MS will be used with guarango vitamins, instead of with 2 mention-chemical because develops several buds even explants.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. ACUÑA, C. La biotecnología forestal. Documento electrónico http://www.argenbio.org/adc/uploads/imagenes_doc/planta_stransgenicas/biotecnologiaforestal.pdf. fecha de consulta 11 Febrero 2010.
2. AHUJA, M.1985. *In vitro* techniques in clonal propagation of forest tree species. In Ed. Schafer-Menuhr, A. *In vitro* techniques. Dordrecht, The Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers. p 41-48
3. Aitana Forestal NB S.L. Nuevos bosques, nueva vida. <http://www.aitanaforestal.com/info@aitanaforestal.com>. San José de Calasanz –Valencia.
4. ALVAREZ Ma. A., Cultivo in vitro de vegetales, Biotecnología (disponible en: http://www.ffyb.uba.ar/micro_ind/biotec_alim/clase Biotecnología, 2003)
5. ARIZA Vargas, Luz Aída & Diego Lozada Campos. 2004. La naturaleza se viste de color. Catálogo de especies tintóreas del bosque alto andino. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt.
6. AZCON, B. y TALON, M. 2001. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill Interamericana. España 522 p.
7. BROWN, C. y SOMMER, H. 1974. Tissue culture technique for plantlet formation and propagation difficult-to-root forest trees. Forest Research Progress, University of Georgia, E.U.
8. De la Cruz, P. 2004. Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa*. Revista del Instituto de Investigación FIGMMG 7 (14): 64-73. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
9. DIXON, R.A. 1986. *Plant Cell Culture A Practical Aproch*, I. R. L., Press Washington.

10. Equipo Forestal. 2003. Mejoramiento y Genética Forestal. Estación Experimental INTA Balcarce. Documento electrónico. http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/forest/forest_genetica.
11. GARCIA, M.; FURIO, J.; GARCIA, L.; GARCIA, M.A. y SENDRA, R. (1997). Biología y Geología. Documento: Cultivo In Vitro de Plantas, Bachillerato I, Editorial ECIR, Valencia, pp. 202.
12. GAUTHERET R., Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro*, Cap. III: pp. 108 – 127; 199 – 204; 1999, EDICIONES MUNDI – PRENSA
13. GAUTHERET, R. (1983). *Plant Tissue Culture: A History*. Bot. Mag. Tokyo, no 96, pp. 393 – 410.
14. Guarango. Documento electrónico <http://www.siac.net.co/yoscua/bin/view/Principal/CaesalpiniaSpinosa> . Fecha de consulta 08 Febrero 2010.
15. HARTMANN, H y Kester, D. 1997. Propagación de Plantas. Capítulo 16 Principios de Cultivo de Tejidos para la Micropropagación. México D.F, México. CECSSA. p.549-593.
16. HOLDRIDGE, 1982. Ecología basada en zonas de vida. Editorial IICA. San José – Costa Rica.
17. INCIARTE, M.R.; VILLA, S. Y MIGUEL G. (2001). *Biología: Biotecnología*, Bachillerato 2, Editorial Mc Graw Hill, Madrid, pp. 190 - 202,
18. IVANOVA, Z. 1981. Rapid vegetative propagation of conifers. *Scientia Horticulturae* 14: 347-355.

19. JIMENO F, A.; BALLESTEROS, V.M. y UGEDO U. L. (2000). Biología: Los genes y la ingeniería genética, Bachillerato 2, Editorial Santillana, Madrid, pp. 178 - 193.
20. KEAYS, M. 1974. Full-tree and complete-tree utilization for pulp and paper. For. Prod. J. 24: 13-16.
21. LEZCANO, M. 2006. Micropropagación masiva de plantas: El proceso innovador de la Biofábrica.
22. MARGARA, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro: Los meristemos y la organogénesis. Mundi-prensa. Madrid, España. 232 p.
23. MOTT, R.L.1981. Trees. En: Conger, B.V. (ed.). Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Florida, E.U. p. 217-254.
24. MONTOYA, H, L, M. 1991. Cultivo de tejido vegetal.
25. PIERIK, 1987. Cultivo In Vitro. Documento electrónico.
http://images.google.com/ec/imgres?imgurl=http://www.etsea2.udl.es/invitro/micropro/explant3.gif&imgrefurl=http://www.etsea2.udl.es/invitro/micropro.htm&usqDmicropropagacion%2B%2560%26hl%3Des%26lr%3Dlang_es%26sa%3DX%26um%3D1
26. PIRELA, M. y N. Mogollón. 1996. *In vitro* clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Mara-7 from stem shoots of cv.
27. RANDAL, A. y HAKE, S. 1997. Shoot meristem formation in vegetative development. The Plant Cell. 9: 1001 – 1010.

28. ROCA, W, M & Mroginski, L, A. establecimiento de un laboratorio para cultivo de tejidos vegetales. Capitulo N° 1.
29. STREET, H.E. 1977. Plant tissue and cell cultura, Sec. Ed. Academic Press., U. S. A.
30. STROSSE, H., DOMERGUE, R., PANIS, B., ESCALANT, J., CÔTE, F., Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano: pp. 5 - 31 Guías Técnicas INIBAP; 2003, Vol. NO VIII (8)
31. SWEET, G.B.1973. Effect of maturation on growth and form of vegetative propagules of radiata pine. N.Z. J. For.Sci.3: 191-210.
32. THORPE, T. A., PATE K. R., KORNEVA S. B.; MARIBONA, R.H.; et. al., Diplomado en Biotecnología. Cultivo de Tejidos (Presentaciones de curso en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL - Peñas): pp. 1 – 8; 1999
33. TRIGIANO, R. 1996. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. Chapter 21,22, CRC Press, Inc. Salem, MA. p. 184-187.
34. VALENZUELA, L. 2008. Aplicación de la biotecnología para la propagación in vitro de plantas. Documento electrónico.
http://www.lag.itesm.mx/nogatec/material/lvalenzuela_pp.pdf.
35. VASQUEZ, E. 2006. La Tara en el Ecuador (*Caesalpinia spinosa*). Cartilla Técnica.
36. VILLALOBOS A, V. M. 1980. Plantas libres de virus. Ciencia y Desarrollo, CONACYT (Mexico) 33: 35-49.

37. VILLALOBOS, M. y THORPE, A.1980. Micropropagación, conceptos, metodología, y resultados. Unidad de Recursos Fitogeneticos, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

38. VILCA, J. 2009. Taller Internacional, Mejoramiento y manejo del Cultivo de la (*Caesalpinia spinosa*) Kuntse, Guarango – Tara. Riobamba, Ecuador.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Composición de medios de cultivo utilizados en la multiplicación in vitro de guarango.

Componentes	Gamborg et al	Murashige y Skoog	Lloyd y McCown
	(1976)	(1962)	(1981)
	mg l ⁻¹		
Macronutrientes			
KNO ₃	2500	1900	—
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	—	—	556.00
NH ₄ NO ₃	—	1650	400.00
(NH ₄) ₂ ·SO ₄	134.00	—	—
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	150.00	—	—
KH ₂ PO ₄	—	170.00	170.00
K ₂ SO ₄	—	—	990.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150.00	440.00	96.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250.00	370.00	370.00
Micronutrientes			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80	27.80	27.80
MnSO ₄ ·4H ₂ O	13.20	22.30	22.30
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.00	8.60	8.60
H ₃ BO ₃	3.00	6.20	6.20
KI	0.75	0.83	—
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	0.25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	—
Na ₂ EDTA	37.30	37.30	37.30
Compuestos orgánicos			
Mioinositol	100.0	100.0	100.0
Glicina	—	2.0	—
Ácido nicotínico	1.0	0.5	0.5
Piridoxina	1.0	0.5	0.5
Tiamina	10.0	0.1	1.0
Sacarosa (g/l)	25.0	20.0	25.0

Fuente: Pierik (1990) y Gamborg y Phillips (1995).

Anexo 2. Costos fijos para la introducción al sistema in vitro de guarango.

Descripción	Unidad	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Medio MS 700 ml				
1/2 MS	gr	1,505	0,9767	1,470
Sacarosa	gr	21	0,0010	0,021
Agar	gr	4,9	0,4800	2,352
H2O destilada	ml	700	0,0012	0,829
Korso	gr	6,2	0,0170	0,105
Povidin	ml	48	0,0150	0,720
Jabón	ml	72	0,0083	0,597
Materiales				
Tubos de ensayo	unidad	96	0,16	15,360
Probeta de 1000 cc	días	1	0,071	0,071
Agitador de vidrio	días	1	0,002	0,002
Agitador magnético	días	1	0,009	0,009
Embudo de vidrio	días	6	0,007	0,042
Mango de bisturí N° 3	días	2	0,0655	0,131
Pinzas	días	2	0,3285	0,657
Hojas de bisturí N° 11	unidad	12	0,94	11,280
Espátula de laboratorio	días	1	0,068	0,068
Mechero	días	12	0,011	0,131
Termo higrómetro	días	60	0,028	1,670
Caja Petri	días	12	0,0515	0,618
Papel aluminio	unidad	1	1	1,000
Servilletas	Pk/100	1	0,45	0,450
Vaso de precipitación 500 ml	días	13	0,150	1,948
Agua potable				1,000
Energía eléctrica				10,000
Papel	unidad	24	0,01	0,240
planta invernadero	unidad	24	0,35	8,4
planta campo	unidad	36	0,15	5,4
Equipos				
Autoclave	día	1	1,23	1,230
Cámara de flujo laminar	día	1	2,22	2,220
Destilador	día	1	0,72	0,720
Balanza analítica	día	1	0,5	0,500
Peachímetro	día	1	0,24	0,240
Plato agitador	día	1	0,31	0,310
Refrigerador	día	10	0,2959	2,959
Total				72,750
Subtotal 1				72,750

Anexo 3. Costos variables por tratamiento para la desinfección de explantes de invernadero.

Tratamientos	Unidad	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Tratamiento 1				
Alcohol	ml	75	0,0024	0,18
Cloro	ml	105	0,0009	0,09
Mano de obra	minutos	50	0,0225	1,13
H2O destilada	ml	570	0,0012	0,68
Total				2,08
Tratamiento 2				
Alcohol	ml	75	0,0024	0,18
Cloro	ml	75	0,0009	0,07
Mano de obra	minutos	40	0,0225	0,90
H2O destilada	ml	400	0,0012	0,48
Total				1,63
Tratamiento 3				
Alcohol	ml	35	0,0024	0,08
Cloro	ml	60	0,0009	0,05
Mano de obra	minutos	45	0,0225	1,01
H2O destilada	ml	455	0,0012	0,55
Total				1,70
Tratamiento 4				
Alcohol	ml	75	0,0024	0,18
Cloro	ml	105	0,0009	0,09
Mano de obra	minutos	50	0,0225	1,13
H2O destilada	ml	570	0,0012	0,68
Total				2,08
Tratamiento 5				
Alcohol	ml	75	0,0024	0,18
Cloro	ml	75	0,0009	0,07
Mano de obra	minutos	40	0,0225	0,90
H2O destilada	ml	400	0,0012	0,48
Total				1,63
Tratamiento 6				
Alcohol	ml	35	0,0024	0,08
Cloro	ml	60	0,0009	0,05
Mano de obra	minutos	50	0,0225	1,13
H2O destilada	ml	455	0,0012	0,55
Total				1,81
Subtotal 2				10,93

Anexo 4. Costos variables por tratamiento para la desinfección de explantes de campo.

Tratamientos	Unidad	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Tratamiento 1				
Alcohol	ml	75	0,0024	0,18
Cloro	ml	75	0,0009	0,07
Mano de obra	minutos	45	0,0225	1,01
H2O destilada	ml	400	0,0012	0,48
Ácido cítrico	ml	3	0,0144	0,04
Total				1,78
Tratamiento 2				
Alcohol	ml	75	0,0024	0,18
Cloro	ml	70	0,0009	0,06
Mano de obra	minutos	40	0,0225	0,90
H2O destilada	ml	500	0,0012	0,60
Ácido cítrico	ml	2	0,0144	0,03
Total				1,77
Tratamiento 3				
Alcohol	ml	35	0,0024	0,08
Cloro	ml	60	0,0009	0,05
Mano de obra	minutos	60	0,0225	1,35
H2O destilada	ml	455	0,0012	0,55
Ácido cítrico	ml	3	0,0144	0,04
Total				2,08
Tratamiento 4				
Alcohol	ml	75	0,0024	0,18
Cloro	ml	75	0,0009	0,07
Mano de obra	minutos	45	0,0225	1,01
H2O destilada	ml	400	0,0012	0,48
Ácido ascórbico	ml	3	0,0600	0,18
Total				1,92
Tratamiento 5				
Alcohol	ml	75	0,0024	0,18
Cloro	ml	70	0,0009	0,06
Mano de obra	minutos	40	0,0225	0,90
H2O destilada	ml	500	0,0012	0,60
Ácido ascórbico	ml	3	0,0600	0,18
Total				1,92
Tratamiento 6				
Alcohol	ml	35	0,0024	0,08
Cloro	ml	60	0,0009	0,05
Mano de obra	minutos	60	0,0225	1,35
H2O destilada	ml	455	0,0012	0,55
Ácido ascórbico	ml	3	0,0600	0,18
Total				2,21
Tratamiento 7				

Alcohol	ml	75	0,0024	0,18
Cloro	ml	75	0,0009	0,07
Mano de obra	minutos	45	0,0225	1,01
H2O destilada	ml	400	0,0012	0,48
Total				1,74
Tratamiento 8				
Alcohol	ml	75	0,0024	0,18
Cloro	ml	70	0,0009	0,06
Mano de obra	minutos	40	0,0225	0,90
H2O destilada	ml	500	0,0012	0,60
Total				1,74
Tratamiento 9				
Alcohol	ml	35	0,0024	0,08
Cloro	ml	60	0,0009	0,05
Mano de obra	minutos	60	0,0225	1,35
H2O destilada	ml	455	0,0012	0,55
Total				2,03
Subtotal 3				17,19

Subtotal 1	72,75
Subtotal 2	10,93
Subtotal 3	17,19
Imprevistos 10%	10,09
Asistencia técnica	365
Total	475,96

Anexo 5. Costos fijos para la fase de multiplicación

Descripción	Unidad	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Pipeta graduada 2 ml	unidad	1	0,0062	0,010
Probeta de 100 cc	días	1	0,023	0,020
H2O destilada	ml	400	0,001	0,474
Papel aluminio	unidad	1	1	1,000
Papel	unidad	8	0,01	0,080
Tubos de ensayo	unidad	32	0,16	5,120
Agitador de vidrio	días	1	0,002	0,002
Agitador magnético	días	1	0,009	0,009
Mango de bisturí N° 3	días	2	0,005	0,010
Pinzas	días	2	0,027	0,054
Hojas de bisturí N° 11	unidad	2	0,9406	1,881
Espátula de laboratorio	días	1	0,068	0,068
Mechero	días	1	0,01	0,010
Termo higrómetro	días	90	0,0278	2,500
Caja Petri	días	1	0,051	0,051
Pera de 3 vías para pipeta	días	1	0,027	0,027
Vaso de precipitación	días	1	0,149	0,149
Equipos				
Autoclave	día	1	1,23	1,230
Cámara de flujo laminar	día	2	2,22	4,440
Balanza analítica	día	1	0,5	0,500
Peachímetro	día	1	0,24	0,240
Plato agitador	día	1	0,31	0,310
Refrigerador	día	5	0,296	1,480
Total				19,66
Subtotal 1				19,66

Anexo 6. Costos variables por medio de cultivo utilizado para la fase de multiplicación

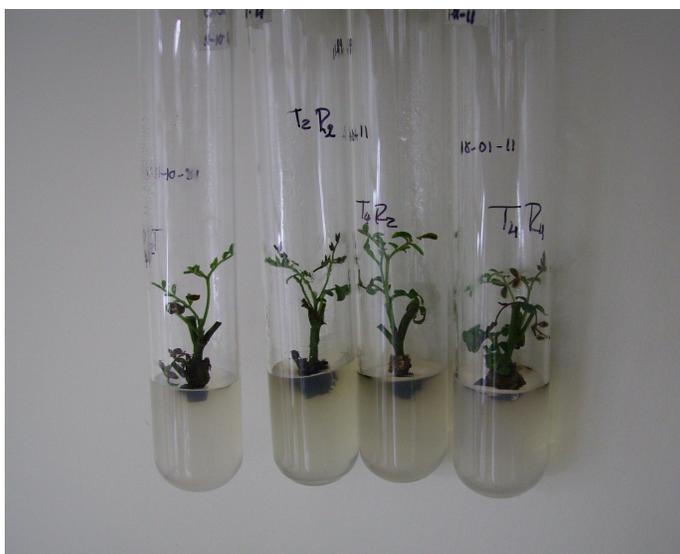
Descripción	Unidad	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Medio 1				
MS	gr	0,43	0,9767	0,41998
Sacarosa	gr	2	0,0010	0,00200
Agar	gr	0,6	0,4800	0,28800
ANA	ml	0,083	0,0002	0,00002
BAP	ml	0,25	0,0038	0,00095
Total				0,71095
Medio 2				
Woody	gr	0,23	5,0000	1,15000
Sacarosa	gr	2,5	0,0010	0,00250
Agar	gr	0,7	0,4800	0,33600
C.A	gr	0,2	0,1780	0,03560
ANA	ml	0,5	0,0002	0,00010
BAP	ml	0,2	0,0038	0,00076
Total				1,52496
Medio 3				
MS	gr	0,43	0,9767	0,41998
Sacarosa	gr	2	0,0010	0,00200
Agar	gr	0,8	0,4800	0,38400
ANA	ml	0,3	0,0002	0,00006
AG3	ml	0,5	0,0157	0,00785
Total				0,81389
Medio 4				
MS+ Vit. Gamborg	gr	0,44	2,7273	1,20001
Sacarosa	gr	2,5	0,0010	0,00250
Agar	gr	0,7	0,4800	0,33600
BAP	ml	1,5	0,0038	0,00570
K	ml	1,5	0,0102	0,01530
Total				1,55951
Subtotal 2				4,60931

Subtotal 1	19,66
Subtotal 2	4,61
Imprevistos 10%	2,43
Asistencia técnica 10%	365
Total	391,70

Anexo 7. Brotes obtenidos en la introducción al sistema in vitro de guarango.



A. Brotes de yemas apicales y yemas axilares de campo.



B. Brotes de yemas apicales y yemas axilares de invernadero.

Anexo 8. Proceso de oxidación de explantes de campo.

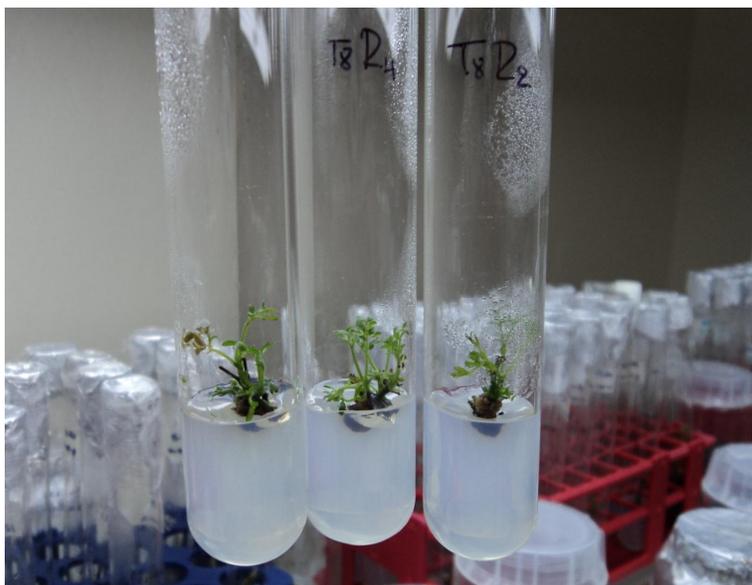


A. Oxidación de yemas axilares.



B. Oxidación de yemas apicales.

Anexo 9. Brotes obtenidos en la fase de multiplicación.



A. Brotes obtenidos a los 30 días de la fase de multiplicación.



B. Brotes obtenidos a los 90 días de la fase de multiplicación.