

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE MICROPROPAGACION IN VITRO
DE CEDRO (*Cedrela montana*) A PARTIR DE APICES, HOJAS Y
ENTRENUDOS**

REMACHE YUMI LUZ MARINA

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO
DE INGENIERA FORESTAL**

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES

ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

RIOBAMBA - ECUADOR

2011

HOJA DE CERTIFICACION

EL TRIBUNAL DE TESIS CERTIFICA QUE: el trabajo de investigación “**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE MICROPROPAGACION IN VITRO DE CEDRO (*Cedrela montana*) A PARTIR DE APICES, HOJAS Y ENTRENUDOS**”, de responsabilidad de la señorita Egresada Luz Marina Remache Yumi ha sido prolijamente revisado, quedando autorizada su presentación.

TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Jenny Núñez
DIRECTORA

Ing. Norma Erazo
MIEMBRO

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL**

Riobamba, 2011

AGRADECIMIENTO

Mi más profundo agradecimiento a nuestro padre celestial ya que gracias a Él formo parte de este mundo y cuento con una maravillosa familia, por la cual soy quien soy.

Agradezco infinitamente a mi patrocinadora y guía Ing. Jenny Núñez por haberme dado en primer lugar la oportunidad de realizar esta tesis bajo su supervisión en el (Laboratorio de Cultivo de tejidos, Centro Bioforesta). Gracias Ingeniera por su apoyo, confianza, paciencia y por haberme permitido formarme como persona y profesional bajo su cargo.

Mi gratitud a los Ingenieros Norma Erazo, Fernando Romero, Liliana Pila, Daniel Coello, por ser parte transcendental en el desarrollo y finalización de mi trabajo investigativo, por sus enseñanzas, sus consejos, su ayuda, su apoyo, sus llamadas de atención y las horas invertidas en este proyecto las cuales no fueron en vano.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, en especial a la Escuela de Ingeniería Forestal, en donde logré culminar mis estudios superiores.

A mi familia Remache Yumi, Aucancela Aucancela, amigos, mi infinita gratitud por haberme brindado su amistad sincera y su apoyo como ser humano y profesional a lo largo de mi vida universitaria y durante toda la realización de esta tesis que muchas veces pareció imposible de concluir.

Finalmente a Dios por haberme dado salud y la fuerza necesaria para vencer todos los obstáculos que se presentaron y concluir satisfactoriamente este trabajo de Tesis.

DEDICATORIA

A mi Dios todopoderoso, a la Virgen María por ser mi protectora.

Con todo el amor y cariño para mis padres Rodrigo (+), Natividad, se merecen todo mi cariño y gratitud por ser las personas que me inculcaron por el camino del bien, de lucha y perseverancias, por ser los padres mas maravillosos y de los que he tenido el mejor ejemplo de mi vida.

A mis hermanos queridos, Marcelo, Flor (+), por el apoyo brindado en toda mi vida.

A mi esposo Jorge por ser mi apoyo incondicional y enseñarme que un obstáculo no es impedimento para lograr lo que uno se propone, por sus consejos que con amor venían, en el momento y tiempo adecuado durante mi vida universitaria, también a mi hijito Jorge Rodrigo mi fuente de inspiración para concluir mi trabajo investigativo.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO	CONTENIDO	PÁGINA
	LISTA DE CUADROS	ii
	LISTA DE GRAFICOS	iv
	LISTA DE ANEXOS	v
I.	TITULO	1
II.	INTRODUCCIÓN	1
III.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
V.	RESULTADOS Y DISCUSION	34
VI.	CONCLUSIONES	49
VII.	RECOMENDACIONES	51
VIII.	RESUMEN	52
IX.	SUMARY	53
X.	BIBLIOGRAFÍA	54
XI.	ANEXO	59

LISTA DE CUADROS

NÚMERO	CONTENIDO	PÁGINA
1.	Condiciones ambientales registradas durante el experimento (marzo 2010 - abril 2011).	17
2.	Tratamientos para la desinfección de ápices y entrenudos de cedro.	19
3.	Análisis de varianza (ADEVA) para ápices y entrenudos de cedro	20
4.	Tratamientos para la desinfección de hojas de cedro.	21
5.	Análisis de varianza (ADEVA) de hojas de cedro	22
6.	Medio de cultivo para la fase de introducción al sistema in vitro o desinfección de explantes de cedro.	23
7.	Protocolos de desinfección de explantes provenientes de invernadero ápices y entrenudos.	24
8.	Protocolos de desinfección de hojas provenientes de invernadero	25
9.	Tratamientos en estudio en la fase de multiplicación de cedro	27
10.	Análisis de varianza (ADEVA) para la fase de Multiplicación de cedro.	28
11.	Medios de cultivo para multiplicación in vitro de cedro	32
12.	Análisis de varianza para la variable tiempo de brotación a los 30 días de la introducción al sistema in vitro.	34
13.	Separación de medias según Tukey al 5% para el Factor A	35
14.	Separación de medias según Tukey al 5% para el Factor B	35
15.	Porcentaje de explantes contaminados	36
16.	Tasa de pérdida en la introducción al sistema in vitro.	38

17.	Análisis de varianza para la variable tiempo de brotación a los 30 días fase de multiplicación.	40
18.	Separación de medias según Tukey al 5% para los factores tipo de explantes y medios de cultivo en la variable tiempo de brotación a los 30 días.	40
19.	Análisis de varianza para la variable altura brotes a los 15, 30, 45, 60 y 90 días.	42
20.	Análisis de varianza para la variable número de nudos a los 15 días y a los 30, 45, 60 y 90 días	43
21.	Índice de multiplicación in vitro de cedro	44
22.	Costos que varían y beneficios netos USD/m ² en la introducción al sistema in vitro o desinfección de explantes	45
23.	Análisis de dominancia	46
24.	Tasa de retorno marginal	46
25.	Costos que varían y beneficios netos USD/m ² en la multiplicación in vitro.	47
26.	Análisis de dominancia	48
27.	Tasa de retorno marginal	48

LISTA DE GRAFICOS

NÚMERO	CONTENIDO	PÁGINA
1.	Porcentaje de explantes contaminados.	37
2.	Tasa de pérdida en la introducción al sistema in vitro.	38
3.	Comportamiento entre los factores tipo de explantes y medios de cultivo para la variable tiempo de brotación a los 30 días.	41

LISTA DE ANEXOS

NÚMERO	CONTENIDO	PÁGINA
1.	Plántulas de cedro en invernadero de 3 meses de edad	59
2.	Explantes listos para la introducción al sistema in vitro	59
3.	Explantes contaminados	60
4.	Explantes introducidos al sistema in vitro	60
5.	Tipos de medios de cultivo en la fase de multiplicación	60

I. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE MICROPROPAGACION IN VITRO DE CEDRO (*Cedrela montana*) A PARTIR DE APICES, HOJAS Y ENTRENUDOS.

II. INTRODUCCIÓN

Ecuador es el país que tiene la tasa más alta de deforestación, la misma que registró a nivel nacional, en los años 1990-93, en 100.000-300.000 hectáreas anuales (Stewart *et al.*, 1995). Las estimaciones varían ampliamente entre un mínimo de 75.000 hectáreas anuales DINAF 1988, y un máximo de 400.000 hectáreas/año Banco Mundial 1985, pasando por una cifra intermedia de 250.000 (Synnott, 1988/ Cit. por Mckenzie, 1994). Se considera que en la región de la Costa se ha deforestado más del 90% del bosque original, en tanto que en el Oriente se lleva deforestado el 30% (Sierra, 1996).

Tal situación, está provocando daños a los bosques nativos es reflejada la desaparición de muchas especies, entre ellas, el “Cedro” (*Cedrela montana*). Este árbol es de gran interés económico, por su madera fina es una de las más utilizadas en la actualidad, sobre todo en la fabricación de muebles, gabinetes, ebanistería, instrumentos musicales, lo que ha ocasionado una explotación intensiva y no controlada, poniéndolo en peligro de extinción.

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

Los primeros trabajos de cultivo de tejidos en *Cedrela odorota* se iniciaron en 1989 por Ishii y Maruyama, mediante el uso de ápices lograron obtener gran cantidad de plántulas. En 1997 se obtuvo semilla artificial de cedro, encapsulando los ápices obtenidos por micropropagación (Maruyama *et al* 1997/Cit. por Muñoz, 2003). En el informe se menciona que la embriogénesis somática es la técnica apropiada para la rápida micropropagación a gran escala y para la tecnología de semilla artificial, no obstante, esta técnica no puede ser usada en muchas especies, en que la embriogénesis somática no ha sido producida, incluyendo a *Cedrela odorota*.

A. JUSTIFICACION

La mayoría de especies forestales nativas no han sido objeto de estudios de cultivo in vitro, por ser organismos silvestres, que exhiben una gran variabilidad genética. Además, sus características propias, por ejemplo, sus largos periodos de vida y gran tamaño, hace más difícil el mejoramiento genético, en comparación con los cultivos agrícolas.

La madera de cedro es muy apetecida en el mercado y se comercializa a precios muy elevados. *Cedrela montana* es una especie nativa de la cordillera de los Andes del Ecuador se han identificado en Penipe y Palitagua en la provincia de Chimborazo, según el Ministerio del Ambiente 2002.

Existe gran demanda de semillas y plantas en el mercado, pero existe pocas fuentes semilleras, por lo que el cultivo in vitro permite multiplicarla masivamente a esta importante especie a través de herramientas biotecnológicas.

B. OBJETIVOS

1. Objetivo General:

Desarrollar una técnica de micropropagación in vitro de cedro (*Cedrela montana*) a partir de ápices, hojas y entrenudos.

2. Objetivos Específicos:

- a.** Determinar el protocolo para el establecimiento in vitro de cedro (*Cedrela montana*) a partir de ápices, hojas y entrenudos.
- b.** Determinar el medio de cultivo más eficiente para la multiplicación de cedro (*Cedrela montana*) a partir de ápices y entrenudos.
- c.** Evaluar económicamente los costos de producción in vitro de esta especie de acuerdo a Perrín.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. EL CEDRO.

1. Clasificación Taxonómica

De acuerdo a (Cronquist, 1982) el cedro se clasifica de la siguiente manera:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsidae

Sub clase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Meliáceae

Género: Cedrela

Especie: montana

Nombre Científico: *Cedrela montana* Moritz Ex Turcz.

Nombre común: cedro, cedro andino, cedro colorado.

2. Datos históricos

El nombre del cedro fue puesto por los españoles por la fragancia de la madera similar a la de los cedros (*Cedrus* sp.) del viejo mundo. La madera fue mas conocida, inicialmente porque con ella se elaboran las cajas para la venta de cigarros. El cedro (*Cedrela montana*), se describió en 1680 y es la misma especie identificada también como *C. rosei*, *C. bogotensis* y *C subandina*. Se encuentra en Venezuela, Colombia, Ecuador. (Lojan, 2003).

3. Hábitat

Es parte del bosque húmedo primario o intervenido. Se regenera naturalmente. Requiere suelos fértiles para desarrollarse en condiciones óptimas. (Lojan, 2003).

Cedro (*Cedrela montana*), se encuentra en el Ecuador desde los 1500 hasta los 3500 msnm lo ubica en el bosque de neblina montano equivalente a bosque húmedo montano, entre 1800 – 3000 msnm y 500 a 1000mm de lluvia. También crece en la faja montana con lluvia anual entre 1000 y 2000 mm. (Sierra, 1999).

El cedro crece en bosques secos de la sierra y en bosque húmedos de ambas vertientes, desde los 2300 hasta los 3300 msnm. Fuera de su habitat se lo observa como árbol ornamental en algunos parques urbanos de la Sierra. (Lojan, 2003).

4. Usos e importancia

Su madera es suave y liviana, fácil de trabajar con un peso específico de 0.36. En condición seca la albura es de color gris anaranjado y el duramen anaranjado rojizo claro, con olor característico debido a la presencia de aceites y resinas. Su fina madera es una de las más utilizadas en la actualidad, sobre todo en la fabricación de muebles, gabinetes, ebanistería instrumentos musicales y construcciones en general muy utilizada en la fabricación de guitarras. (Creemers, *et al.*, 1981).

La madera es muy apreciada por su calidad, es de color rosada o castaña en el duramen, con venas longitudinales. El color de la madera es mas rojiza que la del cedro costeño *C. odorata*. La madera del cedro se la utiliza para la elaboración de muebles finos, construcción de puertas, marcos de ventanas y decoración interior. En san Antonio de Ibarra se elabora con la madera de cedro todo tipo de muebles tallados y artesanías; más del 80% de la población se dedica a esta actividad y la demanda de madera es alta. En Colombia, se usa la corteza para laboratorios de úlceras y el lavado bucal contra el dolor de muelas. Adicionalmente presta un servicio ambiental y estético, por ello se lo planta en los parques urbanos. (Lojan, 2003).

5. Problemas y limitantes del cedro

Cedro (*Cedrela montana*) Es una especie forestal que está incluida en la lista de especies de prioridad, razón por la cual la conservación, estudios de la variabilidad

genética, propagación y uso sostenible de esta especie cobra especial importancia. Esta especie tiene una madera de gran valor en el mercado, y por su sobre explotación existen pocas alternativas para recuperar en el corto plazo una riqueza genética. Los ensayos para establecer en gran escala plantaciones puras de cedro han fallado en el país debido al ataque de la plaga *Hypsipyla grandella* lepidóptero barrenador de yemas, que constituye una de las plagas forestales más severas que reduce el valor comercial de la madera. (FAO, 1994).

Cedro (*Cedrela montana*) Es una de las especies de la familia Meliáceas citada entre las más valiosas del mundo, sin embargo debido a las talas selectivas y la falta de tecnologías para su reproducción ha sufrido una sobre explotación no compensada con programas para su reproducción sus poblaciones naturales se reducen naturalmente y es más difícil encontrar con diámetros de valor comercial. (FAO, 1994).

B. MICROPROPAGACIÓN

1. Cultivo de tejidos

Es el sistema de propagación vegetativa más recientemente implementada, pero por razones de costo no ha desplazado el uso de los sistemas tradicionales especialmente en árboles forestales; cuya reproducción masiva en viveros es más ventajosa desde un punto de vista económico. Estas técnicas modernas son un buen complemento de la producción de plantas en vivero, al permitir producir un material de alta calidad genética que podrá ser reproducido en forma masal, por semilla. (Gonzales, *et al.*, 1998).

El cultivo de tejidos consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeños de ellas, como son los tejidos o células, cultivadas asépticamente en recipientes de vidrio en donde se pueden controlar estrictamente las condiciones ambientales, sanitarias y de nutrición. (Gonzales, *et al.*, 1998).

La micropropagación de especies arbóreas ofrece una vía rápida de producir a nivel industrial o semiindustrial plantas clonales para reforestación, producción de biomasa leñosa y conservación de germoplasma elite y raro. La biotecnología es una alternativa para la preservación de especies aumenta la de multiplicación de plántulas para suplir la demanda comercial. (Gonzales,, *et al.*, 1998).

El cultivo *in vitro* consiste en tomar un trocito de hoja, un embrión, una porción pequeña de tallo (de 0,2 a 1 milímetro) o cualquier otra parte de una planta y ponerla a cultivar en un tubo de ensayo sobre un medio acuoso nutritivo. Lo fundamental es que se hace en condiciones muy controladas y totalmente estériles: utensilios, cámara de manipulación, todo está desinfectado en autoclave. (Muñoz, 2003).

2. Medio de cultivo

Es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos , vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias. (Suarez, 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 autotróficos cuando se desarrollan en estas condiciones. (Suarez, 2003).

Los medios de cultivo más frecuentemente usados para la producción de brotes en angiospermas son WP Woody Plant, y MS murashige & skoog suplementado con BAP (bencilamino purina). Cambiando los nutrientes del medio de cultivo se puede alterar el porcentaje de explantes que formen brotes adventicios y/o el número de brotes adventicios o vástagos. Medios con baja calidad de sales como el WP Woody Plant, 1970 y GD Gresshoff & Doy, 1972 incrementan algunas veces el porcentaje de enraizamiento de brotes axilares en árboles. (Thorpe, 1991).

3. Reguladores de crecimiento

Generalmente es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberilinas o ácido abscísico, para mejorar el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos. Por otro lado, los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo *in vitro*. (Pierik, 1990).

a. Auxinas

Se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros. En cultivo *in vitro* las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: IBA (ácido indol-3-butírico), NAA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El IBA y el NAA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio. (Pierik, 1990).

b. Citoquininas

Las citoquininas se asocian con los procesos de división celular. La producida artificialmente tiene propiedades análogas a las naturales. La zeatina es un citoquinina natural extraída de la semilla de maíz pero esta un costo muy alto. (Gutiérrez *et al.*, 2003).

En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas más usadas son: BAP (bencilamino purina), kinetina y 2-ip (isopentenil-adenina). Generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. (Pierik, 1990).

4. Técnicas de propagación a partir de ápices

a. Cultivo de meristemas

Esta técnica es muy importante para la reproducción masiva de clones y de material vegetal genéticamente estable y para la reproducción de plantas libres de virus. También se utiliza la quimioterapia aplicando sustancias específicas para alterar el mecanismo de síntesis de los virus. La técnica se complementa y da mejores resultados si se aplica en plantas que van ser cultivadas en viveros donde hay un mejor control de las condiciones ambientales, lo que disminuye el riesgo de recontaminación. (Gutiérrez *et al.*, 2003).

1. Meristemas apicales y laterales

En el caso del alargamiento de las yemas axilares, este método utiliza ápices principales, brotes laterales y segmentos nodales, e involucra la multiplicación de brotes preformados, generalmente sin la formación de algún callo, produciendo en general, cultivos genéticamente estables. Este método genera el menor número de plantas, ya que el número de brotes producido es limitado por el número de brotes axilares sembrados en el medio de cultivo. (Muñoz, 2003).

Se han usado los cultivos de puntas de brotes y de meristemas de muchas otras plantas, para obtener mantener y multiplicar los materiales genéticos de una punta de brotes o de un explante, en algunos casos, se regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples, en cada uno de estos casos se espera a menudo lograr la formación de ramas axilares que puedan separarse y enraizarse; teóricamente los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se sub cultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo. Por lo tanto el método es bueno para poder obtener una rápida multiplicación clonal, y se aplicado a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas. (Styer *et al.*, 1983).

2. Cultivo de hojas

Se ha practicado el cultivo in vitro de órganos muy inmaduros, como son las secciones de hojas, estos experimentos se han realizado en helechos y angiospermas. El objetivo de estos cultivos ha sido el conocer hasta donde se llega en el desarrollo normal de dicho órgano en condiciones in vitro y que propiedades del medio contribuyen a su desarrollo. Con este cultivo se ha logrado cierto éxito. Sin embargo aún se tienen grandes incógnitas o interrogantes sobre los nutrientes y los estímulos hacia el órgano in situ y lo que puede ser dado y asimilado en el cultivo in vitro. (Hurtado *et al.*, 1983).

5. Fases de propagación in vitro

Dentro del proceso de micropropagación se pueden diferenciar varias fases o etapas:

a. Fase 1 Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas

Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donante de yemas, durante un período que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. (Ortiz *et al.*, 1998). En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades. (Pierik, 1990).

Se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces o semillas. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente.

Una vez desinfectado el material vegetal, se trabaja en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un

tubo de cultivo conteniendo medio de cultivo para poder controlar la sanidad y la viabilidad. (Pierik, 1990).

La desinfección del material se realiza con hipoclorito de sodio, agua clorada comercial, peróxido de hidrogeno, nitrato de plata alcohol, pura o diluída durante diferentes períodos de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada. (Murashige, 1974).

b. Fase 2 Introducción del material seleccionado in vitro.

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro. (Pierik, 1990).

c. Fase 3 Multiplicación de brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron de la fase 1 originen brotes de procedencia axilar o adventicia con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben sub cultivar 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, 1990).

Los tubos son llevados al cuarto de incubación en condiciones ambientales controladas del cuarto de incubación, donde se obtiene yemas axilares, yemas apicales en promedio/micronudo. (Gonzales, *et al.*, 1998).

6. Condiciones del cultivo in vitro

En la cámara de flujo laminar no puede entrar material contaminado. El problema más importante en todo el proceso del cultivo in vitro son las contaminaciones. En el autoclave no se pueden meter determinadas sustancias, como vitaminas, antibióticos,

ácido giberélico, sacarosa, encimas, extractos vegetales, etc., ni tampoco recipientes que no soporten altas temperaturas. El vidrio a de ser de muy buena calidad para que no suministre al medio, sustancias contaminantes para la planta. Normalmente se prepara el medio y se filtra directamente. El problema es que se absorben en el filtro determinadas sustancias. (Morales, 2002).

Los reguladores de crecimiento hormonas son imprescindibles, ya que sin ellos no se puede hacer el medio de cultivo. El pH ideal es 6, pero puede oscilar entre 5,5 y 6,5. Se necesita agar y medio sólido 0,6-0,9%. El medio de cultivo realmente sólo tiene que llevar agua, fuente de energía azúcares y reguladores de crecimiento. (Pierik, 1990).

El éxito de esta técnica de propagación también influyen determinadas características de la planta, como el tipo, genética e incluso el tipo de implante, parte más juvenil o más adulta. (Morales, 2002).

a. 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. La temperatura de incubación que oscilan entre los ± 20 y 28° (Marín *et al.*, 1997).

b. 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:

c. Horizontales: la batería de fluorescentes se coloca 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. (Marín *et al.*, 1997).

d. 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. (Marín *et al.*, 1997).

e. La contaminación se puede definir como la introducción accidental de microorganismos (bacterias, hongos, algas), vectores y fuentes patogénicas indeseables, donde se incluyen contaminantes patógenos y no patógenos. (Kubota y Tadokoro. 1999).

Sin embargo, las plantas *in vitro* se consideran como cultivos estériles por lo que la presencia de éstos microorganismos ha llevado a científicos a debatir ésta idea y definirlos mas bien como cultivos asépticos (Herman, 1990).

Existen entradas de contaminantes en las diferentes etapas en el proceso como en el caso de la introducción del material de campo donde la contaminación es propia de la planta. A la vez también existen introducciones accidentales como en la preparación de medios, o en el subcultivo de plantas los cuales son los momentos en que se abren los frascos y quedan expuestos, a su vez que una ineficiente técnica aséptica por parte de los operadores puede introducir los contaminantes. Los cultivos más viejos almacenados en el cuarto de crecimiento sufren contaminaciones de hongos (Leifert *et al.* 1991).

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, propagación clonal masiva de plantas

libres de enfermedades en corto tiempo, mantiene el cultivo libre de plagas enfermedades, porque se requiere mucha asepsia. (Gonzales, *et al.*, 1998).

Reduce costos de labores agronómicas en el mantenimiento de germoplasma en el campo, multiplicación en cualquier época del año porque se trabaja en condiciones ambientales controladas, conservación de material genético en vías de extinción. (Mejía, 1994).

8. Desventajas del cultivo in vitro

Requiere de personal especializado, requiere infraestructura y equipos especiales, La adquisición de productos químicos es costosa y difícil especialmente en países con pocos recursos, Difícil de instalar laboratorios “in vitro” donde no exista fluido eléctrico, La escasa literatura relacionada al cultivo “in vitro” de especies forestales, Difícil respuesta inicial de algunas especies o genotipos. (Mejía R, 1994).

Generalmente se requiere de 1 a 1.5 años para adecuar las condiciones a cada especie o genotipo. Los problemas que presenta el cultivo in vitro es: la contaminación es grave y vitrificación es una reacción de las plantas que las hace adquirir apariencia de vidrio. La única solución es hacer un subcultivo de material sano, es decir, se saca y se cortan los trocitos que estén bien. (Gonzales, *et al.*, 1998).

C. CULTIVO DE TEJIDOS DE ESPECIES FORESTALES

Dentro de las especies leñosas, las más extensivamente estudiadas en los últimos años han sido las forestales, especialmente los maderables por su gran valor comercial. ((Roca *et al.*, 1991).

Los programas de mejoramiento genético tradicionales en especies forestales no han tenido repercusiones trascendentales en la urgente necesidad de reforestación o de acortar el tiempo de obtener rentabilidad en las producciones comerciales, debido

principalmente al largo ciclo de estas especies desde la siembra de la semilla hasta la floración. (Pérez, 2004).

Las técnicas de micropropagación han demostrado ser una importante alternativa para la solución de algunos de los problemas anteriormente referidos. El método de diferenciación de brotes adventicios es más común que la embriogénesis somática, y tiene mayor potencialidad para una propagación masiva que el estímulo de las yemas axilares. Actualmente son pocos los antecedentes que muestren un éxito de la embriogénesis somática en especies forestales. (Roca *et al.*, 1991).

Con respecto a la producción de brotes adventicios, el proceso involucra la inducción de tejido meristemático localizado por tratamiento con fitohormonas, determinándose la diferenciación del primordio y el desarrollo de los brotes. Usualmente involucra la formación de un callo, respondiendo al efecto de las citoquininas en tejido meristemático como el cambium. Es posible la producción de brotes adventicios en especies leñosas a partir de callos, pero es extremadamente difícil en las coníferas. La ruta mayormente utilizada para la regeneración *in vitro* de especies arbóreas, es un proceso que consiste en el establecimiento del cultivo y/o inducción, desarrollo, multiplicación, enraizamiento de los brotes. (Thorpe, 1991).

Los explantes juveniles como los embriones cigóticos, cotiledones, hipocótilos o yemas de plántulas y hojas juveniles tienen mejor respuesta al cultivo *in vitro* que otros tejidos de árboles adultos. Por esta razón los explantes juveniles han sido exitosamente empleadas para la clonación forestal.

En el caso de *Cedrela odorata* reportaron la producción de múltiples brotes usando el medio WP Woody Plant, suplementado exclusivamente con BAP 2 mg/l para lograr la formación de múltiples brotes, disminuyéndose al décimo la concentración de citoquinina con el fin de elongar los mismos en ambas especies. Finalmente el enraizamiento de las plántulas formadas se logra usando el efecto sinérgico de dos auxinas sintéticas IBA y ANA en un medio WP con la mitad de la concentración de sales. (Ishii *et al.*, 1992).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR.

1. Localización

La investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Bioforesta de la Facultad de Recursos Naturales, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. (ESPOCH) Parroquia Licán, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2. Ubicación geográfica.¹

Longitud 78°46'50'' W

Latitud 01°38' 51' Sur.

Altitud 2820m.s.n.m.

3. Características Climáticas

Temperatura promedio: 13.4° C.

Precipitación anual: 763.8 mm.

Humedad relativa: 66 %.

4. Características cuarto de crecimiento²

Temperatura promedio: 21 ± 2°C.

Humedad relativa: 60 70%.

Fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad

¹ Estación Agro meteorológica ESPOCH, Anuario Climatológico 2008.

² Muñoz, 2003

Cuadro 1. Condiciones ambientales registradas durante el experimento (marzo 2010 - abril 2011).

Parámetros	Invernadero	Laboratorio
Temperatura máxima promedio	31 °C	28,4 °C
Temperatura mínima promedio	19 °C	21,3 °C
Temperatura media	25 °C	24,9 °C
Humedad relativa máxima	62 %	67 %
Humedad relativa mínima	42 %	61 %
Humedad relativa media	52 %	64 %
Fotoperíodo	12/12 horas	16 horas luz y 8 horas oscuridad

B. MATERIALES

1. Material Vegetal

Plántulas de 3 meses de edad germinadas en invernadero.

2. Material de laboratorio.

Magentas, mecheros, pipetas, probetas, frascos, bandejas de plástico, algodón, bisturí, espátulas, tubos de ensayo, servilletas vasos de precipitación.

3. Equipos

Agitador magnético, autoclave, balanza analítica, cámara de flujo laminar, cámara de cultivo, cámara fotográfica, destilador, termómetro de máxima y mínima, pH-metro.

5. Reactivos

Medio basal Murashige & Skoog mixture (MS), Marca Sigma, woody mc cowm (WP), Marca Sigma, ácido naftalenacético (ANA), Marca Sigma, benzilaminopurina (BAP), Marca Sigma, kinetina, agar ash2 -4%, Marca Sigma, agua destilada, alcohol potable a 96°C, cloro comercial, carbón activado, Marca Sigma hidróxido de sodio, etanol.

C. METODOLOGÍA.

La presente investigación se realizó en dos fases:

PRIMERA FASE: Introducción al sistema in vitro de ápices y entrenudos.

1. Factores en estudio explantes del cedro ápices y entrenudos

a. Factor A. Tipo de explantes

a1: ápices

a2: entrenudos

b. Factor B. Protocolos de desinfección

Se plantearon tres protocolos de desinfección en base a recomendaciones del laboratorio Microplant – Quito, Ing. Pila L. (2010).

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

Protocolo 2: Alcohol 75% por 1 minuto; cloro comercial 50% por 2 minutos + cloro comercial 20% por 3 minutos.

Protocolo 3: Alcohol 75% por 1 minuto; cloro comercial 75% por 3 minutos + cloro comercial 10% por 5 minutos.

c. Tratamientos en estudio

Los tratamientos resultarán de la combinación de los factores en estudio que se especifican en el (cuadro 2), fueron 6 tratamientos que corresponden a explantes de cedro ápices y entrenudos.

Cuadro 2. Tratamientos para la desinfección de explantes de cedro.

Tratamiento	Código	Descripción
T1	a1b1	Ápices, protocolo 1
T2	a1b2	Ápices, protocolo 2
T3	a1b3	Ápices, protocolo 3
T4	a2b1	Entrenudos, protocolo 1
T5	a2b2	Entrenudos, protocolo 2
T6	a2b3	Entrenudos, protocolo 3

d. Unidad de observación

La unidad de observación estuvo constituido por un tubo de ensayo de 20mm de diámetro x 150mm de longitud conteniendo 7ml 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 la investigación experimental se utilizo un diseño completamente al azar (D C A) con arreglo combinatorio bifactorial 6 X 4 para los cuales se utilizo 6 tratamientos con 4 repeticiones.

a) Especificaciones

Tratamientos	6
Repeticiones	4
Unidades Experimentales	24

b) **Análisis estadístico.**

Cuadro 3. Análisis de varianza (ADEVA) para ápices y entrenudos de cedro

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

c) **Análisis funcional**

Se realizó la prueba de Tukey al 5% para todas las variables que presentaron diferencias significativas y el cálculo de coeficiente de variación se expuso en porcentaje.

d) **Análisis económico**

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

2. **Factores en estudio hojas de cedro**

a. **Factor A. Tipo de explante**

a1. Hojas

b. **Factor B. Protocolos de desinfección**

Protocolo 1: Alcohol 75% por 30 segundos; cloro comercial 75% por 2 minutos.

Protocolo 2: Alcohol 75% por 30 segundos; cloro comercial 50% por 3 minutos.

Protocolos 3: Alcohol 75% por 30 segundos; cloro comercial 10% por 5 minutos.

c. Tratamientos en estudio

Los tratamientos resultaron de la combinación de los factores en estudio, fueron 3 tratamientos que corresponden a hojas de cedro.

Cuadro 4. Tratamientos para la desinfección de hojas de cedro.

Tratamiento	Código	Descripción
T1	a1b1	Hojas, protocolo 1
T2	a1b2	Hojas, protocolo 2
T3	a1b3	Hojas, protocolo 3

d. Unidad de observación

La unidad de observación estuvo constituido por un tubo de ensayo de 20mm de diámetro x 150mm de longitud conteniendo 7ml de medio de cultivo contenía una hoja en estudio.

e. Diseño experimental.

1) Tipo de diseño

Para la investigación experimental se utilizo un diseño completamente al azar (D C A) con arreglo combinatorio bifactorial 3 X 4 para los cuales se utilizo 3 tratamientos con 4 repeticiones.

a) **Especificaciones**

Tratamientos	3
Repeticiones	4
Unidades Experimentales	12

b) **Análisis estadístico.**

Cuadro 5. Análisis de varianza (ADEVA) de hojas

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	2
Error	9
Total	11

D. VARIABLES Y METODOS DE EVALUACION

1. **Tiempo de brotación**

Esta variable se evaluó con observaciones diarias de las muestras y se determinó el crecimiento de los brotes a partir de la siembra hasta los 30 días.

2. **Porcentaje de explantes contaminados.**

Se determinó el porcentaje de contaminación con observaciones frecuentes de las muestras a partir de la siembra hasta los 15 días después de la siembra. Se registro los explantes contaminados de acuerdo a la formula de (Cárdenas, 2011).

$$\% \text{ Contaminación} = \frac{\text{explantes contaminados}}{\text{total de explantes}} \times 100$$

3. Tasa de pérdida

Se contabilizo el número de explantes contaminados, número de explantes muertos que presento a los 15 días a partir de la siembra se utilizo la siguiente formula. (CONIF, 2005)

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

E. MANEJO DEL EXPERIMENTO

1. Preparación del medio de cultivo

Se preparó 300 ml del medio de cultivo, se peso el medio Murashige y Skoog (MS), sacarosa, agar luego aforamos, el pH se ajusto a 5.6 de acuerdo al rango de (Suarez, 2003), se puso en agitación hasta que llegue al punto de ebullición, después se distribuyó 7ml de medio de cultivo en cada tubo de ensayo se taparon con papel aluminio y se colocaron en el autoclave a 15 libras presión (psi) a 121 °C por 15 minutos posteriormente se sacó, se dejo que se enfrié y se colocó en refrigeración.

Cuadro 6. Medio de cultivo para la fase de introducción de explantes in vitro.

Medio basal	Sacarosa	Agar
½ MS 4,3g/l	30 g/l	7 g/l

Fuente: Según la recomendación Técnico Microplant Ing. Pila L. (2010)

2. Selección de explantes de invernadero

Se utilizó plántulas crecidas en invernadero de 3 meses de edad, de las cuales se escogió al azar, ápices, hojas y entrenudos.

a. Desinfección de explantes

El material vegetal fue desinfectado por 15 días con fungicida comercial dentro del invernadero, antes de ingresar al laboratorio; luego con la ayuda de un bisturí se cortaron explantes de 2cm de longitud con porción de tallo con una yema apical y axilar procedente de las plantas de invernadero. Se desinfectaron por separado yemas apicales y axilares, se lavaron los explantes con agua potable y jabón, se enjuagó con agua estéril este proceso de desinfección se realizó previo al ingreso de la cámara de flujo laminar.

El proceso de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar, el material vegetal se sumergió en alcohol potable al 75% por un minuto luego en cloro comercial a diferentes tiempos, como se detalla en el siguiente (cuadro 5) finalmente se realizaron 3 a 4 enjuagues con agua destilada estéril.

Cuadro 7. Protocolos de desinfección de explantes provenientes de invernadero ápices y entrenudos.

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
ápices y entrenudos	Jabón	1 minuto	1	Alcohol	75%	1 minuto
	Fungicida	10 minutos		Cloro comercial	75%	7 min.
	Povidin	10 minutos	2	Alcohol	75%	1 minuto
				Cloro comercial	50%	2min.
				Cloro comercial	20%	3 min.
			3	Alcohol	75%	1 minuto
				Cloro comercial	75%	3 min.
				Cloro comercial	10 %	5 min.

1. Fuente: Según la recomendación Técnico Microplant Ing. Pila L. (2010)

2. Fuente: Según la recomendación Técnico Microplant Ing. Pila L. (2010)

3. Fuente: Ensayo Práctico laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Bioforesta ESPOCH. (2010).

b. Siembra

La siembra se realizó dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, los cortes de los explantes se realizaron con la ayuda de una pinza y bisturí estéril, se eliminó la parte deteriorada durante el proceso de desinfección la longitud de la yema fue de 0.8 a 1.5mm y se sembraron en tubos de ensayo que contenía medio de cultivo, se taparon los tubos con papel aluminio se llevaron al cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura 21 ± 2 °C, humedad 60-70% y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, de acuerdo a (Muñoz, 2003).

3. Desinfección de hojas

El material vegetal fue desinfectado por 15 días con fungicida comercial dentro del invernadero, antes de ingresar al laboratorio; luego con la ayuda de un bisturí se cortaron las hojas procedentes de las plantas de invernadero.

Se desinfectaron, se lavaron las hojas con agua potable y jabón, se enjuagó con agua estéril este proceso de desinfección se realizó previo al ingreso de la cámara de flujo laminar. El proceso de desinfección dentro de la cámara el material vegetal se sumergió en alcohol potable al 75% por 30 segundos luego en cloro comercial a diferentes tiempos, como se detalla en el siguiente (cuadro 9) finalmente se realizaron 3 a 4 enjuagues con agua destilada estéril.

Cuadro 8. Protocolos de desinfección de hojas provenientes de invernadero.

Tipo de explante	Tratamiento de explantes hojas					
	Desinfección fuera de la cámara de flujo laminar		Desinfección dentro de la cámara de flujo laminar			
	Producto	Tiempo	Trat	Producto	Concentración	Tiempo
Hojas	Jabón	1 minuto	1	Alcohol	75%	30 segundos
	Fungicida	10 minutos		Cloro comercial	75%	2 minutos.
	Povidin	10 minutos	2	Alcohol	75%	30 segundos
				Cloro comercial	50%	3 minutos.
			3	Alcohol	75%	30 segundos
				Cloro comercial	10 %	5 minutos.

1. Fuente: Según la recomendación Técnico Microplant Ing. Pila L. (2010)

2. Fuente: Según la recomendación Técnico Microplant Ing. Pila L. (2010)

3. Fuente: Ensayo Práctico laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Bioforesta ESPOCH. (2010).

4. Siembra

La siembra se realizó dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, los cortes de las hojas se realizaron con la ayuda de una pinza y bisturí estéril, se colocó la hoja en una caja petri estéril y se eliminaron la parte deteriorada durante el proceso de desinfección, todo el margen de la hoja junto con el peciolo, se cortaron en secciones de 1cm², las secciones de hojas se sembraron en un tubo de ensayo con el haz en contacto con el medio de cultivo, se taparon los tubos con papel aluminio se llevaron al cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura 21 ± 2 °C, humedad 60-70% y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, de acuerdo a (Muñoz, 2003).

B. 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. Ápices

a2. Entrenudos

b. Factor B. Medios de cultivo

Medio1: (Woody con Auxina, Citoquinina y carbón activado)

Medio2: (MS con citoquinina y carbón activado).

Medio3: (MS con 2 citoquininas)

Medio4: (MS con Auxina y Citoquinina)

c. Tratamientos en estudio

Los tratamientos resultaron de la combinación de los factores en estudio, (cuadro 10), fueron 8 tratamientos con medios de cultivo tanto para ápices y entrenudos.

Cuadro 9. Tratamientos en estudio en la fase de multiplicación.

TRATAMIENTO	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
M1	a1b1	Ápice, medio de cultivo 1
M2	a1b2	Ápice, medio de cultivo 2
M3	a1b3	Ápice, medio de cultivo 3
M4	a1b4	Ápice, medio de cultivo 4
M5	a2b1	Entrenudos, medio de cultivo 1
M6	a2b2	Entrenudos, medio de cultivo 2
M7	a2b3	Entrenudos, medio de cultivo 3
M8	a2b4	Entrenudos, medio de cultivo 4

d. Unidad de observación

La unidad de observación estuvo constituida por un tubo de ensayo de 20 mm de diámetro x 150 mm de longitud, conteniendo 7 ml de los diferentes medio de cultivo que contenía un explante.

e. Diseño experimental.

1) Tipo de diseño

Para la investigación experimental se utilizó un diseño completamente al azar (D C A) con arreglo combinatorio bifactorial 2 X 4 para los cuales se utilizo 8 tratamientos con 4 repeticiones.

a) Especificaciones

Tratamientos	8
Repeticiones	4
Unidades Experimentales	32

b) Análisis estadístico

Cuadro 10. Análisis de varianza (ADEVA) para la fase de Multiplicación.

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

c) Análisis funcional

Se realizó la prueba de Tukey al 5% para todas las variables que presentaron diferencias significativas y el cálculo de coeficiente de variación se expuso en porcentaje.

d) Análisis económico

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

F. VARIABLES Y METODOS DE EVALUACION

1. Tiempo a brotación

Esta variable se evaluó con observaciones frecuentes diarias de las muestras y se determinó el crecimiento de los brotes a los 30 días a partir de la siembra.

2. Altura de los brotes

La evaluación se realizó a los 15, 30, 45, 60 y 90 días a partir de la siembra, se registró los datos en mm con la ayuda de una regla milimetrada.

3. Número de nudos

Se contabilizó el número de nudos que presento de cada uno de los explantes a partir de la siembra a los 15, 30, 45 y 60 días.

4. Tasa de pérdida

Se contabilizo el número de explantes contaminados, número de explantes muertos a partir de la siembra hasta los 15, 30, 45, 60 y 90 días para lo cual se utilizó la siguiente formula (CONIF, 2005)

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

5. Índice de multiplicación

El índice de multiplicación se evaluó a los 30, 60 y 90 días, posteriores a la siembra, se obtuvo contando el número de nudos obtenidos cada mes dividido para el número de plantas, para lo cual se utilizo la siguiente fórmula. (Colmenares *et al.*, 2003)

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

G. MANEJO DEL EXPERIMENTO

1. Preparación de medios de cultivo

El medio de cultivo se preparó 100ml de acuerdo a las cantidades indicadas por los autores, como se encuentra en el siguiente (Cuadro 8), se peso el medio Murashige y Skoog (MS), woody, sacarosa, agar, con la ayuda de una pipeta se agrego ácido naftalacético, bencilaminopurina y kinetina la cantidad recomendada por los autores, luego aforamos, el pH de los medios se ajustó a un rango de 5,6 a 5,9 con hidróxido de potasio y ácido clorhídrico al 1 normal de acuerdo al rango de (Suarez, 2003), se calentó el medio hasta que llegue al punto de ebullición, después se distribuyó 7ml de medio de cultivo en cada tubo de ensayo se taparon con papel aluminio y se colocaron en el autoclave a 15 libras presión (psi) a 121 °C por 15 minutos posteriormente se sacó, se dejo que se enfrié y se guardó en refrigeración.

Cuadro 11. Medios de cultivo para multiplicación

Medio de cultivo	Sacarosa	Hormonas		Gelificante	Otros	pH
		Auxina	Citoquinina			
Medio 1. Woody 2,3g/l	25g/l	ANA 0,5 ppm	BAP 0,2 ppm	Agar 7 g/l	Carbón Activ. 2 g/l	5.7
Medio 2. MS 4,3g/l	30g/l	-	Kinetina 4 ppm	Agar 7 g/l	Carbón Activ. 3 g/l	5.9
Medio 3. ½ MS 4,3g/l	30g/l	-	BAP 0,0065 ppm Kinetina 0,246 ppm	Agar 7 g/l	-	5.6
Medio 4. ½ MS 4,3g/l	30g/l	ANA 0,5 ppm	BAP 0,2 ppm	Agar 8 g/l	-	5.6

1. Fuente: Ishii & Maruyama 1989.

2. Fuente: Maruyama 1989.

3. Fuente: Pérez J. Mesen F.2001

4. Fuente: Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, Universidad Católica del Occidente, El Salvador. 2006

2. Multiplicación de los explantes

Para el proceso de multiplicación se seleccionó plantas in vitro que presentaron uniformidad en tamaño y vigor, de la primera fase, cuando las plántulas han desarrollado varios ápices y nudos, fueron llevadas a la cámara de flujo laminar.

3. **Siembra de explantes**

Los tubos fueron llevados a la cámara de flujo laminar, previamente esterilizados donde con la ayuda de pinzas y bisturí se cortaron en segmentos de un solo nudo de 0.5 a 1mm, luego se colocó un segmento en cada tubo con el medio de cultivo fresco y estéril, todas las actividades se realizaron en condiciones asépticas.

Posteriormente se tapó los tubos se identificó y se llevó al cuarto de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas Temperatura promedio: 21° C, Humedad relativa: 60 a 70 %. Fotoperiodo 16 Horas luz 8 horas de oscuridad, esta técnica se aplicó siguiendo la recomendación de (Gonzales, *et al.*, 1998).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. PRIMERA FASE: Introducción al sistema in vitro

1. Explantos provenientes de invernadero ápices y entrenudos

a. Tiempo de brotación

De acuerdo al análisis de varianza a los 30 días de evaluación de la introducción al sistema in vitro, para la variable tiempo de brotación, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas para los explantes (ápices y entrenudos) y protocolos de desinfección. El coeficiente de variación en esta variable fue de 8.61% a los 30 días, y la media de 7 días para el inicio de brotación (cuadro 12),

Cuadro 12. Análisis de varianza para la variable tiempo de brotación a los 30 días de la introducción al sistema in vitro.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	Fcal	Sig.
Factor A (Explantos)	1	7,04	7,04	17,48	**
Factor B (Protocolos)	2	12,25	6,13	15,21	**
Factor A * Factor B	2	1,08	0,54	1,35	ns
Error	18	7,25	0,40		
Total	23	27,63			
Media			7		
Coefficiente de Variación			8,61%		

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

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

Al realizar la prueba de Tukey al 5% para el factor A (Cuadro 13) y por haberse encontrado diferencias altamente significativas en el ADEVA a los 30 días ameritó realizar las comparaciones de medias en las cuales los ápices y entrenudos, superó significativamente, se determinó rangos de significancia, ubicándose en el rango b a los entrenudos, cuya brotación empezó a los 7 días, después de la siembra, mientras que el rango a corresponde, a ápices en el que la brotación empezó a los 8 días después de la siembra, resultando el entrenudo mas precoz.

Cuadro 13. Separación de medias según Tukey al 5% para el Factor A

Tratamientos	Media	Rango
Ápices	8	a
Entrenudos	7	b

Al realizar la prueba de Tukey al 5% para el factor B por haberse encontrado diferencias altamente significativas en el ADEVA a los 30 días ameritó realizar las comparaciones de medias en las cuales los protocolos de desinfección, superó significativamente, se determinó rangos de significancia, ubicándose en el rango b los protocolos 2 y 3, en donde la brotación empezó a los 7 días después de la siembra, mientras que el rango a corresponde, a ápices en el que la brotación empezó a los 8 días después de la siembra (cuadro 14).

Cuadro 14. Separación de medias según Tukey al 5% para el Factor B

Tratamientos	Media	Rango	Descripción
Protocolo 1	8	a	Ápices, alcohol 75% por 1 min, Cloro (Cl) comercial 75% por 7 min
Protocolo 2	7	b	Ápices, alcohol 75% por 1 min, doble desinfección en Cl comercial 50% por 2 min, Cl 20% por 3 min.
Protocolo 3	7	b	Ápices, alcohol 75% por 1 min, doble desinfección en Cl comercial 75% por 3 min, Cl 10% por 5 min.

Cada tratamiento se comportan de manera diferente en el proceso de introducción al sistema in vitro. Lo que indica que los protocolos de desinfección utilizados influyen en el desarrollo de los brotes tanto en ápices como entrenudos, en términos generales todos los tratamientos se adaptaron a la fase de introducción in vitro.

Morales, en el año 2002, quien indica para el éxito de esta técnica de propagación también influyen determinadas características de la planta, como el tipo, genética e incluso el tipo de implante, parte más juvenil.

b. Porcentaje de explantes contaminados.

Los resultados del efecto de los tratamientos de desinfección demuestran que los tratamientos T2 y T3 no presentaron signos de contaminación tanto en el explante como en el medio de cultivo, mientras que en los tratamientos T4 y T5 presentaron contaminación alrededor de un 25% y para los tratamientos T1, T6 presento el 50% de contaminación.

Los resultados fueron evaluados para todos los tratamientos y se describe en el (cuadro 15) luego de la siembra hay presencia de contaminación en el explante, a partir del tercer día hasta el quinto día, el desarrollo de la contaminación fue formando un halo blanquecino transparente en el borde basal del explante introducido en el medio de cultivo y al pasar los días tenía una coloración blanquecina, crema, esto se debe a la presencia de bacterias y no se registro contaminación por hongos.

Cuadro 15. Porcentaje de explantes contaminados

Trats	# Explantes contaminados	% de Contaminación	Descripción
T1	2	50	Ápices, alcohol 75% por 1 min, Cloro (Cl) comercial 75% por 7 min
T2	0	0	Ápices, alcohol 75% por 1 min, doble desinfección en Cl comercial 50% por 2 min, Cl 20% por 3 min.
T3	0	0	Ápices, alcohol 75% por 1 min, doble desinfección en Cl comercial 75% por 3 min, Cl 10% por 5 min.
T4	1	25	entrenudos, alcohol 75% por 1 min, Cl comercial 75% por 7 min
T5	1	25	Entrenudos, alcohol 75% por 1 min, doble desinfección en Cl comercial 50% por 2 min, Cl 20% por 3 min.
T6	2	50	Entrenudos, alcohol 75% por 1 min, doble desinfección en Cl comercial 75% por 3 min, Cl 10% por 5 min.

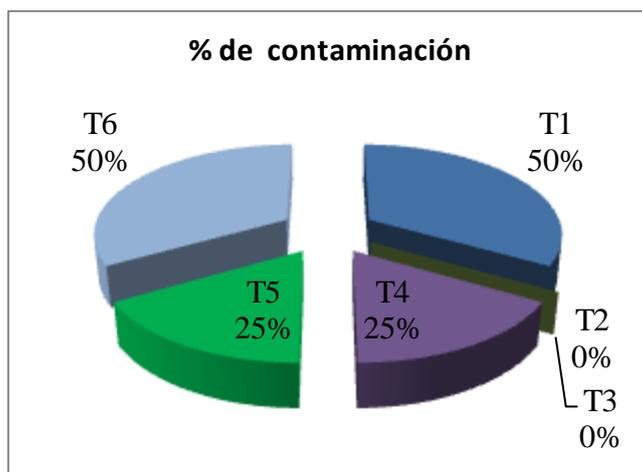


Gráfico 1. Porcentaje de explantes contaminados.

Pierik (1990) indica la existencia de cuatro fuentes de infección de contaminantes: la planta su exterior e interior, el medio nutritivo no esterilizado, el aire y el operador, trabajo poco preciso. De todas estas el más importante es el material vegetal el cual debe ser esterilizado antes de su introducción.

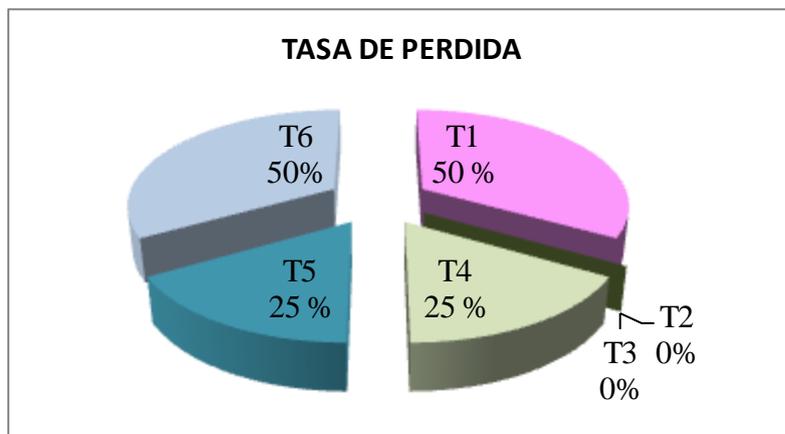
Recientes investigaciones revelan la existencia de bacterias embebidas en el agua del tejido xilemático. Éstas logran sobrevivir al proceso de desinfección inicial debido a la poca penetración de dicho proceso. Con el paso del tiempo éstas logran desarrollarse y formar un “fantasma blanco” (Skirvin et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

b. Tasa de pérdida

Los resultados del efecto de los tratamientos de desinfección demuestran que la tasa de pérdida fueron por contaminación bacteriana, ya todos los explantes respondieron de una forma satisfactoria, registrando una tasa de pérdida para los tratamientos T1 y T6 un 50%, mientras que en los tratamientos T4 y T5 presentaron una tasa de pérdida alrededor de un 25% y para los tratamientos T2, T3 no presentaron una tasa de pérdida, (cuadro 16).

Cuadro 16. Tasa de pérdida

Trat.	# explantes perdidos	Tasa de Perdida	Descripción
T1	2	50	Ápices, alcohol 75% por 1 min, Cloro (Cl) comercial 75% por 7 min
T2	0	0	Ápices, alcohol 75% por 1 min, doble desinfección en Cl comercial 50% por 2 min, Cl 20% por 3 min.
T3	0	0	Ápices, alcohol 75% x 1 min, doble desinfección en Cl comercial 75% por 3 min, Cl 10% por 5 min.
T4	1	25	entrenudos, alcohol 75% por 1 min, Cl comercial 75% por 7 min
T5	1	25	Entrenudos, alcohol 75% por 1 min, doble desinfección en Cl comercial 50% por 2 min, Cl 20% por 3 min.
T6	2	50	Entrenudos, alcohol 75% por 1 min, doble desinfección en Cl comercial 75% por 3 min, Cl 10% por 5 min.

**Gráfico 2.** Tasa de pérdida

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con Leifert *et al.* (1994) al comparar el % de contaminación, uno de los principales problemas de los laboratorios de cultivo de tejidos es la contaminación bacteriana donde ésta alcanza de 20 al 55% del total de la contaminación. La introducción de estos microorganismos a los medios estériles causa una disminución de las tasas de multiplicación.

2. Introducción al sistema in vitro en hojas.

Con los explantes de hojas no se logro un resultado satisfactorio ya que se observó la formación de callos en todas las secciones de hojas, presentaron colores tales como: blanco amarillento, cremoso a los 27 días a partir de la siembra, la contaminación se observo en 6 segmentos de hojas siendo por bacterias.

Muñoz, (2003). Confirma con los resultados obtenidos en la investigación, al usar hojas como explantes en proceso de introducción al sistema in vitro de hojas presento la formación de callos de color blanco cremoso en *Cedrela odorata*, los cuales formaron más lentamente el callo, tuvieron un proceso más tardío, las cuales tenían una consistencia frágil y coloración amarillenta o lechosa, los explantes en los que no se observó una respuesta inductora fueron las hojas.

B. SEGUNDA FASE multiplicación in vitro

1. Tiempo de brotación

De acuerdo al análisis de varianza a los 30 días de evaluación de la segunda fase de multiplicación para la variable tiempo de brotación (cuadro 17), muestra diferencias altamente significativas al considerar los medios de cultivo utilizados en diferentes proporciones.

La media obtenida en esta variable fue de 5 días a los que empieza la brotación de los explantes, como se puede apreciar el coeficiente de variación fue de 19.12% a los 30 días.

Cuadro 17. Análisis de varianza para la variable tiempo de brotación a los 30 días, fase de multiplicación.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculado	Significancia
Tratamientos	6	47.000	7.833	7.231	**
Error	20	21.667	1.083		
Total	26	68.667			
Media			5		
Coefficiente de Variación			19.12%		

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

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5% para la variable tiempo de brotación (cuadro 18 y gráfico 3), a los 30 días, se determinó el tratamiento M4 esta (compuesta de: auxinas y citoquininas) fue mas tardío pues los nuevos brotes, aparecieron a los 7 días. Mientras que los tratamientos M1, M2 y M7 fueron los más precoces pues la brotación empezó a los 4 días después de la siembra.

Cuadro 18. Separación de medias según Tukey al 5% para los factores tipo de explantes y medios de cultivo en la variable tiempo de brotación a los 30 días.

Tratamientos	Media	Rango	Descripción
M1	4	b	Ápices, Woody 2,3g/l, 30g/l de sacarosa, ANA 0,5ppm, BAP 0,2ppm, agar 7g/l, carbón activado 2g/l, pH 5,7
M2	4	b	Ápices, 4,3g/lMs, 30g/l de sacarosa, kinetina 4ppm, agar 7g/l, carbón activado 3g/l, pH 5,9
M7	4	b	entrenudos, 4,3g/l ½ Ms, 30g/l de sacarosa, BAP 0,0065ppm, kinetina 0,246ppm, agar 7g/l, pH 5,6
M6	5	ab	entrenudos, 4,3g/l ½ Ms, 30g/l de sacarosa, kinetina 4ppm, agar 7g/l, carbón activado 3g/l, pH 5,9
M3	6	ab	Ápices, 4,3g/l ½ Ms, 30g/l de sacarosa, BAP 0,0065ppm, kinetina 0,246ppm, agar 7g/l, pH 5,6
M5	6	ab	Entrenudos, Woody 2,3g/l, 30g/l de sacarosa, ANA 0,5ppm, BAP 0,2ppm, agar 7g/l, carbón activado 2g/l, pH 5,7
M4	7	a	Ápices, 4,3g/l ½ Ms, 30g/l de sacarosa, ANA 0,5ppm, BAP 0,2ppm, agar 8g/l, pH 5,6

De acuerdo a Gutiérrez et al., (2003), las citoquininas cumple con algunas funciones: de estimulación de la división celular, modifican la dominancia apical.

Funciones de citoquininas según Davies, (1995), Estimula división celular. Estimula la morfogénesis (disparar iniciación / formación del brote) en cultivo de tejidos. Estimula el crecimiento de brotes laterales de liberación de la dominancia apical. Estimula la expansión de la hoja resultante de la ampliación de la célula. Puede aumentar la apertura de las estomas en algunas especies.

Funciones de auxina de acuerdo a Davies, (1995). Estimula la elongación celular. Estimula la división celular en el cambium y, en combinación con citoquininas en el cultivo de tejidos. Estimula la diferenciación de floema y xilema. Estimula la iniciación de las raíces en los esquejes de tallo y el desarrollo de las raíces laterales en cultivo de tejidos. La fuente de la auxina de la yema apical suprime el crecimiento de brotes laterales. Retrasa la senescencia de la hoja.

De acuerdo a Gutiérrez et al., (2003), las auxinas cumple con algunas funciones: acción sobre el crecimiento celular, promueve el crecimiento del callo.

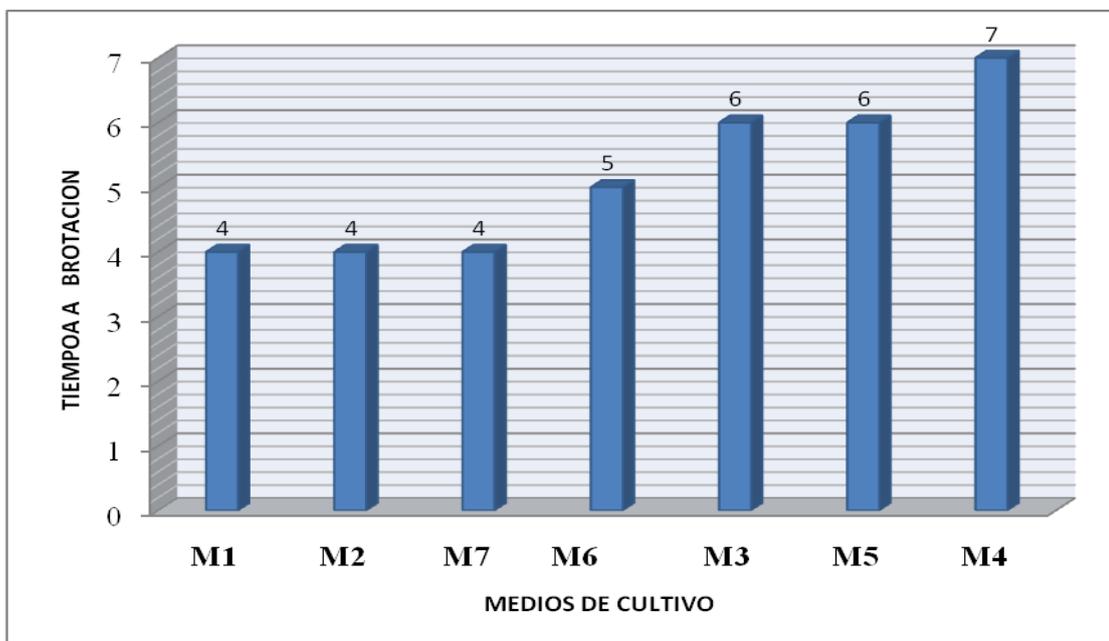


Gráfico 3. Comportamiento entre los factores tipo de explantes y medios de cultivo para la variable tiempo de brotación a los 30 días.

2. Altura de los brotes

De acuerdo al Análisis de varianza se demuestra que no existen diferencias significativas para la variable altura de brotes a los 15, 30, 45, 60 y 90 días de evaluación. El coeficiente de variación en esta variable presenta los siguientes datos 40.74% a los 15 días, con una media de 4,9 mm y 47,69 % a los 30, 45, 60 y 90 días con una media de 5,8mm, (cuadro 19).

Cuadro 19. Análisis de varianza para la variable altura brotes a los 15, 30, 45, 60 y 90 días.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Cuadrados medios	
		15 Días	30, 45, 60 y 90 Días
Tratamientos	6	5.970 ns	19.788 ns
Error	15	4.000	7.546
Total	21		
Media		4,9	5,8
Coefficiente de Variación		40,74%	47,69%

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

Se puede observar el crecimiento de los brotes a los 15 días es de forma acelerada y mientras transcurre el tiempo crecen los explantes de forma muy lenta,

Los resultados concuerdan con los obtenidos por Muñoz en el año 2003, quien indica para el caso de *Cedrela odorata*, para la variable altura no existen diferencias significativas entre los tratamientos, muestra un ligero incremento en la altura, debido probablemente al tamaño de los explantes sembrados, la competencia por la luz, ya que los esquejes fueron sembrados en un envase por cada tratamiento.

3. Número de nudos

El Análisis de varianza (cuadro 20), indica que no existen diferencias significativas entre tratamientos para el número de nudos a los 15, 30, 45, 60 y 90 días después de la siembra.

La media obtenida fue de un brote a los 15, 30, 45, 60 y 90 días, el coeficiente de variación fue de 19.63% a los 15 días, y de 31,44 % para los 30, 45, 60 y 90 días.

Cuadro 20. Análisis de varianza para la variable número de nudos a los 15 días y a los 30, 45, 60 y 90 días

Fuente de Variación	Grados de libertad	Cuadrados medios	
		15 Días	30, 45, 60 y 90 Días
Tratamientos	6	0.035n.s	0.147n.s
Error	18	0.042	0.132
Total	24		
Media		1	1
Coefficiente de Variación		19.63%	31.44 %

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

Se puede apreciar que el desarrollo en altura de brotes fue lento, lo que significa que los explantes mantienen el número de nudos con el transcurso del tiempo.

Los explantes que no presentaron desarrollo favorable en tamaño y el número de nudos. Rossi, (2000), manifiesta que este comportamiento se puede atribuir al hecho de que inicialmente se controla el pH del medio, lo que provoca una ligera acidificación durante el proceso de esterilización en autoclave, y afectando a la solubilidad de algunos componentes del medio de cultivo y su absorción de determinados nutrientes por parte del explante.

4. Índice de multiplicación

Los resultados obtenidos indican, (cuadro 21) el índice de multiplicación es relativamente baja en todos los tratamientos. Los datos registrados se demuestran bajos debido a que no hubo el crecimiento de los brotes.

Cuadro 21. Índice de multiplicación

Tratamientos	IM 30, 60 y 90 días	Descripción
M1	1	Ápices, Woody 2,3g/l, 30g/l de sacarosa, ANA 0,5ppm, BAP 0,2ppm, agar 7g/l, carbón activado 2g/l, pH 5,7
M2	1	Ápices, 4,3g/lMs, 30g/l de sacarosa, kinetina 4ppm, agar 7g/l, carbón activado 3g/l, pH 5,9
M3	1	Ápices, 4,3g/l ½ Ms, 30g/l de sacarosa, BAP 0,0065ppm, kinetina 0,246ppm, agar 7g/l, pH 5,6
M4	1	Ápices, 4,3g/l ½ Ms, 30g/l de sacarosa, ANA 0,5ppm, BAP 0,2ppm, agar 8g/l, pH 5,6
M5	1	Entrenudos, Woody 2,3g/l, 30g/l de sacarosa, ANA 0,5ppm, BAP 0,2ppm, agar 7g/l, carbón activado 2g/l, pH 5,7
M6	1	entrenudos, 4,3g/l ½ Ms, 30g/l de sacarosa, kinetina 4ppm, agar 7g/l, carbón activado 3g/l, pH 5,9
M7	1	entrenudos, 4,3g/l ½ Ms, 30g/l de sacarosa, BAP 0,0065ppm, kinetina 0,246ppm, agar 7g/l, pH 5,6

Cintron, B. (1990). Manifiesta después de 14 semanas el índice multiplicación fue de 2 nudos por explante en *Cedrela odorata*.

C. ANÁLISIS ECONÓMICO

1. Análisis económico de introducción al sistema in vitro o desinfección de explantes.

El análisis económico se realizó para la producción de 1m², utilizando el método de Perrín presupuesto parcial del CIMMYT (1988). Donde se tomaron en cuenta rubros tales como, mano de obra, insumos, materiales y alquiler de un laboratorio con los equipos e infraestructura necesaria para desarrollar este proceso de investigación con el propósito de obtener explantes y protocolos de desinfección que sea redituable económicamente. En el (cuadro 22) se pueden observar los 4 tratamientos estudiados con su rendimiento de plantas por m² correspondiente, el rendimiento ajustado al 10%, también se registró el beneficio bruto, costos que varían y el beneficio neto: el precio unitario de venta al público es de 0.50 USD.

El **total de costos que varían** considerando el factor explantes y protocolos de desinfección osciló de 468,86 USD, para el tratamiento T1, hasta 697,38 USD, en tratamiento T3. Referente al **beneficio neto** el cual varió de 11,82 USD, para el tratamiento T3, hasta 94,56 USD que corresponde al tratamiento T2.

Cuadro 22. Costos que varían y beneficios netos USD/m² de producción in vitro

Tratamientos	Rendimiento plantas/m ²	Rendimiento ajustado 10%	Beneficio bruto USD/m ²	Total costos que Varían USD/m ²	Beneficios netos USD
T1	1182	1063,8	531,9	468,86	63,04
T2	1576	1418,4	709,2	614,64	94,56
T3	1576	1418,4	709,2	697,38	11,82
T4	1182	1063,8	531,9	476,74	55,16

Según el análisis de dominancia (cuadro 23). Se determinó los tratamientos dominados (D) y no dominados (ND) para lo cual se ordenaron los tratamientos considerando los

datos de costos que varia, y beneficios netos de acuerdo con un orden creciente de los costos que varían, es decir de menor a mayor. Luego se identificaron los tratamientos no dominados, iniciamos con el primer tratamiento que es no dominado por definición, en este caso T1. Seguidamente visualizamos si al pasar de un tratamiento a otro los beneficios no se incrementan es dominado como los T4 y T3, pero si aumentan es no dominado como el T2.

Cuadro 23. Análisis de dominancia de datos de respuesta proceso de introducción al sistema in vitro.

Tratamientos	Beneficios Netos	Total costos que Varían	Análisis de Dominancia
T1	63,04	468,86	ND
T4	55,16	476,74	D
T2	94,56	614,64	ND
T3	11,82	697,38	D

En el (cuadro 24) se muestra el cálculo de la tasa de retorno marginal, destacando como mejor tratamiento T2 (doble desinfección: ápices + alcohol 75% por 1 minuto, cloro comercial al 50% por 2 minutos + cloro comercial al 20% por 3 minutos). El costo del tratamiento fue 614,64 USD por m², en esta área tendremos una producción de 1576 plantas y genero un beneficio neto de 94,56 USD por m², el cual incluye una tasa de retorno marginal de 21,62% valor que se hace referencia solo al costo que varia para esta investigación.

Cuadro 24. Tasa de retorno marginal

Trat.	Total costos Que Varían	Incremento Costos que Varían	Beneficio neto (U.S.D.)	Incremento Beneficio neto	TRM %
T1	468,86		63,04		
T2	614,64	145,78	94,56	31,52	21,62

Muñoz (2003). Manifiesta que el cultivo in vitro, son rentables aquellos laboratorios muy grandes y con mucho mercado, la planta ya desarrollada en el cultivo in vitro necesita una

primera aclimatación en el laboratorio; en el invernadero y después una segunda aclimatación en el campo. Los viveros grandes realizan ambas operaciones; otros sólo se encargan del primer paso.

2. Análisis económico para la fase de multiplicación in vitro

El análisis económico en la fase de multiplicación se tomaron en cuenta rubros tales como, medios de cultivo, mano de obra sueldo básico, insumos, materiales y alquiler de un laboratorio con los equipos e infraestructura necesaria para desarrollar este proceso de investigación.

En el (cuadro 25) se pueden observar los 6 tratamientos estudiados con su rendimiento de plantas por m² también se registra el beneficio bruto, costos que varían y el beneficio neto: el precio de venta unitario de venta al público es de 0.50 USD.

Cuadro 25. Costos que varían y beneficios netos USD/m² de producción in vitro.

Tratamientos	Rendimiento Plantas/m ²	Rendimiento ajustado 10%	Beneficio bruto USD/m ²	Total costos que Varían USD/m ²	Beneficios netos USD
M1	1172	1054,35	527,18	223,37	303,80
M2	1172	1054,35	527,18	123,06	404,12
M3	1562	1405,8	702,90	136,68	566,23
M5	1562	1405,8	702,90	297,70	405,20
M6	1562	1405,8	702,90	164,01	538,89
M7	781	702,9	351,45	58,58	292,88

Según el análisis de dominancia (cuadro 26). Se determino los tratamientos dominados y no dominados para realizar este análisis se ordenaron los tratamientos considerando los datos de costos que varia, y beneficios netos de acuerdo con un orden creciente de los costos que varían, es decir de menor a mayor. Luego se identificaron los tratamientos no dominados, aplicando la misma metodología, resultando los tratamientos M7 y M3. Mientras que los tratamientos M2, M6, M1, y M5 son dominados por cuanto los beneficios no se incrementan.

Cuadro 26. Análisis de Dominancia de datos de respuesta proceso de multiplicación in vitro.

Tratamientos	Beneficios Netos	Total costos Que Varían	Análisis de Dominancia
M7	292,88	58,58	ND
M3	566,23	136,68	ND
M2	404,12	123,06	D
M6	538,89	164,01	D
M1	303,80	223,37	D
M5	405,20	297,70	D

En el (cuadro 27). Se muestra el cálculo de la tasa de retorno marginal, destacando como mejor tratamiento M3 (M3 + ápices: ½ MS, 30g/l de sacarosa, BAP 0,0065ppm, kinetina 0,246ppm, agar 7g/l, un pH de 5,6). El costo del tratamiento en cuestión fue 136,68 USD por m² y genero un beneficio neto de 566,23 USD por m², el cual incluye una tasa de retorno marginal de 350% valor que se hace referencia solo al costo que varia para esta investigación.

Cuadro 27. Tasa de retorno marginal

Tratamientos	Total costos que Varían	Incremento costos que Varían	Beneficio neto (U.S.D.)	Incremento beneficio neto	TRM %
M7	58,58		292,88		
M3	136,68	78,10	566,23	273,35	350

VI. CONCLUSIONES

1. En el proceso de introducción in vitro de cedro los mejores tratamientos fueron T2 y T3. Que corresponde, a ápices (T2), con dosis de alcohol 75% por 1 minuto, doble desinfección en cloro comercial al 50% por 2 minutos, cloro comercial al 20% por 3 minutos. T3 corresponde a; ápices con dosis de alcohol 75% por 1 minuto y doble desinfección en cloro comercial al 75% por 2 minutos cloro comercial al 10% por 5 minutos. Para la variable tiempo a brotación los nuevos brotes aparecieron a los 7 días, durante este tiempo no se registro explantes muertos, ni contaminación.
2. En el tratamiento T5 que pertenece a entrenudos, con desinfección de alcohol 75% por 1 min, doble desinfección en Cloro comercial 50% por 2 min, Cl 20% por 3 minutos, demostró menor tiempo de brotación a los 6 días y con un 25% de contaminación, Mientras que al utilizar hojas hubo presencia de callos, en este mismo período.
3. El medio de cultivo más eficiente para la multiplicación de ápices fue M2, el mismo que contiene: 4,3g/l MS, 30g/l de sacarosa, 4 ppm kinetina, agar 7g/l, 3g/l carbón activado, un pH de 5,9. Este medio de cultivo permitió la aparición de nuevos brotes, a los 4 días. Para el número de nudos y altura de brotes se observó un desarrollo y crecimiento rápido, con una media de 1 nudo de 4,9mm a los 15 días. Mientras que, el crecimiento de los brotes registrados a los 30, 45, 60 y 90 días, fue lento con una media de 1 nudo de 5,8mm en altura de brotes.
4. Para la multiplicación in vitro de entrenudos, el medio de cultivo mas eficiente fue M6 4,3g/l MS con 30g/l de sacarosa, 4 ppm, kinetina, agar 7g/l, un pH de 5,9 este medio de cultivo permitió la brotación de los explantes a los 5 días.
5. De acuerdo al análisis económico para el proceso de introducción al sistema in vitro, el tratamiento T2: (ápices + alcohol 75% por 1 minuto, doble desinfección en cloro comercial al 50% por 2 minutos + cloro comercial al 20% por 3 minutos) fue el mejor donde obtuvo la Tasa de Retorno Marginal de 21,62%.

6. En la fase de multiplicación el medio de cultivo mas rentable fue M3 (M3 + ápices: 4,3g/l $\frac{1}{2}$ MS, con 30g/l de sacarosa, BAP 0,0065ppm, kinetina 0,246ppm, agar 7g/l, un pH de 5,6.) puesto que permitió obtener una Tasa de Retorno Marginal de 350%.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con las investigaciones sobre introducción al sistema in vitro, de especies forestales nativas, basándose en los procesos de desinfección de material vegetal.
2. Probar nuevos medios de cultivo con diferentes concentraciones de citoquininas, auxinas y giberilinas en *Cedrela montana*, para provocar enraizamiento.
3. Determinar un análisis económico de tecnologías de cultivo in vitro de otras especies forestales nativas.

VIII. RESUMEN

La presente investigación propone: desarrollar una técnica de micropropagación in vitro de cedro (*Cedrela montana*) a partir de ápices, hojas y entrenudos, en la Facultad de Recursos Naturales. Utilizando medios de cultivo y explantes, el diseño fue completamente al azar, en arreglo combinatorio bifactorial, se realizó en 2 fases la primera corresponde a introducción al sistema in vitro o desinfección de explantes con dosis de alcohol al 75% por un minuto y con cloro comercial en diferentes tiempos y porcentaje. Mientras que la segunda fase fue multiplicación de ápices y entrenudos en diferentes medios de cultivo. Dando como resultado al proceso de introducción al sistema in vitro o desinfección de explantes existió diferencias significativas en la variable tiempo a brotación y el mejor tratamiento fue T2, que corresponde, a ápices (T2), con dosis de alcohol 75% por 1 minuto, doble desinfección en cloro al 50% por 2 minutos, cloro al 20% por 3 minutos. Para la variable tiempo a brotación los nuevos brotes aparecieron a los 7 días, durante este tiempo no se registró explantes muertos, ni contaminación. En la fase de multiplicación el medio de cultivo más eficiente fue en ápices M2, el mismo que contiene: 4,3g/l MS, 30g/l de sacarosa, 4 ppm kinetina, 7g/l agar 3g/l carbón activado, un pH de 5,9. Este medio de cultivo permitió la aparición de nuevos brotes, a los 4 días. Para el número de nudos y altura de brotes se observó un desarrollo y crecimiento rápido, con una media de 1 nudo de 4,9mm a los 15 días, concluyendo que en la fase de desinfección el mejor tratamiento fue T2 con menor % de cloro y no se registró contaminación.

IX. SUMARY

A MICRO PROPAGATION TECHINE IN VITRO OF CEDAR (CEDRELA MONTANA) DEVELOPMENT FROM INCHES, LEAVES AND INTERNODES

The present research is about a micro propagation technique in vitro of cedar (*Cedrela montana*) from inches, leaves and internodes at Natural Resources Faculty by using growing ways and explants. The design was at random, in bi factorial combining arrangement. Two phases were carried out. The former is about the system in vitro introduction or disinfection of explants with dosages of alcohol at 75% per minute and with business chloride in different kinds and percentages. The latter was a multiplication of inches and internodes en different growing ways. As result, there were meaningful differences in the variable time to sprouting and the best treatment was T2 corresponding to inches (T2) with dosage of alcohol of 75% per 1 minute, double disinfection in chloride at 50% per 2 minutes, chloride at 20% per 3 minutes. In the variable time to sprouting new sprouts appeared in 7 days. During this time no dead explants and pollution were registered. In the increasing phase, the most efficient growing way was in inches M2, which contains: 4,3g/l MS, 30g/l of saraca, 4ppm kinetin, 7g/l agar, 3g/l activated coal, a pH of 5,9. This growing way let that new shouts appear in 4 days. A development and fast growing were observed in the numbers on nudes and height of sprout with a media of 1 nude of 4,9mm in 15 days. It is concluded that the best treatment was T2 with a low percentage of chloride and no pollution in the disinfection phase.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Bases de Datos de la Flora del Ecuador Continental para las Regiones del Ministerio del Ambiente 2002.
2. CASTILLO Elvio M. 2005. [En línea]. Propagación Agámica de Especies Forestales de Alto Valor. INTA Estación Experimental de Cultivos Tropicales Yuto. Centro Regional Salta Jujuy <<http://www.inta.gov.ar/yuto/info/documentos/forestales/especiesvaliosas.pdf>> [Consulta 15 diciembre 2008].
3. CESA, 1989. Especies forestales en los Andes Ecuatorianos. Edición Central Ecuatoriana de servicios Agrícolas. Segunda Edición Quito.
4. CIAT 1980 Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y Aplicaciones. Cali – Colombia. Páginas 403 – 422.
5. CINTRON, B. B. 1990. “Cedrela odorata L. Cedro hembra, Spanish cedar”. Handb. 654. Washington, DC: U. S. Department of Agriculture, Forest Service: 250-257. (2). Carlos López Encina ((CSIC) en la Estación Experimental La Mayora. Rosa Perán Quesada (CIFA). (3) Briseida Alejandra Hernández Pérez. Tesista en Biotecnología Vegetal. Unidad de Investigación de Biotecnología Vegetal
6. COELLO, D. 2010, comunicación personal, Microplant, Ecuador.
7. COLMENARES, M y GIMENEZ, C. Multiplicación in vitro Musa spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Rev. Fac. Agron.* [online]. oct. 2003, vol.20, no.4 [citado 04 Noviembre 2010], p.468-477. Disponible en la World Wide

Web: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037878182003000400007&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0378-7818.

8. CREEMERS, J & D. LEMCKERT. 1981. Clave para la identificación de las principales especies forestales mediante el uso de la lupa. Documento de trabajo #7. DGF, UNA, PNUD, FAO. Páginas 228.
9. Estación Agro meteorológica ESPOCH, Anuario Climatológico 2008.
10. FAO, 1994. Manual de Extensionista Forestal Andina. Proyecto Regional de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Quito.
11. GARCES Lupero Fabian Ramiro 2003. Producción De Plantas De Cedro. Memoria Programa Carrera de Tecnología Agroforestal – Alausí. Riobamba Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
12. GÓMEZ, R. 1998. Generalidades sobre la embriogénesis somática. Resúmenes del curso Internacional de Propagación Masiva in Vitro de Especies Vegetales. Instituto Biotecnológico de las Plantas. Santa Clara – Cuba.
13. GONZALES C. & VILCA J. 1998. Micropropación Vegetativa In Vitro De Aliso (*Alnus acuminata*). Edición Graficas de ADEFOR. Cajamarca – Perú. Páginas 6-13.
14. GUTIÉRREZ C. & OLIVA M. 2003. Curso, Principios y Prácticas en el Cultivo de Tejidos Vegetales, Teoría. San José – Costa Rica. Páginas 4 – 40.
15. HERMAN, E. B. 1990. [En línea] Bacterial Contamination in micropropagation. Agricell Reporter. 14: 41-43.
16. HURTADO D. & MERINO M. 2001. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editoriales Anfred. México. Páginas 15- 20, 35 – 65, 67- 84, 162 – 178.

17. LEIFERT, C. Waites, B. Keetley, J. Wright, S. Nicholas, R. Waites, W. 1994 b. [En línea] Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in Delphinium tissue cultures. Plant cell, tissue and organ culture.

18. LOJAN Idrobo Leoncio 2003. El verdor de los Andes Ecuatorianos, editado por el Proyecto Apoyo al Desarrollo Forestal Comunal en los Andes del Ecuador, páginas 55 – 64.

19. MANZANERA J.A. 1992. Inducción de Embriogenesis Somática en Roble (*Quercus Robur L.*). Investigación Agraria., Sistemas de Recursos Forestales. Vol. 1(1), 73-81.

20. MEJÍA Anaya Rubino 1994. Agrobiotecnología Fundamentos y Aplicaciones, Propagación Comercial 312 especies de plantas por cultivo in vitro. La Molina Perú, páginas.

21. MORALES Jesús 2002. [En línea] *Cultivo in vitro de árboles frutales. Multiplicación o reproducción de frutal in vitro* <<http://articulos.infojardin.com/Frutales/cultivo-in-vitro-reproduccion.htm>> infojardin [Consulta 15 diciembre 2008].

22. MURASHIGE, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.

23. MUÑOZ Tuesta Sonia Y. 2003. [en línea] *Embriogénesis Somática En cedro (Cedrela odorata Linnaeus) A Partir De Cotiledones*, Tesis para obtener el Título de Bióloga. Universidad Nacional Agraria La Molina Perú – Lima <<http://www.lamolina.edu.pe/cirgebb/tesis%20total.pdf>> [consulta 15 diciembre 2008].

24. ROCA, W.M Y MROGINSKI, L.A 1991. [en línea] *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali - Colombia. <http://www.micropropaci3n/in_vitro/pdf> [consulta 15 febrero 2009] p3ginas 127-140.

25. ROSSI, M. L. 2000. [en l3nea] *Cultivo in vitro*. <[http://www.Cultivo in vitro/microsof/office/power/point/](http://www.Cultivo_in_vitro/microsof/office/power/point/)> [consulta 15 diciembre 2008] diapositivas 1-42.

26. Skirvin, R. Motoike, S. Norton, M. Ozgur, M. Al-Juboory, K. McMeans, O. 1999. Workshop on micropropagation, establishment of contaminant-free perennial plants in vitro. In *Vitro Cell. Dev Biol.-Plant*. 35: 296-298.

27. PARENT, G. 1989. [en l3nea] Gu3a de reforestaci3n. Corporaci3n de defensa de la meseta de Bucaramanga. Colombia. [consulta 20 enero 2009]

28. P3REZ, J. 1998. Propagaci3n y mejora gen3tica de plantas por biotecnolog3a. Instituto de Biotecnolog3a de las plantas. Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba. [consulta 20 enero 2009] 391 p.

29. PIERIK, R. 1990. [En l3nea] Cultivo in vitro de las plantas superiores. Trad. Ayerbe, L. 3era Edici3n. Ediciones Mundi-prensa. Madrid. Espa3a 325 p. http://www.etsea2.udl.es/invitro/micropro/explant3.gif&imgrefurl=http://www.etsea2.udl.es/invitro/micropro.htm&usqDmicropropagacion%2B%2560%26h1%3Des%26lr%3Dlang_es%26sa%3DX%26um%3D1 consulta 15 diciembre 2008]

30. PILA, L. 2010, comunicaci3n personal, Microplant, Ecuador.

31. PILA, L. 2007, *Evaluación De 31 Clonespromisores De Yuca (Manihot Esculenta Crantz) Para La Agroindustria, En Condiciones In Vitro Y En El Sistema Autotrófico Hidropónico (SAH)*
32. SUAREZ, Sergio 2003. [En línea] *Medios de cultivo* Facultad de Biología. Universidad La Habana. Departamento de Biología Vegetal. < [http://Tema % 205 /medios de cultivo \[1\].doc](http://Tema%205/medios%20de%20cultivo%20[1].doc)> [Consulta 8 diciembre 2008]
33. THORPE, 1991. [En línea] *Introducción al cultivo de Tejidos y Biotecnología Vegetal Resumen del Curso*. Técnicas y Aplicación de Biotecnología en Especies Forestales. Corporación Andina de Fomento. Caracas Venezuela. Pág. 91-107.
34. UNIVERSIDAD, 2006. [En línea] Universidad, Católica de Occidente, *Metodología de Micropropagacion de Segmentos Nodales de Cedro(cedrela odorata) y caoba (Swietenia humili)*, obtenidas a partir de semilla seleccionada, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Santa Ana – El Salvador.
35. WHITE, 1943); Heller (1953); MS: Murashige y Skoog(1962); Nitsch y Nitsch(1969); B5: Gambourg et al(1968); Kao y Michayluk(1975). [En línea]

XI. ANEXOS

Plántulas de cedro en invernadero de 3 meses de edad



Explantes listos para la introducción al sistema in vitro.



Explante contaminado



Explante introducido al sistema in vitro.



Tipos de medios de cultivo en la fase de multiplicación.

