

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
Carrera de Ingeniería Agronómica**

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN
DE YALOMÁN (*Delostoma integrifolium* D. Don). QUITO, PICHINCHA.**

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

DIGNA ISABEL LOYA NAVARRETE

QUITO – ECUADOR

2014

DEDICATORIA

*“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes,
porque Dios estará contigo en donde quiera que vayas”*

A mi familia por ser el aliento diario, la fortaleza y el amor inagotable, siempre.

*A mis amados padres Victor Loya Quiña y Hortencia Navarrete Guanotoa,
que con su esfuerzo, sacrificio y apoyo han sido partícipes de mis logros en todos
los ámbitos de mi vida.*

A mis queridos hermanos Orlando, Jorge y Marcela por su cariño, confianza y apoyo.

A mi pequeña sobrina Daniela por llenar cada vacío con su amor y ternura.

Y a mi luz de cada mañana, porque sin ti ningún esfuerzo fuese posible.

Digna Isabel Loya Navarrete

AGRADECIMIENTOS

“Cuanto mayor sea el esfuerzo, mayor es la gloria”. Pierre Corneille

Gracias a Dios y a la santísima Virgen del Cisne; por haber guiado cada uno de mis pasos con sabiduría y fortaleza.

A mis padres por su trabajo, fuerza, perseverancia, lucha constante y demostrarme que todos los obstáculos pueden superarse y todas las metas pueden cumplirse.

A mis hermanos quienes con su ternura, motivación y esfuerzo representan un pilar fundamental en mi vida, especialmente tu ñaña Marce por ser mi compañera de aventuras y ser partícipe de mis sueños.

A mis sobrinas y sobrinos Alex, Brayán, Johana, Jhonatan, Karen, Alison, Sofía, Melisa, Jeremí y Daniela por demostrarme su cariño y su apoyo en todo momento.

A mis abuelitos José, Lorenza, Manuel, María Juana, a mi tío Pedro, a mi hermana, a mis sobrinos, a mi Ángel; y a mis amigos Víctor y Gonzalo; quienes se adelantaron en su partida, pero que desde el cielo me acompañan y me envían sus bendiciones día a día.

A la Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, especialmente a la Carrera de Ingeniería Agronómica, por los conocimientos impartidos, por mi formación como profesional y por haberme permitido vivir los mejores años, los que añorare muchísimo.

Al ingeniero Valdano Tafur por sus oportunas recomendaciones para el desarrollo de esta investigación.

A la ingeniera Isabel Ordoñez por su orientación, conocimientos, ayuda y paciencia durante el desarrollo de este estudio, y por su amistad.

Muy especialmente a la ingeniera Karla Jaramillo por compartir sus conocimientos, experiencias en el área y sobre todo por su valiosa amistad.

A cada uno de mis compañer@s, a los que tuve el gusto de conocer y compartir a lo largo de estos años, y sobre todo, a las que por su preocupación y confianza se volvieron parte de mi vida y dejaron de ser amigas para convertirse en mis hermanas: Yesenia, María José y Mayra, con quienes he compartido miles de alegrías y tristezas, las quiero mucho.

A ti Byron por estar siempre a mi lado e impedir que decaiga en los momentos difíciles y celebrar mis alegrías y logros.

A mis mascotas, los seres más leales que pueden existir en el mundo y que han sido parte de mi vida los mismos que me han brindado su compañía y cariño.

A cada una de las personas que, me brindaron esas palabras de aliento que me sirvieron para continuar.

Y a mí, porque a pesar de las dificultades y de los tropiezos que se presentaron, me pude demostrar una vez más que con mucho esfuerzo, lucha diaria, ganas de triunfar y fe, soy capaz de convertir las dificultades en oportunidades, los problemas en soluciones y las pérdidas en ganancias.

ISABEL ☺

AUTORIZACIÓN DE LA AUTORIA INTELECTUAL

Yo, Digna Isabel Loya Navarrete. En calidad de autor del trabajo de investigación o tesis realizada sobre **“EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE YALOMÁN (*Delostoma integrifolium* D. Don). QUITO, PICHINCHA”** **“EVALUATION OF CULTURE MEDIA FOR MICROPROPAGATION OF YALOMÁN (*Delostoma integrifolium* D. Don). QUITO, PICHINCHA”**, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, 09 de junio del 2014.



FIRMA

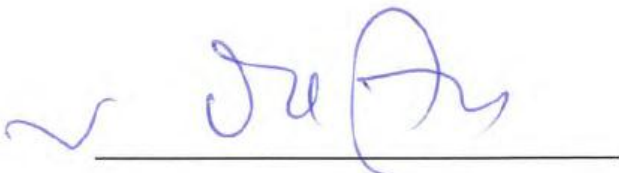
C.C. 172089323-7

isaloyaec@gmail.com

CERTIFICACIÓN

En calidad de tutor del trabajo de graduación cuyo título es: “**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE YALOMÁN (*Delostoma integrifolium* D. Don). QUITO, PICHINCHA.**”, presentado por la señorita **DIGNA ISABEL LOYA NAVARRETE**, certifico haber revisado y corregido por lo que apruebo el mismo.

Tumbaco, 09 de junio del 2014.



Ing. Agr. Valdano Tafúr Recalde
TUTOR

Tumbaco, 09 de Junio del 2014

Ingeniero Agrónomo
Carlos Ortega O., M.Sc.
**DIRECTOR DE CARRERA DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA**

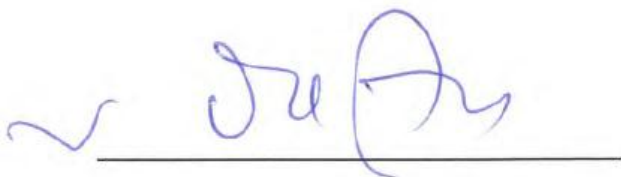
Presente.

Señor Director:

Luego de las revisiones técnicas realizadas por mi persona del trabajo de graduación **“EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE YALOMÁN (*Delostoma integrifolium* D. Don). QUITO, PICHINCHA.”**, llevada a cabo por parte de la señorita egresada: **DIGNA ISABEL LOYA NAVARRETE** de la Carrera de Ingeniería Agronómica, ha concluido de manera exitosa, consecuentemente la indicada estudiante podrá continuar con los trámites de graduación correspondientes de acuerdo a lo que estipula las normativas y disposiciones legales.

Por la atención que se digne dar a la presente, reitero mi agradecimiento.

Atentamente,

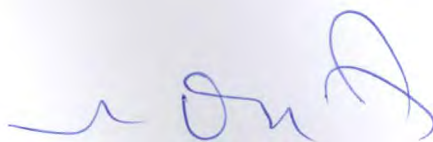


Ing. Agr. Valdano Tafúr Recalde
TUTOR

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
MICROPROPAGACIÓN DE YALOMÁN (*Delostoma integrifolium* D.
Don). QUITO, PICHINCHA.**

APROBADO POR:

Ing. Agr. Valdano Tafur.
TUTOR DE TESIS



Ing. Aida Arteaga., M.Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ing. Agr. Aníbal Pozo., M.Sc.
PRIMER VOCAL DEL TRIBUNAL



Ing. Agr. Juan Pazmiño., M.Sc.
SEGUNDO VOCAL DEL TRIBUNAL (BIOM.)



CONTENIDO

CAPÍTULO		PÁGINA
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Objetivos	2
2.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	Origen	3
2.2.	Clasificación taxonómica	3
2.3.	Sinónimos	3
2.4.	Nombres vernaculares	4
2.5.	Distribución geográfica	4
2.6.	Localización	5
2.7.	Descripción botánica	6
2.8.	Características de la Madera	8
2.9.	Usos	8
2.10.	Métodos de propagación	9
2.11.	Cultivo <i>in vitro</i> de plantas	10
2.12.	Medios de cultivo	15
2.13.	pH del medio	19
2.14.	Esterilización de los medios de cultivo	19
2.15.	Conservación de los medios de cultivo	20
2.16.	Condiciones ambientales para la incubación	20
2.17.	Cultivo <i>in vitro</i> de forestales	21
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1.	Características del sitio experimental	22
3.2.	Características Meteorológicas	22
3.3.	Características de la zona de recolección	22
3.4.	Materiales	23
3.5.	Factores en estudio	25
3.6.	Tratamientos	26
3.7.	Unidad experimental	26
3.8.	Análisis estadístico: Fase I y II	27
3.9.	Variables y métodos de evaluación	29
3.10.	Costo de producción de las plantas obtenidas <i>in vitro</i>	30
3.11.	Método de manejo del experimento	30
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1.	Fase I: Brotación de yemas	33
4.2.	Fase II: Enraizamiento de brotes	44
4.3.	Costo de producción de las plantas obtenidas <i>in vitro</i>	61
5.	CONCLUSIONES	64

CAPÍTULO		PÁGINA
6.	RECOMENDACIONES	65
7.	RESUMEN	66
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
9.	ANEXOS	81

LISTA DE ANEXOS

ANEXO		PÁG.
1	Componentes de Woody Plant Medium (WPM) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	81
2	Componentes de Murashige & Skoog (MS ^{1/2}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	81
3	Componentes de Woody Plant Medium (WPM ^{1/2}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	82
4	Componentes de Murashige & Skoog (MS ^{1/4}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	82
5	Costos variables de un litro de Murashige & Skoog (MS ^{1/2}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	83
6	Costos variables de un litro de Woody Plant Medium (WPM) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	83
7	Costos variables de un litro de Woody Plant Medium diluido (WPM ^{1/2}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	84
8	Costos variables de un litro de Murashige & Skoog diluido (MS ^{1/4}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	84
9	Depreciación anual de equipos utilizados en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	85
10	Datos de días a la brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	85
11	Datos reales del número de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	86

ANEXO	PÁG.
12 Datos transformados del número de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	86
13 Datos de la longitud de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	87
14 Promedio de la longitud de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	87
15 Promedio de días al enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	88
16 Datos reales del número de raíces por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	88
17 Datos transformados del número de raíces por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	89
18 Datos de longitud de la raíz por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	89
19 Datos de longitud de la planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	90
20 Protocolo de lavado y desinfección de cápsulas de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don) para la introducción al cultivo <i>in vitro</i> .	90
21 Árboles patrimoniales de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don).	91
22 Árboles seleccionados de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don) para recolección de cápsulas.	91
23 Fotografías de recolección, lavado, desinfección, tratamiento pregerminativo y siembra de semillas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	92

ANEXO		PÁG.
24	Fotografías de repique de explantes para la Fase I. Brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	93
25	Fotografías de repique de explantes para la Fase II. Enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	94
26	Fotografías de plantas aclimatadas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	95

LISTA DE CUADROS

CUADRO		PÁG.
1	Tratamientos de la Fase I en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	26
2	Tratamientos de la Fase II en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014	27
3	Esquema del análisis de la varianza (ADEVA) de la Fase I en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	28
4	Esquema del análisis de la varianza (ADEVA) de la Fase II en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	28
5	Análisis de la varianza para días a la brotación, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	33
6	Promedios de días a la brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	34
7	Promedios de días a la brotación para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	34
8	Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	35
9	Análisis de la varianza para la variable número de brotes por explante, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	37
10	Promedios del número de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	37

CUADRO	PÁG.
11 Promedios del número de brotes por explante para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	38
12 Promedios de número de brotes por explante para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	40
13 Análisis de la varianza para la variable longitud de brotes por explante, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	41
14 Promedios de la longitud de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	42
15 Tukey al 5 % para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	42
16 Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	43
17 Análisis de la varianza para la variable días al enraizamiento, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	45
18 Promedios de días al enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	45
19 Tukey al 5 % para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	46
20 Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	47

CUADRO	PÁG.
21 Análisis de la varianza para la variable número de raíces por planta, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	49
22 Promedios del número de raíces por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	49
23 Tukey al 5 % para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	51
24 Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	52
25 Análisis de la varianza para la variable longitud de la raíz por planta, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	53
26 DMS al 5% en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	54
27 Tukey al 5% para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	55
28 Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	56
29 Análisis de la varianza para la variable longitud de la planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	57
30 DMS al 5% en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	58
31 Tukey al 5% para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	59

CUADRO		PÁG.
32	Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	60
33	Costos fijos y variables en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	62

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO		PÁG.
1	Promedios de días a la brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	34
2	Promedios de días a la brotación para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	35
3	Promedios de días a la brotación para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	36
4	Promedios del número de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	38
5	Promedios del número de brotes por explante para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	39
6	Promedios del número de brotes por explante para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	40
7	Promedios de la longitud de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo en la variable longitud de brotes por explante para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	42
8	Promedios de la longitud de brotes por explante para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	43
9	Promedios de la longitud de brotes por explante para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	44

GRÁFICO	PÁG.
10 Promedios de días al enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	46
11 Promedios de días a la brotación para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	47
12 Promedios de días al enraizamiento para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	48
13 Promedios del número de raíces por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	50
14 Promedios del número de raíces por planta para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	51
15 Promedios del número de raíces por planta para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	52
16 Promedios de la longitud de la raíz por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	54
17 Promedios de la longitud de la raíz por planta para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	55
18 Promedios de longitud de raíz por planta para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	57
19 Promedios de la longitud de la planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014.	59

GRÁFICO**PÁG.**

- | | | |
|-----------|--|----|
| 20 | Promedios de la longitud de la planta para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014. | 60 |
| 21 | Promedios de la longitud de la planta para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (<i>Delostoma integrifolium</i> D. Don). Quito, Pichincha. 2014. | 61 |

EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE YALOMÁN (*Delostoma integrifolium* D. Don). QUITO, PICHINCHA.

RESUMEN

Delostoma integrifolium D. Don, es una especie nativa recomendada para la reforestación de áreas afectadas por la deforestación y la erosión en alturas de más de 2 800 msnm, con el fin de acelerar este propósito se optó por la micropropagación. La investigación inició con explantes obtenidos de plantas producto de la germinación *in vitro*. Se evaluaron dos medios de cultivo MS¹/₂ y WPM, suplementados con cuatro concentraciones de 6-bencilaminopurina para la brotación de yemas. Transcurridos 60 días del ensayo anterior, los brotes obtenidos se inocularon en los medios de cultivo MS¹/₄ y WPM ¹/₂ con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) para enraizamiento. El análisis estadístico utilizado fue un Diseño Completamente al Azar con un arreglo factorial 2x4 con seis observaciones en cada fase. Determinándose que para la brotación WPM ¹/₂+0.6 ppm de BAP disminuyó los días a la brotación e incrementó el número y la longitud de los brotes/explante; para enraizamiento WPM ¹/₂+0.2 ppm de IBA disminuyó los días al enraizamiento e incremento el número de raíces, la longitud de la raíz/planta y la longitud de la planta. Se estimó que producir plantas de Yalomán micropropagadas *in vitro* tendría un costo estimado de 0.46 USD/planta.

PALABRAS CLAVES: YALOMÁN, DELOSTOMA INTEGRIFOLIUM, BOSQUES ANDINOS, EXPLANTES, ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN, CULTIVO IN VITRO, HORMONA, BROTAÇÃO, ENRAIZAMIENTO.

EVALUATION OF CULTURE MEDIA FOR MICROPROPAGATION OF YALOMÁN (*Delostoma integrifolium* D. Don). QUITO, PICHINCHA.

SUMMARY

Delostoma integrifolium D. Don is recommended for reforestation of areas affected by deforestation and erosion in heights of over 2 800 msnm, in order to accelerate native species this purpose we chose micropropagation. Research began with product obtained from explants of in vitro germinating plants. Two culture medium MS¹/₂ and WPM were evaluated, supplemented with four concentrations of 6-benzylaminopurine for budding. After 60 days of the above test, the shoots obtained were inoculated into culture media MS¹/₄ and WPM¹/₂ with different concentrations of indolebutyric acid (IBA) for rooting. The statistical analysis used was a completely randomized design with a 2x4 factorial arrangement with six observations in each stage. Determinadose that sprouting WPM¹/₂ +0.6 ppm BAP decreased days to sprouting and increased the number and length of shoots/explant; for rooting WPM¹/₂+0.2 ppm of IBA on rooting decreased and increased the number of roots, root length/plant and plant length. It was estimated that plants produce in vitro micropropagated Yalomán would cost an estimated 0.46 USD/plant.

KEYWORDS: YALOMÁN, DELOSTOMA INTEGRIFOLIUM, FORESTS ANDINOS, EXPLANTS, ENDANGERED SPECIES, GROWING IN VITRO, HORMONE, SPROUTING, ROOTING

1. INTRODUCCIÓN

Ecuador es reconocido a nivel mundial por su riqueza florística y faunística, la cual está asociada a una serie de variables ambientales como: el bioclima, el relieve, el suelo, regímenes de inundación, entre otros factores; que interactúan y dan origen a diferentes paisajes naturales, que conviven con varios tipos de vegetación y permanentes amenazas, dadas por una continua y persistente presión del ser humano sobre los recursos naturales. Acorde con esto el plan nacional del buen vivir promueve la “sostenibilidad, la conservación, el conocimiento del patrimonio natural y el fomento del turismo comunitario” así como “garantizar los derechos de la naturaleza y promover un ambiente sano y sustentable”, se plantea como base considerar el patrimonio natural en su conjunto, la conservación, el manejo efectivo y coherente de los recursos naturales (MAE, 2012).

El Ministerio de Ambiente del Ecuador (MAE) indica en su estudio, “Estimación de la Tasa de Deforestación del Ecuador Continental”, que es una de las más altas en Latinoamérica con 1.5%, lo que equivale a 198 mil hectáreas por año (CIFOP, 2010) citado por (Cáceres, 2012). El ritmo de extinción de las especies se ha acelerado drásticamente, calculándose que en la actualidad es por los menos 400 veces mayor que el que existía antes de la aparición del ser humano. La extinción de especies vegetales y animales es uno de los síntomas más preocupantes del deterioro ambiental en el mundo, ya que constituye un proceso irreversible que nos priva para siempre de un material genético único e irremplazable del que tal vez ni siquiera sepamos aún, que aplicaciones prácticas podrá tener en beneficio de la misma humanidad que los destruye (Frers, 2008) citado por (Rodríguez, 2012).

Los problemas enmarcados han generado preocupación e inquietud, por lo que para la restauración de los ecosistemas andinos de nuestro país, se requiere de material vegetal nativo y en buenas condiciones fitosanitarias ya que los métodos tradicionales de propagación afectan el desarrollo y disponibilidad de especies nativas (Cáceres, 2012).

El Gobierno de la Provincia de Pichincha a partir del año 2010 implementó el Proyecto “Pichincha Verde”, priorizando actividades de reforestación como control ante la erosión y deforestación para áreas estratégicas con especies nativas forestales, previo un estudio y análisis de la vegetación de Quito. Considerando, con énfasis en que las especies locales leñosas, tienen ventajas sobre las especies exóticas, en los programas de reforestación, (Brandbyge, J y Holm Nielsen, s.f) citados por (Jaramillo, 2013).

En base a estos antecedentes, para la reforestación de microcuencas y espacios verdes, se consideró a especies forestales representativas, como “Faique” (*Acacia macracanta*), “Yagual” (*Polylepis incana*), “Arrayán” (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) Mc Vaugh y Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don), éste último perteneciente a la familia Bignoniaceae, nativo de los bosques andinos de Ecuador, Perú, Colombia y Venezuela (Gentry, 2009).

Otro motivo para que esta especie sea considerada para realizar esta investigación son, sus características agronómicas, presenta un crecimiento lento, alcanzando alturas de hasta 15 metros siendo ideal para sembrarlo en aceras, parques y en los bosques de la sierra ecuatoriana. Cabe mencionar que el “Yalomán” (*Delostoma integrifolium* D. Don) es considerado como un árbol patrimonial de la Ciudad de Quito y de gran valor ecológico, por ser nativo, presentar un magnífico porte y por sus notables dimensiones; siendo considerado un bien natural invaluable (JBQ, 2012).

Sin embargo, la propagación de esta especie resulta difícil, Vozzo (2010) citado por Carranza *et al.* (2012) manifiesta que, el factor que dificulta la propagación de esta especie, es el porcentaje de germinación de las semillas que es de aproximadamente el 47% considerado como bajo.

Así también, resulta dificultoso localizar ejemplares de esta especie con características agronómicas deseables; ya que, en Ecuador es una especie con muy poca o casi nula población. Por ello, la investigación pretendió encontrar la técnica para la micropropagación de “Yalomán”, partiendo del uso de explantes conseguidos de la germinación de semillas “*in vitro*”.

El cultivo *in vitro* ha revolucionado la producción agrícola y forestal en los últimos años, ya que gracias a esta técnica se pueden generar clones de variedades élite en grandes cantidades y en un tiempo menor, con un conjunto de beneficios adicionales respecto a la propagación tradicional. Además, esta técnica permite producir plantas durante todo el año, independientemente del factor climático (temperatura, luz, humedad) porque las condiciones de laboratorio en las que se realizan pueden ser controladas según la necesidad del cultivo. Este procedimiento también permite obtener plantas libres de enfermedades y patógenos, incluso libres de virus y de esta forma obtener plantas certificadas a nivel internacional para la exportación, que cumplan con todas las normas fitosanitarias requeridas (Recalde, 2007).

Esto es posible gracias a la “totipotencia celular” que es la capacidad inherente de una célula vegetal de dar origen a una planta completa, propiedad que a menudo es retenida, incluso después que una célula ha experimentado la diferenciación final en el cuerpo de la planta. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban, (Ortega, 2000) citado por (Jaramillo, 2013).

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

- Evaluar medios de cultivo para la micropropagación de “Yalomán” (*Delostoma integrifolium* D. Don).

1.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), para estimular la brotación de yemas.
- Evaluar diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (IBA), para estimular el enraizamiento de brotes.
- Calcular el costo de producción de las plantas obtenidas *in vitro* con la tecnología aplicada durante la investigación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen

Descrito como árbol nativo del norte de América del sur: Venezuela – Tachira, oeste de América del sur: Colombia, Ecuador y Perú (Gentry, 2009). Es una planta ornamental común que se encuentra en parques y jardines (León y Ayala, 2007).

2.2. Clasificación taxonómica

Taxonómicamente el Yalomán, según Uribe (2009) y Cuatrecasas (2012) citados por Herbario Gabriel Gutiérrez V. Medel (HGGVM) y el Instituto de Ciencias Naturales (ICN) (s. f), al igual que Merino y Gutiérrez (2010) manifiestan que, se encuentra clasificado de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Fanerogamae

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Magnoliopsida

Orden: Scrophulariales

Familia: Bignoniaceae

Género: *Delostoma*

Especie: *D. integrifolium*

Epíteto específico: *Delostoma integrifolium* D. Don.

2.3. Sinónimos

El nombre científico aceptado del Yalomán es *Delostoma integrifolium* D. Don, pero anteriormente fue identificado con otros nombres. Por ello Trópicos (s. f) citado por Ruales (2007) lo tiene en su registro con los siguientes sinónimos:

- *Codazzia rosea* H. Karst. Y Triana
- *Codazzia speciosa* H. Karst. Y Triana
- *Delostoma hookeri* Kraenzl.
- *Delostoma loxense* (Benth.) Sandwith
- *Delostoma nervosum* A. DC.
- *Delostoma roseum* (H. Karst. y Triana) K. Schum.
- *Delostoma speciosum* (H. Karst. y Triana) K. Schum. ex Jackson
- *Delostoma weberbauerianum* Kraenzl.
- *Tecoma loxensis* Benth.
- *Delostoma roseum* (H. Karst. y Triana) K. Schum. ex BD Jacks. Previamente asociado con 4 accesiones, PI 52608 Cholán, No. 566a, PI 52609 Cholán, No. 567A, PI 62677 No. 704, PI 62678 No. 705 que fueron recolectadas en Tungurahua, Ecuador por Popenoe, en el año de 1925. (USDA, 1995).

2.4. Nombres vernaculares

Según León y Ayala (2007); Palacios (2011) y la Central Ecuatoriana de Servicios Agropecuarios (CESA) (1992), el yalomán es conocido en varias comunidades de Ecuador como: yolomán, yalumán (Imbabura); yalomán, guaylo (Saraguro); guailac (Bolívar); quidajo (Baeza); chicharón (Papallacta); chignishi (Cotopaxi); yalomán, cholán morado o kirtachulan (Pichincha); Guallag, Guallec, Huallac y Guayluc (Carchi).

Gentry (2009) menciona que en Colombia se lo conoce como: Terebinto (Boyacá, Cundinamarca); calentano (Cundinamarca); molde (Valle); alma negra (Tolima); campanilla (Putumayo); cajeto o crecedor (Nariño); además el Herbario Gabriel Gutiérrez V. Medel (HGGVM) y el Instituto de Ciencias Naturales (ICN) (s. f); Gentry (2009) y Santa Cruz (2009) señalan en sus publicaciones que es conocido también como: jagüito, entunito, navajuelo, guayacán morado, crecedor o teterete, nacedero, fresno, guarapo, guaylo y palo de burro.

Mientras que en Perú en el valle del Huallaga, en los alrededores de Huánuco es conocida como "huarama" o "huaruma" (Chuquisana, 1988).

2.5. Distribución geográfica

Gentry (2009) y Ulloa (1993) mencionan que el género *delostoma* consta de 4 especies distribuidas desde el extremo occidental de Venezuela hasta Bolivia. En Ecuador están representadas por dos especies que crecen por sobre los 2400 msnm: *Delostoma integrifolium* D. Don y *D. lobbii* Seemann.



Figura 1. Distribución geográfica en América del Sur de *Delostoma integrifolium* D. Don.

Fuente: GBIF, (2010).

Según Lozano (2002) *Delostoma integrifolium* D. Don, se distribuye en las estribaciones de la cordillera occidental en el bosque húmedo siempre verde de colinas, bosque seco montano, bosque

seco semidecíduo, entre altitudes de 900 a 2300 msnm; a veces en altitudes más bajas. El Ministerio de Ambiente del Ecuador (MAE) (2012) indica que también se distribuye en los valles interandinos y bosques andinos a una altitud entre 1.600 y 3.000 msnm, los valles incluyen los matorrales secos y húmedos montanos; y el matorral húmedo montano bajo.

2.6. Localización

Jorgensen (1999h) citado por Ruales (2007) expresan que se ha localizado a *Delostoma integrifolium* D. Don, en las provincias del Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay, Loja, El Oro, Napo, Sucumbíos y Zamora Chinchipe, como muestra la **Figura 2**.



Figura 2. Localización de *Delostoma integrifolium* D. Don en Ecuador.

Fuente: GBIF. (2010)

De estudios y recolección de semilla realizados durante la investigación se adicionan lugares de las provincias de Pichincha (Quito, Amaguaña, Cumbayá, Tumbaco), Cotopaxi (Latacunga, Pijilí), Cañar (Valle del Tambo y Suscal), Santo domingo de los Tsachilas, Tungurahua (Huachi Chico) (Autor) y en la Provincia del Carchi en Patococha en donde existen bosques y áreas con ejemplares los mismos que son una fuente importante de obtención de semillas de Yalomán (EMMOP-Q, s.f).

2.7. Descripción botánica



Figura 3. *Delostoma integrifolium* D. Don. A: rama; B: fruto.

Fuente: Gentry, (2009).

2.7.1. Árbol

Arbusto o árbol, de hasta 15 m; ramas jóvenes teretes a subanguladas, glabrescentes¹ a pubérulas, zonas glandulares interpeciolares ausentes, pseudoestípulas ausentes (Gentry, 2009).

2.7.2. Hojas

Las hojas son simples con un pecíolo piloso con 1.5 a 6 cm de largo; posee láminas de 6 a 19 cm de largo por 3 a 12 cm de ancho, elípticas y oblongo elípticas a obovadas, cartáceas, base redondeada a obtusa o truncada, ápice obtuso, a agudo o muy abruptamente subacuminado, margen entero o crenulado; envés esparcidamente piloso, con grupos de glándulas en forma de plato en las axilas de los nervios secundarios; con 3 nervios desde la base (Gentry, 2009).

¹ Glabrescente.- Se aplica al órgano vegetal que tiene muy poco vello o que lo pierde.

2.7.3. Inflorescencias

Gentry (2009) indica que, las inflorescencias son un racimo terminal, de pocas flores, o una panícula racemosa teniendo en sus ramas más bajas de 2 a 3 flores, son vellosas, algunas veces bracteadas; con brácteas lineares de hasta 2 cm de largo.

2.7.3.1. Cáliz

Gentry (2009) señala que, el cáliz mide 1.1 a 1.6 cm de largo y 0.9 a 1.1 cm de ancho, es campanulado, los botones florales presentan un apículo terminal y 5 dientes triangulares laterales, en la anthesis irregularmente presenta de 2 a 3 dientes triangulares submarginales, los mismos que se encuentran a unos pocos milímetros por debajo del ápice, éstos algunas veces se van excediendo a los lóbulos terminales, son pubescentes con pelos simples, débiles y largos.

2.7.3.2. Corola

La corola tiene 5 a 7 cm de largo y 1.5 a 2.4 cm de ancho en la boca del tubo, es tubular-campanulada, ligeramente curvada, rojo-violeta (rosado oscuro o rojo-purpúreo); el tubo tiene 3.5 a 5 cm de largo, el exterior es pubérulo, el interior es glabro excepto a nivel de la inserción de los estambres donde tiene pelos simples más largos; el lóbulo mide de 1 a 1.5 cm de largo, mientras que el exterior es glandular lepidoto² (Gentry, 2009).

2.7.3.3. Estambres

Los estambres se encuentran insertos en la corola y el androceo, a 10 mm por encima de la base del tubo de la corola; los filamentos más largos poseen 2.5 a 2.6 cm de largo, los más cortos tienen 2.1 a 2.3 cm de largo; las tecas miden 3 a 4 cm de largo, subparalelas, colgantes; el estaminodio mide 12 mm de largo (Gentry, 2009).

2.7.3.4. Disco nectarífero

Gentry (2009) indica que, los discos nectaríferos son cupulares y miden 1.5 a 2 mm de largo con 3 mm de diámetro.

2.7.3.5. Pistilo

Gentry (2009) expresó que, los pistilos presentan una longitud de 4 a 5 cm; y el ovario mide 2 a 3 mm de largo con 2 mm de diámetro en la base, es ovoide, diminutamente glandular-lepidoto, con óvulos en cada lóculo en varias series y con estilo vellosos.

2.7.4. Frutos

Es una cápsula, mide 7 a 13 cm de largo y con 2.5 a 3 cm de ancho, es elíptica a ovado-elíptica, achatada paralela al septo, negruzca cuando se encuentra seca, ligeramente glandular-lepidota o casi glabrescente con una valva generalmente más larga que la otra (Gentry, 2009).

² Lepidoto.-Cubierto de tricomas escamiformes.

2.7.5. Semillas

Gentry (2009) señala que, las semillas son numerosas, dispuestas en varias series a lo largo de los bordes del tabique, miden 1.3 a 2 cm de largo por 3.3 a 4 cm de ancho, son delgadas, presentan alas laterales translúcidas hialino-membranosa y conspicuamente demarcada del cuerpo, esta estructura posee un color marrón y se encuentra rodeando el cuerpo de la semilla; se puede encontrar 35000 semillas por kg (Arias, 1983) y se encontró como promedio 60 semillas por cápsula, el número de semillas puede variar según el tamaño del fruto (Autora).

2.8. Características de la Madera

Arias (1983) indica que, la madera del Yalomán se caracteriza por tener su corteza engrosada, pardo-grisáceo, rugosa, con numerosas fisuras longitudinales y transversales; la madera de esta especie es muy dura.

2.9. Usos

Los yalomanes tienen muchos usos, el principal es como especie ornamental por su abundante y vistosa floración (Cerón, 2003), la madera es de buena calidad, rebrotan fácilmente al cortarlos, las hojas sirven de alimentos para los animales y se utilizan en agroforestería para obtener varios beneficios (CESA, 1992).

2.9.1. Combustible

Según Vargas (2002) y la Central Ecuatoriana de Servicios Agropecuarios (CESA) (1992), el Yalomán sirve de combustible, las ramas secas, al igual que las hojas, son usadas como leña, los árboles viejos, ramas o troncos gruesos son útiles para fabricar carbón

2.9.2. Materia prima

Sus diversos usos se deben a la dureza de la madera. Sirve de materia prima para la elaboración de arados, cabos, postes, pilares, estacas, vigas de calidad, muebles, artesanías y en la construcción de casas rurales (CESA, 1992).

2.9.3. Medicinal

En la medicina aborígen Ecuatoriana la flor está catalogada con la característica térmica de “caliente”. Hervida y aplicada en forma de baños cura los sarpullidos y afecciones de la piel. En infusión se la bebe para calmar las molestias de la gripe (Huachi, 2008; Jiménez, 2007), mientras que las hojas calientes se usa como emplastos para curar el dolor de estómago (Palacios, 2011).

Según Chuquisana (1988) posee iridoides. Los que aislados y purificados, exhiben una amplia gama de actividades biológicas, beneficiosas sobre la función hepática y billar. También ha mostrado acción antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antiviral, y se ha usada como antídoto en el envenenamiento producido tras el consumo de hongos venenosos del género *Amanita*, además previene la formación de derivados avanzados de glicosilación (AGEs) y ayuda a mantener niveles saludables de azúcar en la sangre (López *et al.*, 2012).

2.9.4. Ambiental

Según la Universidad Nacional de Colombia (UN) y la Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y la tecnología (DICYT) (2010), *Delostoma integrifolium* D. Don es hospedero de la avispa de la especie *Amitus fuscipennis*, parasitoide o agente controlador de la mosca blanca, la mata al depositar un huevo en el interior de la misma cuando está en estado de ninfa (previo a su adultez). La permanencia de las avispas en *Delostoma integrifolium* D. Don, radica en las estructuras productoras de azúcar que posee, de las que aparentemente se alimentan.

El Ministerio de Ambiente del Ecuador (MAE) (2010) menciona que, el Yalomán a más de captura el carbono del ambiente, mantiene en su interior a una gran variedad de pequeñas aves y es un árbol que en el período de escasez anual de lluvias presenta defoliación de la vegetación lo que ayuda a la incorporación de materia orgánica al suelo. Huachi (2008) expresa que es una especie recomendada para la recuperación de suelos en alturas de más de 2 800 metros sobre el nivel del mar, ya que al ser nativa se adapta fácilmente a las condiciones adversas y cumple eficientemente la función de fitorremediación que consiste en eliminar los contaminantes del entorno, para reducir su peligrosidad, o para mejorar las condiciones del suelo y el ambiente.

2.9.5. Otros usos

Numerosas especies de la familia bignoniaceae poseen gran importancia desde un punto de vista ecológico, económico y social. Algunas especies constituyen árboles de gran porte muy requeridos por la industria maderera; otras se cultivan con fines ornamentales; una gran diversidad ha sido utilizada por pueblos aborígenes como medicina, combustible, veneno y en rituales religiosos; mientras que unas pocas son fuente de alimento (Torretta, 2013).

Letacon *et al.* (1998) citado por Salas (s.f) mencionan que en los bosques tropicales cerca del 95 % de las especies de árboles son colonizados por hongos endomicorrizicos pertenecientes al orden *Glomales* y forman asociaciones simbióticas con árboles de las familias Fabaceae, Papilionodeae, Verbenaceae, Meliaceae, Caesalpinoideae, Bombacaceae, Cunoniaceae, Rubiaceae Combretaceae, Myrtaceae y la familia Bignoniaceae en la especie *Tabebuia sp*, esta asociación poseen la capacidad de fijar fósforo y ayuda eficientemente a la generación de biomasa, obteniéndose entonces una alternativa al manejo sostenible de los recursos naturales, especialmente en los ecosistemas perturbados por la obtención de madera, la actividad minera y la actividad agrícola o pecuaria descontrolada.

2.10. Métodos de propagación

Para realizar la propagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don) se puede elegir la multiplicación sexual o asexual que se determina a continuación:

2.10.1. Multiplicación sexual

Iriondo y Pérez (1999) citado por Jácome (2011) expresan que, tanto en las angiospermas como en las gimnospermas el método más frecuente de propagación es a partir de semillas. El período que comprende desde la germinación de la semilla hasta el establecimiento de las plántulas es el más vulnerable de todo el ciclo vital, ya que la semilla en germinación está expuesta a drásticas

variaciones en contenido de humedad y temperatura, las plántulas son muy susceptibles a daños por plagas y enfermedades; y a la competencia con otras plantas.

Según la Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia (CORANTIOQUIA) (2007), la familia Bignoniaceae en su gran mayoría se propagan por semillas, por lo que los frutos se deben recolectar directamente del árbol, cuando estén maduros y antes de que realicen la dehiscencia, algunas veces también es posible recoger los frutos cerrados que han caído del árbol y se encuentran en el suelo, siempre y cuando se observe que están en buen estado fitosanitario. Las semillas de esta especie son ortodoxas lo que permite almacenarlas por un periodo de 6 meses hasta cerca de los 2 años, bajo condiciones adecuadas de almacenamiento su viabilidad persiste y antes de sembrarlas se recomienda sumergir las semillas en agua corriente de 12 a 24 horas para obtener un porcentaje de germinación cerca al 50%.

2.10.2. Multiplicación asexual

La propagación asexual es una técnica que pueden ser utilizada en la obtención de material vegetal para objetivos de reforzamiento, introducción o reintroducción de plantas, cuando la reproducción por vía sexual no resulta factible o eficaz (Jácome, 2011).

La Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal (CONIF) (2001) mencionan que, las estacas obtenidas de árboles maduros de *Tabebuia rosea* perteneciente a la familia bignoniaceae, deben poseer 40 cm de longitud y con 1 a 2 cm de diámetro, el mismo debe poseer al menos 3 yemas, tomadas de la parte media de las ramas lo que facilitará la formación de raíces. Se las puede colocar en bolsas de polietileno o directamente en el campo, para un prendimiento óptimo debe poseer humedad elevada y constante.

Existe un amplio abanico de técnicas de propagación vegetativa y la elección de la más adecuada, pasa por tener previamente un profundo conocimiento de la morfología de la especie y de la existencia de algún medio de propagación vegetativa natural en la misma (Jácome, 2011).

2.11. Cultivo *in vitro* de plantas

Mroginski *et al.* (2010), mencionan que el cultivo de tejidos en su amplia extensión puede ser determinado como un conjunto heterogéneo de técnicas que presentan habitualmente el hecho de que un explante (una parte retirada del vegetal que pueden ser células, protoplastos que son células desprovistas de pared celular, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química específica y se incuba en condiciones ambientales controladas.

2.11.1. Micropropagación

A la micropropagación se la define como a “cualquier” procedimiento aséptico que comprenda la manipulación, en las plantas, en órganos, tejidos o células con potencialidad de diferenciación, incubadas en condiciones favorables (balance hormonal, luz, temperatura), estas varían en cada especie, para que regenere un nuevo individuo; por tanto, la micropropagación se refiere a una multiplicación masiva de plantas cultivadas *in vitro* fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se procede (Roca y Mroginski, 1993).

La propagación vegetativa *in vitro* (también llamada micropropagación), ha generado resultados de enorme importancia para la agricultura, en un considerable ahorro de espacio (invernaderos) y, por

consiguiente en energía, ha cambiado profundamente la producción de plantas propagadas vegetativamente, disminuyendo la posibilidad de introducir insectos, bacterias, hongos o nematodos, que pueden ser plagas o enfermedades que causen serios daños, haciendo posible que a partir de unas cuantas plantas se masifique rápidamente a grandes escalas el material de interés (Paucar, 2011).

2.11.2. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* constituye una técnica cuyas aplicaciones actualmente son muy utilizadas, en la clonación, conservación y manipulación de material vegetal (Pérez, 1998). Esta técnica se basa en la totipotencia celular, esto es la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo ciertas condiciones dadas en el cultivo *in vitro*, logrando una propagación rápida a partir de cualquier parte de una planta (Patiño, 2011). Esta aptitud está ampliamente aprovechada en la multiplicación vegetativa *in vitro*, sobre todo en los casos de especies difíciles de propagar, como son las leñosas (Flor, 2013). Con esto se logra que la planta desarrolle brotes que posteriormente son multiplicados para finalmente ser llevados a un proceso de aclimatación y comprobar su comportamiento *ex vivo* (Basantes, 2011).

2.11.3. Principales problemas en el cultivo *in vitro*

1. Vitropatógenos

Uno de los problemas más importantes en el desarrollo de la biotecnología vegetal y especialmente del cultivo *in vitro* de células y tejidos ha sido la contaminación por vitropatógenos (bacterias, hongos y virus). El efecto de los microorganismos contaminantes sobre las vitroplantas puede ser considerable si se tiene en cuenta que compiten con ellas por los nutrientes del medio y les provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos y por la expulsión al medio de metabolitos tóxicos, pudiendo llegar a reducir los coeficientes de multiplicación, inhibir el enraizamiento y ocasionar la muerte del explante (Hernández *et al.*, 2005) citado por (Flor, 2013). Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micropropagación se lo puede estimar en alrededor del 10 % (Olmos *et al.*, 2010).

2. Vitrificación

La vitrificación es también conocida como hiperhidricidad, translucidez, transformación hiperhídrica, glaucosidad y vitrosidad. Produce la aparición de características atípicas en las plantas cultivadas *in vitro* a nivel anatómico, morfológico y fisiológico. Las características de plantas vitrificadas son una enorme cantidad de agua en los tejidos de las hojas y tallos, una reducción en la producción de las ceras epicuticulares combinado con una gran pérdida de agua, una distorsión del movimiento de los estomas y una anatomía anormal de hojas, tallos y raíces. Los brotes afectados presentan entrenudos cortos y los brotes apicales aparecen con fascinaciones³ (Nieto y Valdivieso, 2013). La vitrificación aparece especialmente en las plantas que disponen de una gran cantidad de agua, como ocurre en los medios líquidos o con baja concentración de agar, (Pierik, 1990).

³ Fascinaciones.- Crecimiento de una planta en la cual el meristema apical se concentra alrededor de un solo punto y produce tejido más o menos cilíndrico.

2. Oxidación

La producción de compuestos fenólicos, se estimula cuando las plantas se exponen a situaciones de estrés como pueden ser los daños mecánicos que se producen al aislar el explante, las superficies de corte de muchos explantes comienzan a decolorarse justo después de cortarlas. Los explantes completos o partes de ellos frecuentemente continúan oscureciéndose cuando se introducen en el recipiente de cultivo y exudan sustancias tóxicas que producen a su vez el oscurecimiento del medio (Recalde, 2007). La luz y la especie son factores determinantes en la oxidación de explantes en el cultivo *in vitro* (Jaramillo, 2013).

2.11.4. Etapas de la micropropagación

Murashige (1974) citado por Jaramillo (2013) plante tres pasos o fases fundamentales para propagar eficientemente una especie: 1) el establecimiento aséptico del cultivo; 2) su proliferación o multiplicación; y 3) el enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo. Habitualmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse, en condiciones *ex vitro*. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento (Olmos *et al.*, 2010; Pierik, 1990).

Cada una de estas etapas tienen sus problemas específicos, pero además existe una serie de inconvenientes que son característicos y común para todas las etapas (Orozco, 2012).

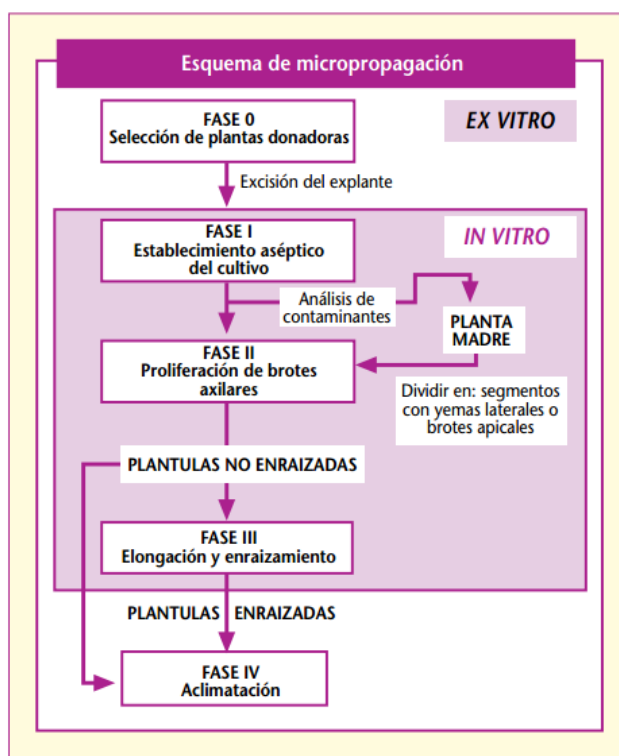


Figura 4. Esquema de la micropropagación.

Fuente: FIA, (2010).

1. Etapa 0. Selección y preparación del material vegetal

Para la selección del material vegetal, es trascendental considerar el sistema de propagación de la planta, es decir, si la reproducción de la planta se da por semillas, los explantes ideales componen las partes embrionales, mientras que en las especies que se reproducen vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos son los explantes más utilizados (Roca y Mroginski, 1993).

A pesar de que se puede utilizar cualquier tipo de material vegetal, habitualmente resulta más conveniente utilizar los órganos, tejidos o células de plantas jóvenes que los de plantas adultas ya que se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis; ya que, mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar (brotes apicales de yemas en desarrollo), la respuesta *in vitro* será superior, (Sabja *et al.*, 2008) citado por (Ramírez, 2012).

Olmos *et al.* (2010) mencionan que, la correcta elección y preparación del explante, incide directamente sobre, su calidad y respuesta, frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante.

2. Etapa 1. Establecimiento del cultivo

El desenlace de esta etapa es instaurar cultivos viables y axénicos (libres de patógenos), para lograrlo se debe considerar dos factores que son específicamente importantes: el explante y la desinfección (Pierik, 1990).

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Las respuestas de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos; ya que, mientras más joven, mejor será la respuesta *in vitro* (Villamizar, 2005).

Una vez que se ha seleccionado el explante, se requiere desinfectarlo superficialmente ya que en el medio de cultivo pueden desarrollarse hongo o bacterias que competirán con el explante. Los procesos de desinfección comprenden una serie de tratamientos que ayuden a eliminar agentes contaminantes y a la vez, permitan mantener vivo el explante, entre las sustancias más comunes se encuentran las soluciones de hipoclorito de sodio (2-5 %), el hipoclorito de calcio (6-12 %), el etanol a una concentración de 70 %, el peróxido de hidrógeno y el nitrato de plata a distintas concentraciones. Además se adicionan tenso activo como Tween 20 que actúa rompiendo la tensión superficial facilitando el contacto entre el químico y el explante, sin embargo no se puede generalizar sobre un tipo de desinfectante ya que cada especie es un caso particular (Basantes, 2011).

3. Etapa 2. Multiplicación

El objetivo en esta fase es lograr el mayor número de plantas posibles, en el menor tiempo, a partir de explantes (meristemas apicales o axilares, yemas axilares o adventicias), ya establecidos *in vitro* en la fase 1. La etapa de multiplicación generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha.

Durante la fase de inducción el tejido utilizado atraviesa un proceso de estrés que altera su metabolismo celular y es ahí cuando debe responder de la mejor manera a las condiciones, es decir que las células sobrevivan al cambio hormonal que se produce y puedan desarrollarse en el medio de iniciación en el que son colocadas, aquí se emplea concentraciones elevadas de reguladores hormonales (auxinas más que citoquininas) para favorecer la desdiferenciación (Basantes, 2011).

Jaramillo (2013) y Basantes (2011) mencionan que, la fase de multiplicación requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular. En este caso, el sistema es más dependiente de citoquininas, los explantes que se han adaptado eficientemente al medio de iniciación, se desarrollan y originan brotes ya sean estos axilares o adventicios y que constantemente deben ser subcultivados en un nuevo medio.

4. Etapa 3. Enraizamiento

Esta etapa tiene como esencia originar una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo (Roca y Mroginski, 1993). El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*.

- **Enraizamiento *in vitro***

Jaramillo (2013) y Ramírez (2013) expresan que los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación requieren generalmente ser transferidos a un medio de cultivo con menor concentración de sales y libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas. Así mismo, se requiere cambiar el balance hormonal; esto es, disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citoquininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Jaramillo, 2013). Otros factores como la alta temperatura, la baja intensidad de luz y el uso de carbón activado ayudan a estimular el enraizamiento (Nieto y Valdivieso, 2013).

- **Enraizamiento *ex vitro***

Una vez removidos los explantes del recipiente *in vitro* deben transferir a un sustrato limpio, no necesariamente estéril, que puede ser una mezcla de turba con perlita o vermiculita. La remoción total y cuidadosa del agar es importante sobre todo para eliminar cualquier residuo de sacarosa y otros compuestos orgánicos de las raíces para de esta forma evitar infecciones o daños que pueden ser causados por la presencia de metabolitos tóxicos secretados por los microorganismos, además es necesario que los brotes tengan hojas bien desarrolladas ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para continuar desarrollarse (Patiño, 2011).

Sin embargo, el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas, durante las etapas iniciales del trasplante, puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, los explantes deben plantarse en cámaras plásticas, para mantener la humedad relativa elevada y además es conveniente disponer de invernadero o cámaras de crecimiento, las mismas que brinden las condiciones adecuadas (temperatura y humedad relativa) que permitan alcanzar la rusticación de las plantas en forma progresiva (Olmos *et al.*, 2010).

5. Etapa 4. Aclimatación

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.

Las plantas enraizadas *in vitro* presentan varias características que dificultan su adaptación al medio externo una vez concluido el período de cultivo. Entre estas características se encuentran: la alta humedad relativa dentro de los recipientes que provoca que las plantas generadas *in vitro* carezcan de algunos de los sistemas normales para evitar la pérdida de agua (la cutícula está poco desarrollada y el mecanismo de cierre de los estomas está atrofiado). Las plantas generadas no realizan una fotosíntesis normal, ya que sus requerimientos de carbono son satisfechos por el medio de cultivo, por lo que la anatomía de las hojas difieren de las plantas que crecen *in vivo*, siendo más delgadas y con menor contenido de clorofila. Por lo tanto, es necesario desarrollar en forma paulatina su autotrofía, disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de la luz hasta adaptarlas al medio externo con éxito (Recalde, 2007).

2.12. Medios de cultivo

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por la interacción de factores externos como luz, nutrientes, agua, temperatura e internos como las hormonas. Además las células, tejidos y órganos vegetales pueden crecer y desarrollarse separados de la planta madre en un medio de cultivo, que es la combinación de nutrientes y agua. Los medios de cultivo son un conjunto de elementos físico-químicos que integran la sustancia nutritiva de diversa consistencia (sólida, semisólida y líquida) que suministrara anclaje, nutrición y la estimulación del desarrollo al explante (Ramírez, 2013).

Los elementos necesarios para la preparación del medio pueden variar dependiendo de las etapas que pasa el explante durante la micropropagación y según la técnica a emplear, por esto existen diferentes fórmulas y deben ser ajustadas según las condiciones del laboratorio. La diferencia entre estas fórmulas está en la cantidad y concentración de los elementos que lo conforman y pueden ser suplementados con algún regulador de crecimiento (fitohormonas) y agentes gelificantes, el medio nutritivo debe poseer un adecuado pH para el desarrollo normal del cultivo (Ramírez, 2013).

Los componentes necesarios para la preparación de los medios nutritivos se detallan a continuación:

2.12.1. Agua

El agua constituye el 95 % del medio nutritivo, razón por la cual es necesario que atraviese un proceso apropiado de destilación, ya que la utilización de agua corriente causa efectos negativos puesto que a más de contener contaminantes orgánicos y microorganismos puede poseer iones calcio que afectarían la composición del medio precipitando algunos de sus componentes, (Basantes, 2011).

2.12.2. Fuente de carbono

La sacarosa en concentraciones de 2 al 5 %, es la fuente de carbono utilizada casi universalmente para el cultivo de tejidos y la azúcar refinada es lo suficientemente pura para la mayoría de propósitos. Se han utilizado otras fuentes de carbono como fructosa o glucosa; sin embargo, el boro tiende a reaccionar con este tipo de compuestos orgánicos, por lo que el mantenimiento a largo plazo de tejidos *in vitro*, debe necesariamente poseer la sacarosa como fuente de carbono, para no presentar síntomas de deficiencia de boro (Izquierdo, 2006). También el myoinositol (100 mg/l) suele ser incorporado a los medios dando como resultado un mejor crecimiento de los cultivos (Mroginski *et al.*, 2010).

2.12.3. Nutrientes minerales

Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, Mg) y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl), que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras en condiciones *ex vitro*, estos compuestos son requeridos en concentraciones adecuadas de milimolares y micromolares respectivamente. En general se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado juntamente con un agente quelante (Na₂EDTA), que lo hace disponible en un amplio rango de pH. Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y a la respuesta que se desea obtener (Jaramillo, 2013; Ordoñez, 2013).

2.12.4. Vitaminas

Las plantas, a diferencia de los animales, son capaces de producir las vitaminas necesarias para su normal funcionamiento; sin embargo, las células y tejidos durante el cultivo *in vitro* pueden tener deficiencias. En este contexto, la adición de vitaminas al medio de cultivo mejora su crecimiento y sobrevivencia (Izquierdo, 2006).

Particularmente las vitaminas del complejo B contienen compuestos esenciales para el crecimiento y metabolismo vegetal, y las más utilizadas en los medios de cultivo son: Tiamina (vitamina B₁), ácido nicotínico (niacina), piridoxina (vitamina B₆) y myoinositol, que es un alcohol de azúcar (hexitol) del complejo B, (Izquierdo, 2006). De todas las que generalmente se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos (Mroginski *et al.*, 2010).

El myoinositol participa en la activación de la organogénesis, favorece el crecimiento y desarrollo de la pared celular y membrana; y participa en la síntesis de fosfolípidos (Ordoñez, 2013)

2.12.5. Fitohormonas

La presencia de hormonas en diferentes niveles en las plantas y en sus células, permite que éstas desarrollen caminos morfogénicos alternativos muy distintos, los cuales pueden darse todos de acuerdo al grado de ontogenia (Jordán y Casaretto, 2006)

Las hormonas vegetales o también conocidas como reguladores de crecimiento, es un grupo de sustancias que necesita la planta en mínimas concentraciones para regular importantes procesos de su ciclo de vida que influyen sobre el crecimiento y desarrollo. Son clasificadas en tres grupos: Auxinas, Citoquininas y Giberelinas (Landázuri, 1996).

- **Auxinas**

El nombre auxina significa en griego “crecer” y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. Existen varias auxinas naturales, tales como el AIA (ácido indolacético), indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, entre otras, de éstas el AIA es el compuesto de mayor utilización. Las auxinas sintéticas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB), de estas no es posible establecer una concentración particular pero se utilizan en concentraciones que van de 0,001-10 mg/L. Las auxinas generalmente producen: elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión; sin embargo, se debe limitar al máximo su uso ya que puede inducir mutaciones. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio (Oscullo, 2011; Recalde, 2006).

- **Citoquininas**

El nombre genérico de las citoquininas es empleado para aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis. Casi todas las citoquininas conocidas, tanto naturales como sintéticas, son derivados de la adenina (Recalde, 2006).

Entre sus efectos fisiológicos se destaca que regulan la formación y el desarrollo del tallo. En cultivo *in vitro*, las citoquininas promueven la formación de tallos en diversos tipos de explantes, como callos, hojas y cotiledones de diversas especies. Regulan la síntesis de pigmentos fotosintéticos en los cloroplastos junto con otros factores como la luz y el estado nutricional de la célula (Jácome, 2011). Las citoquininas suprimen la dominancia apical promoviendo la brotación de yemas laterales (Jaramillo, 2013).

Existen dos grupos de importancia: los conformados a base de adeninas y los que son a base de fenilureas. De las primeras se han identificado a la Benciladenina, Kinetina, Isopenteniladenina (IPA), Dihidrozeatina y Zeatina, de ésta última se derivan la Ribofuranosilzeatina, la Glucopiranosida de Zeatina, entre otras. Del segundo tipo se encuentran la Difenilurea y algunos derivados como Forclorfenurón (CPPU) o Tiaziazurón (TDZ) (Oscullo, 2011). Las citoquininas en concentraciones elevadas (1-10 mg/litro⁻¹) pueden inducir la formación de vástagos adventicios; sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces (Jaramillo, 2013).

- **Relación auxina/ citoquinina**

Alterando ligeramente las concentraciones relativas de auxina y citoquinina, los investigadores han podido modificar el desarrollo de las células indiferenciadas de los cultivos de tejidos (**Figura 3**) (Wareing y Phillips, 1973) citado por (Recalde, 2006).

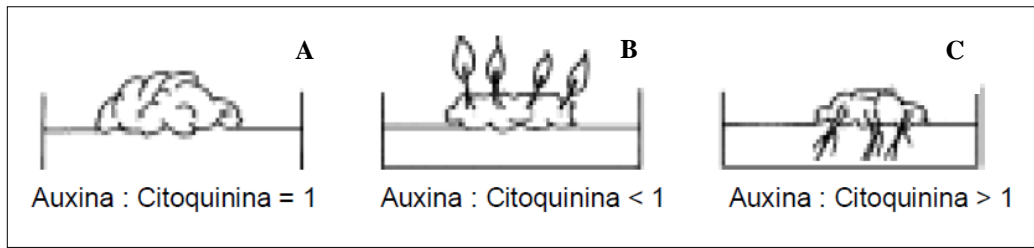


Figura 5. Relación entre auxinas y citoquininas; A: Callo; B: Brotes; C: Raíces

Fuente Wareing y Phillips (1973) modificado por Recalde (2006).

- A: Una concentración más o menos igual de las dos hormonas, hace que las células sigan indiferenciadas, formando masas de tejido llamadas callos.
- B: Con una concentración superior de citoquinina, se forman brotes.
- C: Cuando la concentración de auxina es superior, el tejido indiferenciado forma raíces.

• Giberelinas

Estas hormonas son un producto metabólico del hongo *Giberella fujikuroi*, no muestran el mismo transporte fuertemente polarizado como las auxinas, aunque en algunas especies presenta un movimiento basipétalo en el tallo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis), incrementan el crecimiento de los tallos, interrumpe el período de latencia de las semillas e inducen la producción de yemas y el desarrollo de los frutos, (Salisbury y Ross, 2000) citado por (Ramírez, 2013).

• Etileno

Es el compuesto insaturado más sencillo. En condiciones fisiológicas de temperatura y presión es un gas incoloro, de aroma similar al del éter etílico, más liviano que el aire, sumamente inflamable y volátil; muy hidrosoluble. Es biosintetizado a partir de la S-Adenosil Metionina (SAM), se produce en casi todos los órganos de las plantas superiores, aunque la tasa de producción dependerá del tipo de tejido y de su estadio de desarrollo. En general las regiones meristemáticas y nodales son las más activas en la biosíntesis de este compuesto. Sin embargo la producción también se incrementa durante la abscisión foliar, senescencia de las flores y maduración de frutos (Ramírez, 2013).

• Ácido Abscísico

El ácido abscísico (ABA) en la mayoría de los casos produce un efecto negativo en los cultivos *in vitro* ya que actúa inhibiendo el crecimiento celular y la fotosíntesis, ha sido propuesto para jugar un papel regulador en respuestas fisiológicas tan diversas como el letargo, abscisión de hojas y frutos y frente al estrés hídrico, por lo tanto tiene efectos contrarios a las hormonas de crecimiento (Ramírez, 2013), sin embargo en determinados casos promueve la maduración de embriones, y en cultivos de células en suspensión facilita la sincronización de la división celular (Recalde, 2006).

2.12.6. Agentes gelificantes

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende esencialmente del medio de cultivo empleado el mismo que debe ajustarse a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante, y al sistema de cultivo que se realizará. Los agentes gelificantes proporcionan al

medio de cultivo dureza y firmeza, para que alcancen estas dos características se debe tomar en cuenta: el pH y la composición química del medio, además participan en la retención de agua y absorción de compuestos (Ordoñez, 2013).

Se usan varios agentes gelificantes pero los más usados y de mejores resultados son: agar, gelrite y phytigel

- **Agar**

El agar es un polisacárido derivado de algas marinas que son específicamente del género *Gellidium* y *Gracilaria*; que se obtiene en forma de píldora, se usa en la mayoría de los medios nutritivos. Aunque se trata de un producto natural, se lava y purifica durante su elaboración, de manera que prácticamente no contiene materiales tóxicos. Es resistente a la digestión de enzimas propias de las plantas. Generalmente es usado a una concentración que varía entre 0.8 y 1 %, en concentraciones mayores, el medio se vuelve duro y no permite la difusión de nutrientes dentro de los tejidos, (Ordoñez, 2013).

- **Gelrite**

El agente gelificante Gelrite es aislado de la bacteria *Pseudomonas elodea*. Es un compuesto con polisacáridos lineales, en cuya composición consta de ácido glucorónico, glucosa y ramnosa, que requiere la presencia de algunos cationes monovalentes o divalentes para que la solidificación ocurra. Gelrite es un agente gelificante libre de muchos compuestos fenólicos, en comparación con el agar, puede ser usado aproximadamente a la mitad de la concentración de agar; sin embargo, es aconsejable para el cultivo de tejidos una concentración de 0.2 % (Cáceres, 2012).

- **Phytigel**

Es producido a partir de la fermentación bacteriana compuesto de ácido glucorónico, ramnosa y glucosa. La concentración de phytigel que se recomienda usar para la preparación de medio nutritivo varía entre 0.25 – 0.40 %, debe ser añadir al medio de cultivo en agitación a temperatura ambiente, este agente gelificante colabora en la detección de contaminación microbiana por su apariencia transparente y ha demostrado ser un sustituto superior al agar, (Sigma, s/f) citado por (Cáceres, 2012).

2.13. pH del medio

(Ramírez, 2013) menciona que el pH del medio nutritivo es usualmente ajustados en el rango 5.0 a 6.5. En un pH bajo (menor de 4.5) el agar no gelifica correctamente o alto (mayor que 7.0) la gelificación puede ser demasiado firme, lo que repercute en el crecimiento y desarrollo normal de plantas *in vitro* ya que puede altera la función de las membranas celulares o el pH balanceado del citoplasma. El pH también controla que las sales permanezcan en forma soluble e influye en la absorción de los ingredientes del medio y reguladores de crecimiento (Ortega, 2000) citado por (Ordoñez, 2013).

2.14 Esterilización de los medios de cultivo

En la esterilización el método más utilizado es el autoclavado. La autoclave emplea el vapor de agua saturado, a una presión de 15 libras lo que permite que la cámara alcance una temperatura de 121 °C. El tiempo de esterilización usualmente es de 20 minutos, sin embargo, en algunas

oportunidades, dadas las características del material, es necesario variar el tiempo de esterilización. Entre las ventajas de este método de esterilización tenemos que no deja residuos, las autoclaves modernas son sencillas de manejar y es un método rápido de esterilización (Gutiérrez, 2008), es uno de los métodos más utilizados, la esterilización se puede realizar ya sea sobre el volumen total autoclavándolo en un solo recipiente o dispensando previamente el medio de cultivo en los envases respectivos (Izquierdo, 2006).

2.15. Conservación de los medios de cultivo

Idealmente, el medio de cultivo autoclavado debe ser guardado el menor tiempo posible y si se desea conservar, debe hacerse siempre en recipientes previamente esterilizados y en oscuridad para evitar cambios de pH, a temperatura ambiente se puede almacenar de una a dos semanas y a bajas temperaturas (5 °C) se puede aumentar el tiempo de almacenamiento a un mes; sin embargo esto promueve una excesiva condensación en el interior de los recipientes. Los medios de cultivo que contienen reguladores de crecimiento y en especial AIA se degradan en periodos más cortos (Izquierdo, 2006).

2.16. Condiciones ambientales para la incubación

Las condiciones ambientales juegan un papel importante dentro del proceso de micropropagación vegetal; los factores más estudiados han sido el fotoperiodo, temperatura y humedad (Cárdenas, 2011).

2.16.1. Fotoperiodo

El fotoperiodo influencia en las plantas de dos maneras: la primera regulando la cantidad de energía radiante interceptada y la segunda controlando el mecanismo a través del cual las plantas son capaces de reconocer cambios ambientales (Izquierdo, 2006).

En el cultivo *in vitro*, para suministrar la radiación se debe tomar en cuenta la cantidad de luz (irradiación), la calidad (espectro) y la alternancia de los ciclos de luz con los de la oscuridad o fotoperiodo, ya que con base en el tiempo de exposición de los explantes influye la diferenciación de los órganos, además de jugar un papel importante en la acción de los reguladores de crecimiento (Ordoñez, 2013; Jaramillo, 2013). Generalmente el fotoperiodo más utilizado para trabajar con especies de climas templados y tropicales dentro del cuarto de crecimiento es el de 16 horas de luz y 8 de oscuridad (Izquierdo, 2006). La experiencia obtenida a lo largo de las investigaciones, demuestra que la luz de los tubos fluorescentes de luz blanca, las mismas que son pobres en longitudes de onda larga, es suficiente para obtener resultados favorables (Marín, 1997).

2.16.2. 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 temperatura en el que se produce el crecimiento óptimo, y este puede variar en función del genotipo, órgano del que se ha obtenido el explante, época del año, edad de la planta madre, fotoperiodo. En general los cultivos son incubados a una temperatura de 25 a 28 °C (Ramírez, 2013; Jaramillo, 2013). Se han realizado pruebas variando los regímenes de temperatura en el día y

en la noche, y se ha encontrado únicamente en un reducido número de especies que tal variación es ventajosa (Jácome, 2011).

2.16.3. Humedad

Es un parámetro físico al que se debe tener muy en cuenta, este varía dependiendo de la cobertura utilizada para sellar el recipiente, por lo tanto si el sello es hermético, la humedad relativa va a ser 100 %, sin embargo si el sello permite un intercambio gaseoso, la humedad interna podría llegar a descender a niveles cercanos a 50 %, causando una deshidratación masiva del medio de cultivo, variando la concentración de sus componentes con el riesgo de que lleguen a ser tóxicos (Orozco, 2012).

2.17. Cultivo *in vitro* de forestales

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) citado por (Remache, 2011).

Las especies leñosas presentan un tejido lignificado debido a la presencia de la lignina, compuesto orgánico que impregna las paredes de los vasos de conducción. La compleja conformación de las distintas células en combinación con la rigidez propia de las paredes celulares le confiere al tejido leñoso su fortaleza; por lo tanto presentan resistencia a ser multiplicadas *in vitro* (Ayala, 2011).

Las micropropagación han demostrado ser una importante alternativa para la solución de algunos de los problemas anteriormente referidos. 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. Es posible la producción de brotes adventicios en especies leñosas a partir de callos, pero es extremadamente difícil en las coníferas (Remache, 2011).

Castro *et al.* (2003) citado por Ramírez (2013) expresan que, mediante el cultivo *in vitro* de una sola semilla se pueden obtener gran cantidad de brotes; es decir, los individuos se multiplican. La micropropagación es una herramienta que permite altas tasas de multiplicación en corto tiempo, haciendo posible una producción programada durante todo el año y facilitando el control de organismos patógenos. Este método facilita el establecimiento de plantaciones clonales industriales con características homogéneas en un corto plazo; también puede representar una alternativa para rescatar especies valiosas que van camino a la extinción (Sharry, 2008) citado por (Ramírez, 2013).

En este sentido, una de las principales ventajas de la micropropagación es la capacidad potencial de desarrollar protocolos de propagación optimizados para multiplicar árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores (Cárdenas, 2011). 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 y aclimatación (Remache, 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Características del sitio experimental

3.1.1. Ubicación y características climáticas

La investigación se efectuó en el Instituto de Biotecnología Agrícola (IBA) de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador (FCA-UCE), ubicado en el Campus Universitario de Quito, cuya ubicación geográfica es la siguiente⁴:

Provincia: Pichincha

Cantón: Quito

Parroquia: Santa Prisca

Latitud: 00° 11' 92" Sur

Longitud: 78° 30' 41" Oeste

Altitud: 2 874 msnm

3.2. Características del cuarto de cultivo

La mayor parte del trabajo se realizó bajo condiciones de laboratorio y, los ensayos permanecieron en el cuarto de cultivo en condiciones de crecimiento controladas descritas a continuación por Roca y Mroginski (1993):

3.2.1. Laboratorio

Temperatura promedio anual: 17 °C

Humedad relativa: 80 %

3.2.2. Cuarto de cultivo

Temperatura: 26 °C

Humedad relativa: 60 %

Intensidad luminosa: 4 000 lux

Fotoperiodo: 16/8

3.3. Características de la zona de recolección

El Parque Ecológico “Cachaco” se localiza en la parroquia de Amaguaña ubicada en la región sierra, a 28 km al sur occidente del Distrito Metropolitano de Quito, Provincia de Pichincha, en el acogedor Valle de los Chillos a 2 683 metros sobre el nivel del mar. Se encuentra asentada en el margen derecho del Río San Pedro y en las faldas de la parte Norte de vestuoso monte Pasochoa (GAA, 2011).

⁴ Datos del Laboratorio de Biotecnología Agrícola. FCA-UCE. 2010.

Sus límites son: al norte Conocoto; al sur Uyumbicho (Cantón Mejía); al este Cantón Rumiñahui y al oeste Uyumbicho, Cutuglagua y Quito Urbano. Su clima tiene una temperatura promedio entre los 17 °C y 18 °C. Sus coordenadas geográficas aproximadas son: latitud 0°22'S y longitud 78°27'O (GAA, 2011).

3.4. Materiales

3.4.1. Material vegetal

Se utilizó segmentos nodales (parte del epicótilo) con yemas axilares de plántulas de Yalomán, de dos meses de edad provenientes de semillas germinadas *in vitro*, que fueron colectadas en el Parque Ecológico Cachaco, en la provincia de Pichincha de árboles sanos, vigorosos, libres de plagas y enfermedades.

3.4.2. Material de laboratorio

1. Cristalería

- Botellas de vidrio de 500 ml
- Frascos conserveros de 250 ml
- Matraces (100, 500 y 1 000 ml)
- Probetas (10, 25, 50, 500 y 1000ml)
- Vasos de precipitación (1 000 ml)
- Varilla de agitación
- Cajas de vidrio petri
- Embudos

2. Reactivos

- Ácido clorhídrico
- Ácido indolbutírico (IBA)
- Ácido naftalenacético (ANA)
- Alcohol potable al 96 %
- Carbón activado
- Hipoclorito de sodio
- Hidróxido de sodio
- Plant protector tissues (PPT)
- Tween 20
- 6 - Bencilaminopurina (BAP)

3. Equipos y materiales

- Agitador magnético y orbital
- Autoclave horizontal y vertical
- Balanza de precisión
- Bandejas plásticas
- Calculador

- Calefactor
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Canastillas plásticas
- Cinta adhesiva
- Cuaderno universitario
- Cuarto frío
- Destilador de agua
- Esferos
- Estantes
- Estufa
- Espátulas metálicas y plásticas
- Fundas de polietileno
- Fundas ziploc
- Guantes y mascarilla desechables
- Guantes de látex
- Hojas de bisturí
- Horno de microondas
- Impresora
- Lápiz
- Mango para bisturí #4
- Mechero de Bunsen
- Micropipetas (1000ul, 5000ul)
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Papel milimetrado
- Pinzas
- Pipetas graduadas (10ml, A+-0.1ml)
- Picetas
- Potenciómetro
- Puntas para micropipetas
- Probetas
- Rollo pack
- Servilletas de papel
- Termómetro ambiental

3.4.3. Medios de cultivo

- Woody Plant Medium (WPM).
- Woody Plant Medium a la mitad de la concentración de sales (WPM^{1/2}).
- Murashige & Skoog a la mitad de la concentración de sales (MS^{1/2}).
- Murashige & Skoog ^{1/4} concentración de sales (MS^{1/4}).

3.5. Factores en estudio

Los factores estudiados fueron medios de cultivo (M), concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), y concentraciones de ácido indolbutírico (IBA), los mismos que se analizaron en dos fases descritas a continuación:

3.5.1. Fase I. Brotación de yemas

3.5.1.1 Medios de cultivo (M)

Se empleó los medios basales de Murashige & Skoog - MS- (1962), diluido a la mitad de la concentración de sales y el medio Woody Plant Medium -WPM- formulado por Lloyd & McCown (1980), (**Anexos 1 y 2**). Obteniendo así la siguiente codificación:

Murashige y Skoog (MS^{1/2}): **m1**
Woody Plant Medium (WPM): **m2**

3.5.1.2. Concentraciones de BAP (B)

Roca y Mroginski (1993) y Domínguez (2011) citados por Jaramillo (2013) afirman que, las citoquininas más empleadas en la instauración de los cultivos son: 6-furfurilaminopurina (KIN), 6-bencil amino purina (BAP), y zeatina (ZEA) indican que se aumenta a esta lista a thiadiazuron (TDZ), 2-Isopentiladenina (2iP), y resaltan que la citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) presenta mejores respuestas pues promueve un mayor número de brotes y longitud, lo que se convierte en un mayor coeficiente de multiplicación.

Suárez *et al.* (2006) sugieren la adición de 1.2 ppm de 6-benciladenina (BAP), para la brotación de yemas axilares de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC); de allí que, para la investigación no se planteó los mismos niveles sugeridos por los autores anteriormente mencionados, ya que en ensayos preliminares estas dosis indujeron la formación de callo tanto en la base como en el ápice de los explantes de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don) resultando ser dosis elevadas por mostrar tal efecto, sin obtener resultados. En tanto Cáceres (2012) en el estudio de cholán (*Tecoma stans*) sugiere la adición de 0.9 ppm de BAP para obtener mejores tasas de brotación. Por lo mencionado las dosis de BAP se redujeron estableciéndose así diferentes niveles y se estudiaron las siguientes concentraciones de hormona:

0.0 ppm BAP: **b0 (Testigo)**
0.3 ppm BAP: **b1**
0.6 ppm BAP: **b2**
0.9 ppm BAP: **b3**

3.5.2. Fase II. Enraizamiento de brotes

3.5.2.1. Medios de cultivo (M)

Se emplearon los medios basales, Woody Plant Medium -WPM- formulado por Lloyd & McCown (1980) a la mitad de su concentración de sales (**Anexos 3**) y de Murashige & Skoog - MS - (1962), preparado a un cuarto de su concentración de sales (**Anexo 4**), a los que se preparó incrementando la fuente de carbono (45 g/l de sacarosa) (Ordoñez, 2013) y como base tuvieron una concentración

de ácido naftalénacético (ANA) de 0.01 ppm y 1 g/l de Carbón activado. Teniendo la siguiente codificación:

Murashige y Skoog (MS^{1/4}): **m1**
Woody Plant Medium (WPM^{1/2}): **m2**

3.5.2.2. Concentraciones de IBA (I)

Las auxinas más utilizadas en el establecimiento de cultivos son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (IBA), (Roca y Mroginski, 1993; Recalde, 2006). Utilizando para esta investigación el ácido indolbutírico (IBA).

Santos (2011) sugieren la adición de 0.01 ppm de ácido indolbutírico (IBA), para la inducción de raíces en yemas axilares de Jacaranda (*Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum); en tanto que Cáceres (2012) en el estudio de cholán (*Tecoma stans*) reporto mejores resultados en los medios de cultivo sin adición de hormonas. En ensayos preliminares para la formación de raíces en explantes de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don) se empleó en los medios de cultivo 0.01 y 0.03 ppm de IBA, dosis que no resultaron efectivas ya que sólo se logró obtener la formación de callo, pero no de raíces. Con los resultados anteriores, se estudiaron las siguientes concentraciones de hormona:

0.0 ppm IBA: **i0 (Testigo)**
0.2 ppm IBA: **i1**
0.4 ppm IBA: **i2**
0.6 ppm IBA: **i3**

3.6. Tratamientos

Los tratamientos para la brotación axilar, resultó de la combinación entre los niveles de los factores en estudio: Medios de Cultivo (M) con dosis de 6-benciaminopurina (BAP) como se muestra en el **Cuadro 1**. Mientras que los tratamientos para la inducción de raíces fue el resultado de la combinación entre los niveles de los factores en estudio: Medios de Cultivo (M) con dosis de ácido indolbutírico (IBA) como se muestra en el **Cuadro 2**.

Cuadro 1. Tratamientos de la Fase I en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

TRATAMIENTOS	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
t1 (Testigo)	m1 b0	Murashige & Skoog (MS ^{1/2}), 0.0 ppm BAP
t2	m1 b1	Murashige & Skoog (MS ^{1/2}), 0.3 ppm BAP
t3	m1 b2	Murashige & Skoog (MS ^{1/2}), 0.6 ppm BAP
t4	m1 b3	Murashige & Skoog (MS ^{1/2}), 0.9 ppm BAP
t5 (Testigo)	m2 b0	Woody Plant Medium (WPM), 0.0 ppm BAP
t6	m2 b1	Woody Plant Medium (WPM), 0.3 ppm BAP
t7	m2 b2	Woody Plant Medium (WPM), 0.6 ppm BAP
t8	m2 b3	Woody Plant Medium (WPM), 0.9 ppm BAP

Cuadro 2. Tratamientos de la Fase II en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

TRATAMIENTOS	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
t1 (Testigo)	m1 i0	Murashige & Skoog (MS ^{1/4}), 0.0 ppm IBA
t2	m1 i1	Murashige & Skoog (MS ^{1/4}), 0.2 ppm IBA
t3	m1 i2	Murashige & Skoog (MS ^{1/4}), 0.4 ppm IBA
t4	m1 i3	Murashige & Skoog (MS ^{1/4}), 0.6 ppm IBA
t5 (Testigo)	m2 i0	Woody Plant Medium (WPM ^{1/2}), 0.0 ppm IBA
t6	m2 i1	Woody Plant Medium (WPM ^{1/2}), 0.2 ppm IBA
t7	m2 i2	Woody Plant Medium (WPM ^{1/2}), 0.4 ppm IBA
t8	m2 i3	Woody Plant Medium (WPM ^{1/2}), 0.6 ppm IBA

3.7. Unidad experimental

3.7.1. Fase I. Brotación de yemas

La unidad experimental para esta fase fue un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad conteniendo 30 ml de medio de cultivo con un explante.

3.7.2. Fase II. Enraizamiento de brotes

La unidad experimental para ésta fase fue un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad conteniendo 30 ml de medio de cultivo con un brote.

3.8. Análisis estadístico: Fase I y II

3.8.1. Diseño experimental

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial 2 x 4.

3.8.2. Número de observaciones

Para cada fase se realizaron seis observaciones por tratamiento en cada fase.

3.8.3. Análisis de la varianza

El esquema del análisis de la varianza (ADEVA) para las fases de brotación e inducción de raíces se presenta en el **Cuadro 3** y **4** respectivamente.

Cuadro 3. Esquema del análisis de la varianza (ADEVA) de la Fase I en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
TOTAL	47
TRATAMIENTOS	7
Medios de cultivo (M)	1
Concentraciones de BAP (B)	3
Lineal	1
Cuadrático	1
Cúbico	1
M x B	3
ERROR EXPERIMENTAL	40

PROMEDIO:	Unidades
COEFICIENTE DE VARIACIÓN:	%

Cuadro 4. Esquema del análisis de la varianza (ADEVA) de la Fase II en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
TOTAL	47
TRATAMIENTOS	7
Medios de cultivo (M)	1
Concentraciones de IBA (I)	3
Lineal	1
Cuadrático	1
Cúbico	1
M x I	3
ERROR EXPERIMENTAL	40

PROMEDIO:	Unidades
COEFICIENTE DE VARIACIÓN:	%

3.8.3.1. Análisis funcional

Al detectar diferencias estadísticas en el análisis de la varianza se realizó para el factor medios de cultivo (M) la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5 %; mientras que, para concentraciones de 6-bencilaminopurina BAP (B), ácido indolbutírico IBA (I) e interacciones se usó la prueba de Tukey al 5 %.

3.8.3.2. Transformación de datos

Algunas de las variables como número de brotes formados y número de raíces, no se distribuyeron normalmente por lo que se recurrió a la transformación de datos usando \sqrt{x} .

3.9. Variables y métodos de evaluación

3.9.1. Fase I. Brotación de yemas

3.9.1.1. Días a la brotación

Se evaluó mediante observaciones continuas de los explantes de cada tratamiento, y se determinó el tiempo en el cual apareció el primer brote a partir del día que se realizó el repique en el medio de cultivo; esta variable fue expresada en número de días (Ordóñez, 2013).

3.9.1.2. Número de brotes formados

Estos datos se registraron transcurridos sesenta días después de haber realizado el repique para brotación, es decir en el segundo subcultivo y en cámara de flujo laminar; esta variable fue expresada en número de brotes formados por explante (Jaramillo, 2013).

3.9.1.3. Longitud de brotes/explante

Se midió con papel milimetrado a los 60 días después de realizar el repique para brotación (segundo subcultivo), esta variable fue expresada en centímetros (cm) (Ordóñez, 2013).

3.9.2. Fase II. Enraizamiento de brotes

3.9.2.1. Días al enraizamiento

Se evaluó mediante observaciones continuas de los brotes de cada tratamiento, y se determinó el tiempo en el cual apareció por lo menos la primera raíz, a partir del día que se realizó el repique en el medio de cultivo; esta variable fue expresada en expresó en número de días. (Cáceres, 2012).

3.9.2.2. Número de raíces

A los cuarenta y cinco días de culminada la fase de enraizamiento, se cuantificó las raíces de cada explante; esta variable fue expresada en número de raíces (Ramírez, 2012).

3.9.2.3. Longitud de raíces

A los cuarenta y cinco días con ayuda de papel milimetrado se midió la longitud de la raíz, desde el sitio de unión al tallo hasta el ápice radicular; esta variable fue expresada centímetros (cm) (Ramírez, 2012).

3.9.2.4. Longitud de la planta

A los cuarenta y cinco días con ayuda de papel milimetrado se midió la longitud de la planta desde la base del tallo hasta el ápice de la planta; esta variable fue expresada centímetros en centímetros (cm) (Cáceres, 2012).

3.10. Costo de producción de las plantas obtenidas *in vitro*

Se realizó el costo de producción por planta hasta la fase de enraizamiento, los tratamientos más eficaces que revelaron los mejores resultados en las variables evaluadas durante el este estudio.

3.11. Método de manejo del experimento

3.11.1. Preparación de medios de cultivo

3.11.1.1. Medio nutritivo para germinación

Para la germinación se preparó 2 000 ml de medio nutritivo medio nutritivo Woody Plant Medium -WPM-, siguiendo las determinaciones del **Anexo 1** y con una base de 1.5 ppm de giberelinas. Una vez preparado el medio se ajustó el pH a 5.6, se precalentó el medio por 2 minutos para añadir los 6 gramos del agar, luego se calentó el medio nutritivo hasta punto de ebullición, a continuación se dispensó 30 ml en cada frasco conservero y se recubrió colocando tapas de papel aluminio. Finalmente se esterilizó en autoclave a 121 °C o 15 psi durante 20 minutos, para la conservación de los medios se almacenó en el cuarto frío a una temperatura de 4 °C.

3.11.1.2. Medio de cultivo para brotación

Para la fase de brotación se preparó 1 000 ml de cada medio nutritivo (MS½ y WPM) tomando como referencia los **Anexos 1 y 2**. En un vaso de precipitación de 1 000 ml de capacidad, se vertió 800 ml de agua destilada, con una micropipeta de 5 ml se añadió los volúmenes correspondientes a cada componente de los medios antes mencionados, se agregó sacarosa y se agitó, a esta solución se la dividió en cuatro alícuotas de 200 ml, se adicionó la hormona 6-bencilaminopurina (BAP) con los niveles 0.0, 0.3, 0.6 y 0.9 ppm. Se aforó a 250 ml cada alícuota con el agua destilada faltante, seguidamente se ajustó el pH según el medio, se precalentó por 2 minutos y se adicionó 1.75 g de agar en cada concentración se agito, luego se calentó hasta punto de ebullición, consecutivamente se dispensó en los frascos conserveros debidamente rotulados por cada concentración y se los cubrió con tapas de papel aluminio. Finalmente se esterilizó en autoclave a 121 °C o 15 psi durante 20 minutos, para conservar los medios se almacenó en el cuarto frío a una temperatura de 4 °C.

3.11.1.3. Medio de cultivo para enraizamiento

Para la fase de enraizamiento se preparó 1 000 ml de cada medio nutritivo tomando como referencia los **Anexos 4 y 5**, en un vaso de precipitación de 1 000 ml de capacidad se vertió 800 ml de agua destilada y con la ayuda de una micropipeta se añadió todas los componentes propios de los medios de cultivo, antes mencionados, pero considerando las modificaciones con respecto a la cantidad de sacarosa (45 g) , la misma que fue colocada y se agitó, a esta solución se la dividió en cuatro alícuotas de 200 ml, en cada una de ellas se colocó como base la hormona base ácido naftalénacético (ANA) de 0.01 ppm y el carbón activado (0.25 g por alícuota) se adicionó la hormona ácido indolbutírico con los niveles 0.0, 0.2, 0.4 y 0.6 ppm y se ajustó el pH según el medio, se precalentó por 2 minutos para añadir 1.63 g de agar en cada concentración, se agito y se llevó a punto de ebullición, posteriormente se dispensó en los frascos conserveros debidamente rotulados y se cubrió con tapas de papel aluminio. Finalmente se esterilizó en autoclave a 121 °C o 15 psi durante 20 minutos, para conservar los medios se los almaceno en el cuarto frío a una temperatura de 4 °C.

3.11.2. Obtención de material vegetal

3.11.2.1. Selección de árboles y transporte de semillas

Se colectó cápsula de Yalomán (*Delostoma integrifolium*) en el Parque Ecológico “CACHACO” en donde se seleccionó fenotípicamente árboles vigorosos, sanos, con una altura promedio de 5 metros y representativos de la zona con gran cantidad de cápsulas y abundante follaje, de los cuales se recolectó las cápsulas maduras, sanas, libres de insectos y enfermedades, en fundas ziploc de cerrado hermético las mismas que fueron etiquetadas, en las cuales se registró las características del árbol del cual se obtuvo el material y la fecha de recolección; procurando colocar 20 cápsulas en cada una de ellas, una vez en el laboratorio se las clasificó según el tamaño y color; y se las colocó en el cuarto frío.

3.11.2.2. Limpieza y almacenamiento de cápsulas

Se tomó una funda y se retiró las cápsulas las mismas que fueron enjuagadas con abundante agua potable hasta dejarlas completamente limpias, el último enjuague se lo hizo con agua destilada. Se colocaron las cápsulas en vasos plásticos de precipitación y se las selló con tapas de aluminio y rolo pack y se las almaceno en el cuarto frío a 4 °C.

3.11.2.3. Lavado de cápsulas

Se retiró el recipiente con las cápsulas del cuarto frío, y se tomó 10 cápsulas a éstas se las enjuagó con abundante agua potable una vez limpias se realizó, un nuevo enjuague con agua potable más 5 g de detergente comercial (1 cucharadita) y 3 gotas de tenso activo Tween 80 al vaso de precipitación, en el agitador orbital se mantuvo en constante agitación durante 10 minutos.

Cumplido el tiempo de inmersión de las cápsulas en la solución con detergente y tenso activo, se realizó cinco enjuagues dos veces con agua corriente y los tres último con agua destilada se escurrió el agua del recipiente y finalmente se llevó a las cápsulas a la cámara de flujo laminar para iniciar con el proceso de desinfección.

3.11.2.4. Desinfección de cápsulas

Dentro de la cámara de flujo laminar previamente esterilizada se introdujo el vaso de precipitación que contenía a las cápsulas, se realizó la desinfección con 50 ml de hipoclorito de sodio (NaClO) más 150 ml de agua destilada estéril y se las agitó constantemente por diez minutos, transcurrido el tiempo indicado se escurrió el compuesto y se realizó cinco enjuagues sucesivos de 1 minuto cada uno, con agua destilada esterilizada; al culminar la desinfección se tomó una a una a las cápsulas y se las secó con una servilleta estéril posteriormente a la cápsula se roció alcohol potable al 96 % y se las flameó.

3.11.2.4.1 Tratamiento pregerminativo de semillas de “Yalomán” (*Delostoma integrifolium* D. Don)

Sobre papel absorbente (servilleta) previamente esterilizada, se coló la cápsula (que fue flameada) y con la ayuda de pinzas esterilizadas y bisturí (flameados con alcohol potable al 96 %) se las abrió para extraer las semillas, las mismas que fueron colocadas en un recipiente y se colocó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30 % hasta cubrirlas totalmente y se las agito constantemente durante una

hora, una vez cumplido el tiempo establecido se escurrió el compuesto y se realizó un enjuague con agua destilada esterilizada para eliminar los residuos del peróxido de hidrógeno (Autor).

3.11.2.5. Siembra de semillas

Sobre papel absorbente (servilleta) previamente esterilizado se coló las semillas y con la ayuda de pinzas esterilizadas y bisturí (flameados con alcohol potable al 96 %) se colocó tres semillas y se procedió a retirar las alas (tejido que recubre a la semilla) y se las sembró en 30 ml de medio de cultivo Woody Plant Medium contenido en un frasco conservero de 250 ml, al mismo que se lo selló con rollo pack y se etiquetó; terminada la siembra se llevaron los frascos al cuarto de cultivo, para proveerles de condiciones adecuadas [temperatura (24 °C), humedad relativa (60 %), intensidad lumínica (4 000 lux) con un fotoperiodo de 16 horas de luz] (Roca y Mroginski, 1993).

3.11.3. Obtención de explantes

3.11.3.1. Repique para brotación (Fase I)

El repique se realizó en un ambiente estéril y siguiendo el mismo procedimiento para todas las observaciones de cada tratamientos en estudio. Dentro de cámara de flujo laminar, se extrajo las plántulas germinadas *in vitro* de dos meses de edad, distribuyéndolas en servilletas estériles colocadas en la parte central de la cámara de flujo laminar. Con un bisturí se separó la radícula y la parte apical dejando únicamente parte del epicótilo, obteniendo explantes de 1.5 a 2.0 centímetros los mismos que portaron dos yemas axilares. Luego se colocó un explante en cada frasco de vidrio que contenía 30 ml de medio de cultivo, posteriormente se sellaron los frascos con rollo pack, finalmente se identificaron los frascos y se los colocó en el cuarto de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura (26 °C), humedad (60 %) y fotoperiodo (16/8 horas) (Roca y Mroginski, 1993), donde permanecieron 60 días hasta que desarrollen brotes.

Transcurridos 30 días (primer subcultivo), se repicaron los explantes a nuevos medios de cultivo con las mismas concentraciones de hormonas para completar los 60 días (segundo subcultivo), tiempo requerido para la obtención de brotes y toma de datos, este repique se realizó para mantener a los explantes con una fuente de nutrientes y continuar con el proceso de multiplicación.

3.11.5. Repique para enraizamiento (Fase II)

En cámara de flujo laminar, los brotes obtenidos de la brotación (Fase I) que alcanzaron un tamaño igual o mayor a un centímetro, fueron transferidos a medios de cultivo $MS^{1/4}$ y $WPM^{1/2}$, de consistencia semisólida, conteniendo las formulaciones del regulador de crecimiento indicado (ácido indolbutírico IBA) para inducir la formación de raíces, en cada unidad experimental se colocó un brote.

Los explantes permanecieron en el cuarto de cultivo bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente y fueron evaluados de acuerdo a las variables establecidas, para los días al enraizamiento revisiones periódicas; y para las variables de longitud de la raíz y de la planta a los cuarenta y cinco días.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fase I: Brotación de yemas

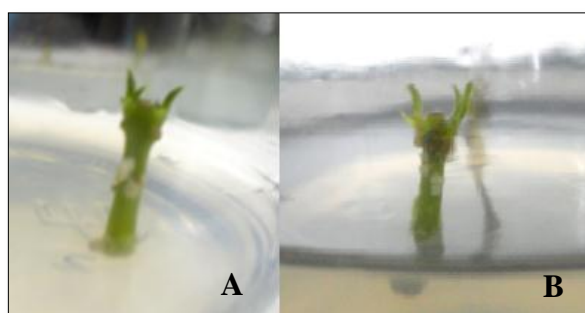
4.1.1. Días a la brotación

En el análisis de la varianza para la variable días a la brotación **Cuadro 5**, se detectó diferencias significativas únicamente para la interacción M x B. El promedio general fue de 9.54 días a la brotación y se obtuvo un coeficiente de variación de 17.85 %, que se considera como muy bueno para este tipo de investigaciones (González, 2010), lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.

Cuadro 5. Análisis de la varianza para días a la brotación, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS
		Días a la brotación
TOTAL	47	---
TRATAMIENTOS	7	4.56 ^{ns}
Medios de cultivo (M)	1	1.33 ^{ns}
Concentraciones BAP (B)	3	0.31 ^{ns}
Lineal	1	0.20 ^{ns}
Cuadrático	1	0.02 ^{ns}
Cúbico	1	1.20 ^{ns}
M x B	3	9.89*
ERROR EXPERIMENTAL	40	2.90

PROMEDIO:	9.54 días
COEFICIENTE DE VARIACIÓN:	17.85 %



Fotografía 1: (A) Brotación en MS½. (B) Brotación en WPM.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 6. Promedios de días a la brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DE DÍAS A LA BROTACIÓN (días)
m2	Woody Plant Medium (WPM)	9.38
m1	Murashige & Skoog (MS ^{1/2})	9.67

A pesar de que en el análisis estadístico no se detectó significancia estadística para la variable días a la brotación en la evaluación de medios de cultivo, **Cuadro 6** y **Gráfico 1**, se puede observar que el medio Woody Plant Medium (m2) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 9.38 días a la brotación, similar a lo que obtuvo Cáceres (2012), en el estudio de cholán (*Tecoma stans*), en donde reporto mejores resultados en el medio de cultivo WPM con un promedio de 6.65 días a la brotación. Según Larraburu *et al.* (2012); Azofeifa (2009); Ríos y Corella (1999) citados por Cáceres (2012) estos resultado puede deberse a la composición del este medio de cultivo ya que WPM contiene sulfato cúprico el cual es ausente en el medio MS ¹/₂, siendo este un componente necesario para mejorar la respuesta morfogénica en el cultivo de tejidos, el cobre es también un cofactor enzimático, que ayuda en los procesos metabólicos como la fotosíntesis, respiración, regulación hormonal y metabolismo de compuestos secundarios.

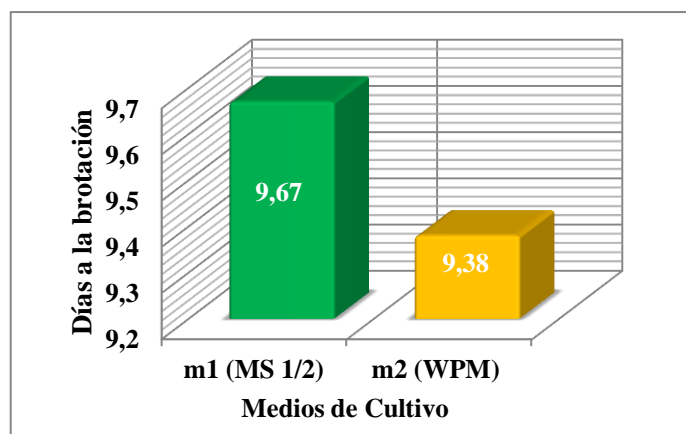


Gráfico 1. Promedios de días a la brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 7. Promedios de días a la brotación para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE 6-BENCILAMINOPURINA (BAP)	PROMEDIO DE DÍAS A LA BROTACIÓN (días)
b2	0.6 ppm	9.42
b3	0.9 ppm	9.42
b0	0.0 ppm	9.50
b1	0.3 ppm	9.75

Para la variable días a la brotación para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), **Cuadro 7**, se observa que las concentraciones 0.6 ppm de BAP (b2) y 0.9 ppm de BAP (b3) obtuvieron la mejor respuesta con un promedio de 9.42 días. Estos resultados coinciden con lo mencionado por Cáceres (2012) en el estudio de cholán (*Tecoma stans*) quien manifiesta que en concentraciones de 0.6 ppm de BAP la brotación es mucho más rápida obteniendo un promedio de 6.72 días, en tanto que en concentraciones más bajas de BAP la brotación es más tardía. El **Gráfico 2**, muestra que a medida que la concentración de BAP aumenta los días a la brotación disminuyen, pero se estabilizan en la concentración 0.6 ppm de BAP (b2) y que si la concentración de BAP se incrementa los resultados se mantendrán.

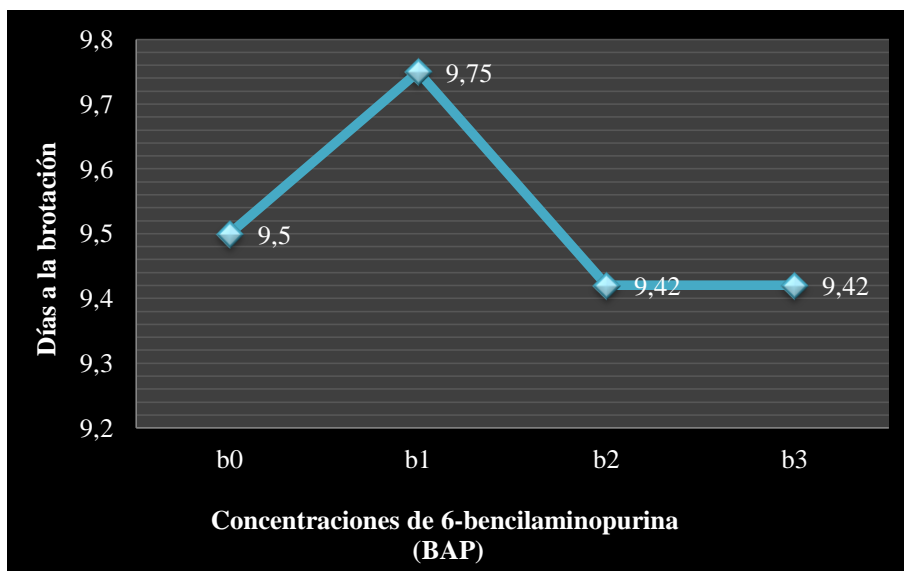


Gráfico 2. Promedios de días a la brotación para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.
Autor: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 8. Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE 6-BENCILAMINOPURINA (BAP)	PROMEDIO DE DÍAS A LA BROTACIÓN (días)
m2b2	WPM+ 0.6 ppm BAP	8.00 a
m1b0	MS½ + 0.0 ppm BAP	8.67 a
m2b3	WPM+ 0.9 ppm BAP	9.33 a
m1b3	MS½ + 0.9 ppm BAP	9.50 a
m1b1	MS½ + 0.3 ppm BAP	9.67 a
m2b1	WPM+ 0.3 ppm BAP	9.83 a
m2b0	WPM+ 0.0 ppm BAP	10.33 a
m1b2	MS½ + 0.6 ppm BAP	10.83 a

Tukey al 5 % para la interacción de medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina (MxB), **Cuadro 8**, detectó un rango de significancia estadística. Encabezando el rango con menor número de días a la brotación WPM más 0.6 ppm BAP (m2b2) con un promedio de 8.00 días; mientras que la interacción MS^{1/2} más 0.6 ppm BAP (m1b2) ocupó el final del rango con 10.83 días, los promedios de la interacción MxB se muestran en el **Gráfico 3**, el resultado obtenido coincide con lo mencionado por Roca y Mroginski (1993) y Cáceres (2012), quienes expresan que WPM está especialmente indicado para la micropropagación de especies leñosas, por presenta una concentración baja de sales, y adicionándole la dosis correcta de hormonas forma un balance adecuado para la emisión temprana de brotes.

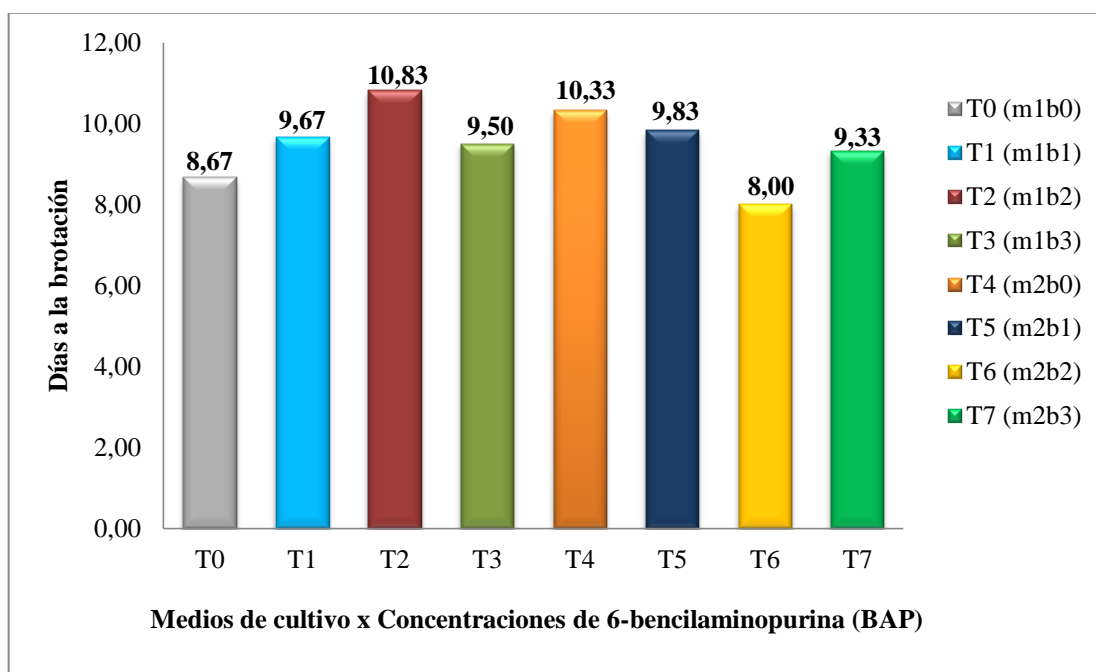


Gráfico 3. Promedios de días a la brotación para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.
Autor: Isabel Loya, 2014.

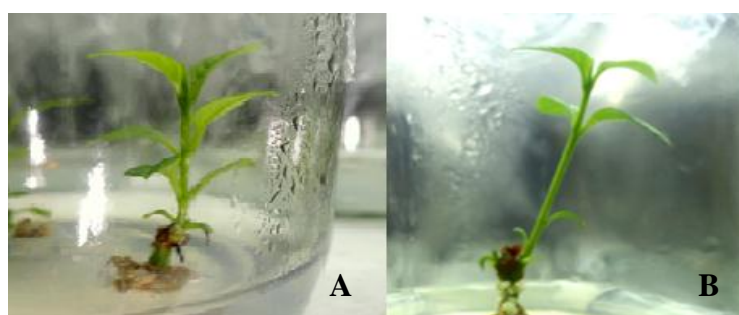
4.1.2. Número de brotes/explante

En el Análisis de la varianza para la variable número de brotes por explante, **Cuadro 9**, no se detectó diferencia estadística para ninguno de los factores. El promedio general fue de 1.12 brotes por explante, con un coeficiente de variación de 16.72 %, que se considera como muy bueno para este tipo de investigaciones (González, 2010), lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.

Cuadro 9. Análisis de la varianza para la variable número de brotes por explante, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS
		Número de brotes/explante
TOTAL	47	---
TRATAMIENTOS	7	0.04 ^{ns}
Medios de cultivo (M)	1	0.06 ^{ns}
Concentraciones BAP (B)	3	0.06 ^{ns}
Lineal	1	0.05 ^{ns}
Cuadrático	1	0.13 ^{ns}
Cúbico	1	0.01 ^{ns}
M x B	3	0.01 ^{ns}
ERROR EXPERIMENTAL	40	0.04

PROMEDIO:	1.12 brotes/explante
COEFICIENTE DE VARIACIÓN:	16.72 %



Fotografía 2: (A) Número de brotes en MS½. (B) Número de brotes en WPM

Fuente: La investigación.
Autor: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 10. Promedios del número de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DEL NÚMERO DE BROTOS/EXPLANTE
m2	Woody Plant Medium (WPM)	1.16
m1	Murashige & Skoog (MS½)	1.09

Para la variable número de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo, **Cuadro 10** y **Gráfico 4**, se observa que el medio Woody Plant Medium (m2) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 1.16 brotes/explante, pues como explica Trujillo (2008), las plantas leñosas suelen ser sensibles a las altas concentraciones de sales, por este motivo las concentraciones de sales que

WPM posee, al ser más bajas hace que el explante se adapte satisfactoriamente y se obtenga mejores resultados que en el medio basal MS ½.

Abedini *et al.*, (2000) indican que, las altas concentraciones de sales provoca en los explantes una excreción de compuestos fenólicos, los que disminuyen en forma sustancial, la expresión del material vegetal. Cáceres (2012), menciona que el medio WPM además contiene sulfato cúprico siendo este un componente necesario para mejorar la respuesta morfogénica en el cultivo de tejidos. Del mismo modo Nieto y Valdivieso (2013), corroboran lo mencionado, al trabajar con *Fichsia pilaloensis* y *Fichsia hybrida*, el medio de cultivo WPM permitió desarrollar el mayor número de brotes.

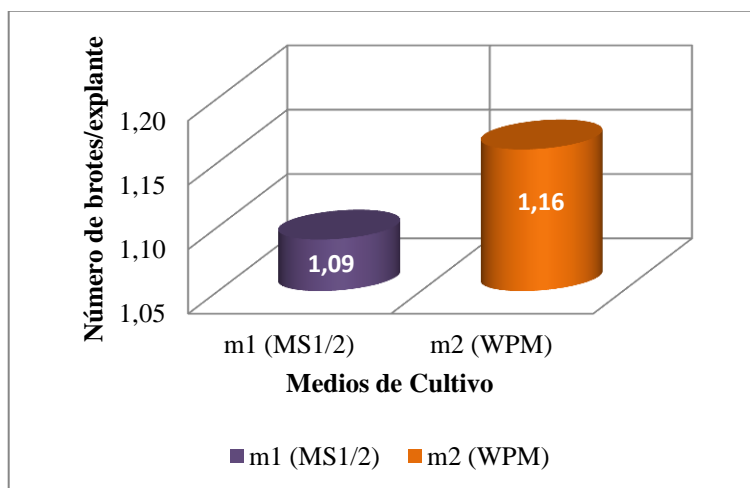


Gráfico 4. Promedios del número de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.
Autor: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 11. Promedios del número de brotes por explante para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE 6-BENCILAMINOPURINA (BAP)	PROMEDIO DEL NÚMERO DE BROTES/EXPLANTE
b2	0.6 ppm	1.21
b1	0.3 ppm	1.14
b3	0.9 ppm	1.10
b0	0.0 ppm	1.03

Para la variable número de brotes por explante en el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), **Cuadro 11**, se observa que, 0.6 ppm BAP (b2) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 1.21 brotes por explantes. Contrastando estos resultados Santos (2011) en el estudio de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum en donde el número de brotes variaron entre 1 y 2 por explante. Del mismo modo Delgadillo *et al.* (2013), mencionan que en especies de roble carballo *Quercus robur* y *Quercus petraea*, las concentraciones de BAP 0.6 ppm favoreció a la

multiplicación, en donde tres brotes fueron producidos por explante. En tanto Suárez *et al.* (2006) en la evaluación de *Tabebuia rosea* Bertol DC señalan que, a niveles de 0.5 ppm de BAP los resultados de brotación son bajos o casi nulos, atribuyendo este comportamiento a, que el número de brotes está influenciado por la cantidad de hormona que se encuentra en el medio.

Se detecta además en el **Gráfico 5**, que existe tendencia cuadrática; es decir que, cuando las concentraciones de BAP en *Delostoma integrifolium* D. Don, tienen un nivel adecuado (0.6 ppm de BAP) los explantes emiten mayor número de brotes, en tanto que si la concentración es superior produce un efecto tóxico, que se caracteriza por la disminución de la brotación. Ratificando este resultado Delgado *et al.* (2013) en *Quercus robur* donde en concentraciones de BAP superior a 0.8 ppm estimuló la callogénesis y vitrificación.

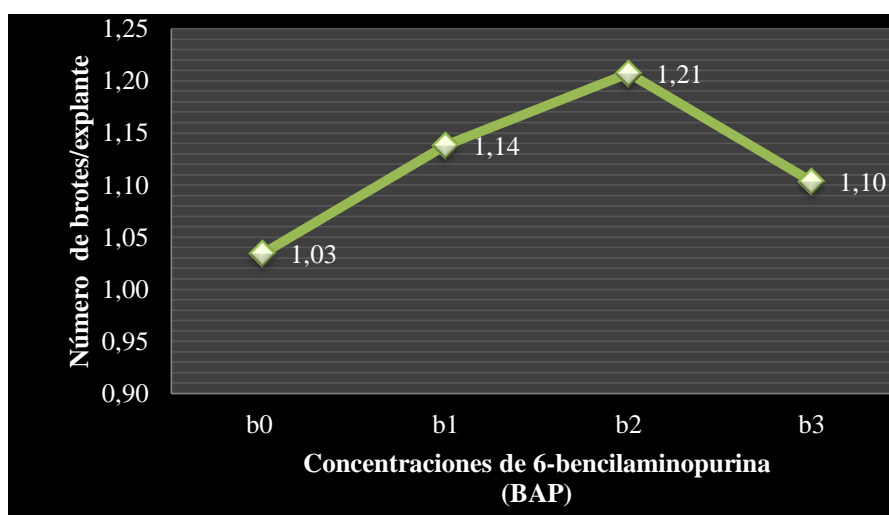


Gráfico 5. Promedios del número de brotes por explante para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.
Autor: Isabel Loya, 2014.

Suárez *et al.*, (2006) mencionan que no solamente el suplemento combinado con citocininas genera buenos resultados, sino la combinación de citocininas y auxinas también tiene efectos favorables en la multiplicación de algunas especies leñosas, como lo reportado por Duarte *et al.* (2011) quienes en, *Jacaranda mimosifolia* obtuvieron los mejores resultados cuando los explantes fueron cultivados en un medio de cultivo suplementado con TDZ, solo o en combinación con BA; en donde los explantes cultivados brindaron 2.6 y 2.7 brotes por explante.

Abdelnour y Muñoz (2005) en la micropogación de *Tectona grandis* L.f, observaron que cuando se combinó BAP (2 mg/l) con AIA (0,02 mg/l) se obtuvo un incremento del porcentaje de brotación de 71 % a 80 % y de la producción de brotes por explante de 2, 3 a 4.6. De similar manera Gordón (2012), ratifica estos resultados al utilizar 1mg/l BAP; 0.01 mg/l AIA en donde obtuvo hasta cuatro brotes por explante en *Hibiscus rosa-sinensis*. Billard y Lallana (2005), utilizaron dosis de 0.05 mg/l de AIA en combinación con 0.5 mg/l de kinetina para multiplicar meristemas axilares obtenidos de plantas de *Eucalyptus dunnii* regeneradas en condiciones *in vitro* en donde obtuvieron mayor número de brotes.

Cuadro 12. Promedios de número de brotes por explante para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	INTERACCIONES M x B	PROMEDIO DE NÚMERO DE BROTOS/EXPLANTE
m2b2	WPM + 0.6 ppm BAP	1.28
m2b1	WPM + 0.3 ppm BAP	1.14
m1b2	MS½ + 0.6 ppm BAP	1.14
m1b1	MS½ + 0.3ppm BAP	1.14
m2b3	WPM + 0.9 ppm BAP	1.14
m1b3	MS½ + 0.9 ppm BAP	1.07
m2b0	WPM + 0.0 ppm BAP	1.07
m1b0	MS½ + 0.0 ppm BAP	1.00

Para la variable número de brotes por explante en la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina (MxB), **Cuadro 12** y **Gráfico 6**, se observa que, WPM más 0.6 ppm BAP (m2b2) presentan el mayor número de brotes por explante con 1.28 brotes, estos resultados se ajustan con la investigación realizada por Cáceres (2012) en cholán (*Tecoma stans*) quien empleo el medio WPM en combinación con bajas concentraciones de BAP (0.6ppml) obteniendo 2.29 brotes por explante. Del mismo modo Daquinta *et al.* (s.f) en la micropropagación en *Tectona grandis* L. F, justifica estos resultados ya que al trabajar con dosis similares de BAP obtuvo 1.4 brotes por explante y manifiesta también que en dosis relativamente altas de BAP puede generar la formación de callo tanto en la base de explante como en el ápice del mismo, viéndose comprometida la formación de brotes.

Por otra parte, el número de brotes obtenidos es adecuado, considerando que Amutha *et al.* (2006) citado por Jaramillo (2013) argumentan que las tasas de multiplicación reportadas en la mayoría de especies forestales no son altas, esto se debe a su naturaleza recalcitrante lo que provoca que el crecimiento en condiciones *in vitro* sea mucho menor en comparación con otras plantas especialmente con aquellas de consistencia herbácea.

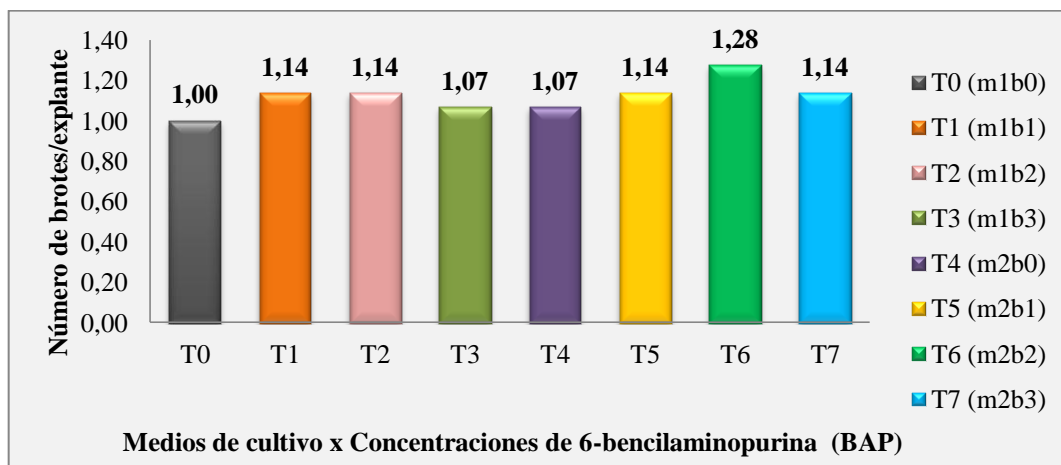


Gráfico 6. Promedios del número de brotes por explante para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.
Autor: Isabel Loya, 2014.

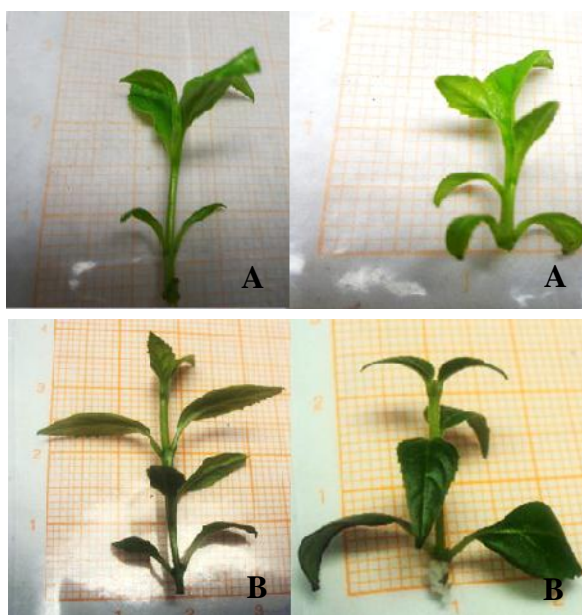
4.1.3. Longitud de brotes/explante

En el Análisis de la varianza para la variable longitud de brotes por explante, **Cuadro 13**, se detectó diferencia altamente significativa para concentraciones de BAP, efecto lineal, efecto cuadrático y para la interacción MxB. El promedio general fue de 1.68 cm por brote, con un coeficiente de variación de 16.68 %, que se considera como muy bueno para este tipo de investigaciones (González, 2010), lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.

Cuadro 13. Análisis de la varianza para la variable longitud de brotes por explante, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS
		Longitud de brotes/explante
TOTAL	47	---
TRATAMIENTOS	7	1.05**
Medios de cultivo (M)	1	0.67 ^{ns}
Concentraciones BAP (B)	3	1.46**
Lineal	1	3.37**
Cuadrático	1	0.79**
Cúbico	1	0.23 ^{ns}
M x B	3	0.78**
ERROR EXPERIMENTAL	40	0.08

PROMEDIO:	1.68 cm/brote
COEFICIENTE DE VARIACIÓN:	16.68 %



Fotografía 3: (A) Longitud de brotes en MS½. (B) Longitud de brotes en WPM.

Fuente: La investigación.
Autor: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 14. Promedios de la longitud de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DE LONGITUD DE BROTOS/EXPLANTE (cm)
m2	Woody Plant Medium (WPM)	1.80
m1	Murashige & Skoog (MS $\frac{1}{2}$)	1.57

Para la variable longitud de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo, **Cuadro 14** y **Gráfico 7**, se observa que el medio Woody Plant Medium (m2) presento la mejor respuesta con una longitud promedio de 1.80 cm por brote. Resultados similares se obtuvieron al trabajar con este medio en la micropropagación de *Cedrela odorata* (Pérez *et al.*, 2001), pues como explica Roca y Mroginski (1993), WPM presenta óptimos resultados, debido a su baja concentración de sales por lo que se encuentra especialmente indicado para la micropropagación de especies leñosas.

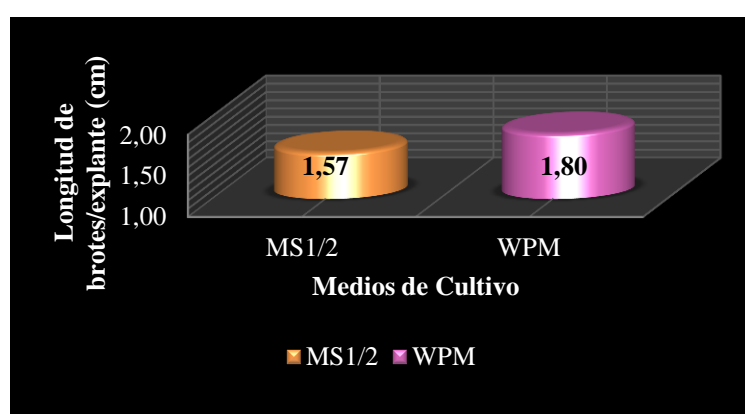


Gráfico 7. Promedios de la longitud de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Autor: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 15. Tukey al 5 % para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE 6-BENCILAMINOPURINA (BAP)	PROMEDIO DE LONGITUD DE BROTOS/EXPLANTE (cm)
b2	0.6 ppm	2.03 a
b3	0.9 ppm	1.88 a b
b1	0.3 ppm	1.60 b
b0	0.0 ppm	1.23 c

Tukey al 5 % para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP), **Cuadro 15**, detecto tres rangos de significancia estadística. Encabezando el primer rango con una mayor longitud promedio de 2.03 cm por brote, la concentración 0.6 ppm BAP (b2), en tanto que en el tercer rango se ubicó 0.0 ppm BAP (b0) con un promedio de 1.23 cm. Lo que contrasta con los resultados conseguidos por Ramos *et al.* (2001) quienes en *Tectona grandis* L, a una concentraciones similar obtuvieron una longitud promedio de 1.89 cm por brote.

Se detecta además en el **Gráfico 8**, que existe tendencia cuadrática; es decir que, cuando las concentraciones de BAP incrementan, la longitud de los brotes también aumentan hasta un nivel específico y luego disminuye, similares resultados obtuvieron Delgadillo *et al.* (2013) en roble (*Quercus spp*) en donde reportaron que las altas concentraciones de BAP puede inhibir la elongación, el engrosamiento de los brotes y la supervivencia del mismo, otros efectos que produce también es la reducción de los entrenudos y brotes con hojas retorcidas.

Vaugh y Puddephat *et al.* (1997) citado por Pérez *et al.* (s. f) corroboran este resultado en roble (*Quercus robur*), mencionan que este comportamiento puede atribuirse a que dichas concentraciones superan un límite aceptable por el explante provocando un desorden fisiológico; otra causa podría ser la alta intensidad metabólica de los explantes, por ser tejidos jóvenes presentan mayor potencial morfogénético y con ello mayor facilidad para emitir estructuras como brotes nuevos o en su defecto callo el mismo que no permite un desarrollo normal del brote.

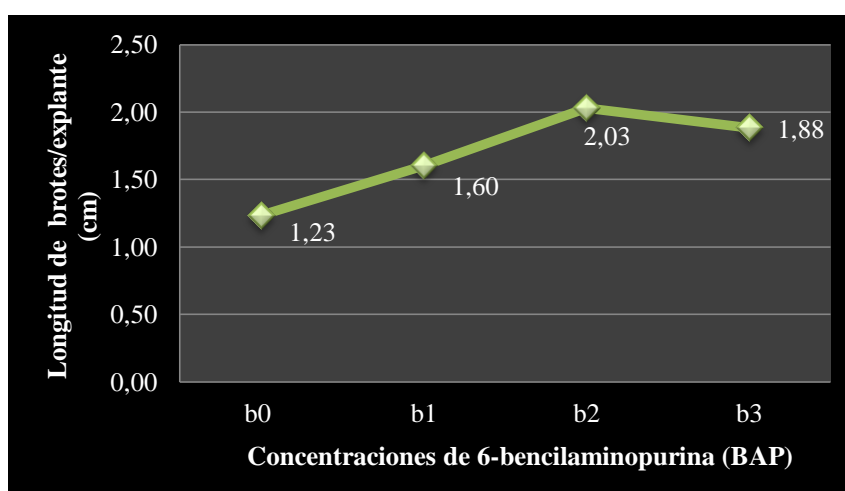


Gráfico 8. Promedios de la longitud de brotes por explante para el factor concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.
Autor: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 16. Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	INTERACCIONES M x B	PROMEDIO DE LONGITUD DE BROTOS/EXPLANTE (cm)
m2b2	WPM+ 0.6 ppm BAP	2.38 a
m2b3	WPM+ 0.9 ppm BAP	2.02 a b
m1b1	MS½ + 0.3 ppm BAP	1.84 b c
m1b3	MS½ + 0.9 ppm BAP	1.75 b c
m1b2	MS½ + 0.6 ppm BAP	1.67 b c
m2b0	WPM + 0.0 ppm BAP	1.45 c d
m2b1	WPM + 0.3 ppm BAP	1.37 c d
m1b0	MS½ + 0.0 ppm BAP	1.02 d

Tukey al 5 % para las interacciones M x B (Medios de cultivo x Concentraciones de BAP), **Cuadro 16**, detectó cuatro rangos de significancia. Encabeza el primer rango con mayor longitud de brotes por explante WPM más 0.6 ppm BAP (m2b2) con un promedio de 2.38 cm por brote; mientras que, MS½ más 0.0 ppm BAP (m1b0) se ubicó al final del cuarto rango con un promedio de 1.02 cm por brote.

Los resultados obtenidos coinciden con los encontrados en especies de la misma familia a la que pertenece Yalomán como en *Quercus robur* L., en donde WPM complementado con 0.7 ppm de BAP obtuvo el promedio más alto de longitud en brotes (Fernández, s. f). De similar manera reporta Delgado *et al.* (2013) en roble (*Quercus spp*) en concentraciones menores a 0.8 ppm de BAP se obtuvo el promedio de longitud de brotes de 2.9 cm. Reiterando por Pérez, *et al.* (2001) en *Cedrela odorata* que en el medio WPM en concentraciones similares de BAP mostró el mejor efecto de la interacción al tener mayor longitud de brotes. En tanto que Santos (2011) en *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum, sugiere la combinación de BAP 0.05 ppm e IBA 0.05 ppm para obtener mayor longitud de brotes, en donde obtuvo un incremento de 2.4 a 3.5 cm por brote. Los promedios de la interacción M x B se muestran en el **Gráfico 9**.

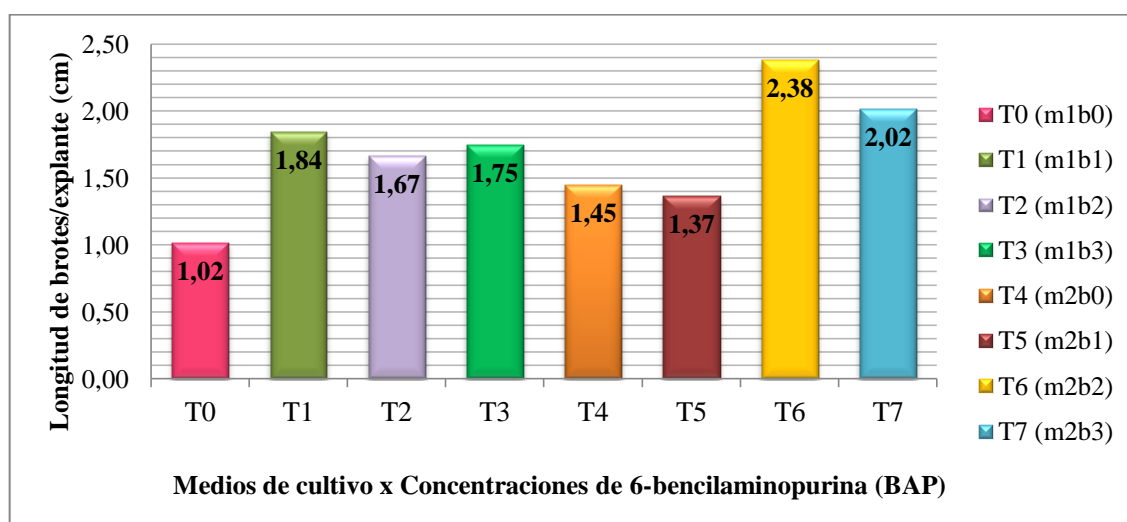


Gráfico 9. Promedios de la longitud de brotes por explante para la interacción medios de cultivo por concentraciones de 6-bencilaminopurina en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.
Autor: Isabel Loya, 2014.

4.2. Fase II: Enraizamiento de brotes

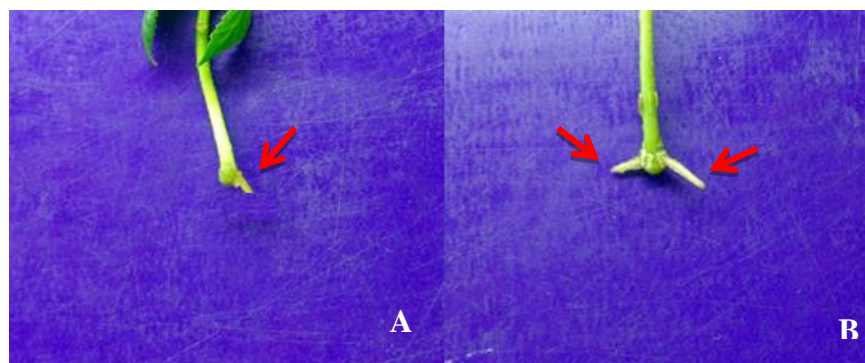
4.2.1. Días al enraizamiento

En el análisis de la varianza para la variable días a la brotación, **Cuadro 17**, se detectó diferencias altamente significativas para concentraciones de ácido indolbutírico (IBA), efecto lineal, efecto cuadrático y para la interacción M x I. El promedio general fue de 24.15 días al enraizamiento y el coeficiente de variación fue de 12.84 %, que se considera como muy bueno para este tipo de investigación (González, 2010), lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.

Cuadro 17. Análisis de la varianza para la variable días al enraizamiento, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS
		Días al enraizamiento
TOTAL	47	---
TRATAMIENTOS	7	199.93 ^{**}
Medios de cultivo (M)	1	38.52 ^{ns}
Concentraciones IBA (I)	3	252.08 ^{**}
Lineal	1	306.00 ^{**}
Cuadrático	1	450.00 ^{**}
Cúbico	1	0.23 ^{ns}
M x I	3	201.58 ^{**}
ERROR EXPERIMENTAL	40	9.61

PROMEDIO:	24.15 días
COEFICIENTE DE VARIACIÓN:	12.84 %



Fotografía 4: (A) Enraizamiento en MS½. (B) Enraizamiento en WPM½.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 18. Promedios de días al enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DE DÍAS AL ENRAIZAMIENTO (Días)
m2	Woody Plant Medium (WPM½)	23.25
m1	Murashige & Skoog (MS ¹ / ₄)	25.04

A pesar de que en el análisis estadístico, **Cuadro 17**, no se detectó significancia estadística para la variable días al enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo, **Cuadro 18** y **Gráfico 10**, se observa que el medio Woody Plant Medium ½ (m2) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 23.25 días al enraizamiento. Los resultados conseguidos se lograron gracias a la modificación del medio; al que se diluyó a la mitad de su concentración. Esto se corrobora con lo expresado por

Trujillo (2008) quien señala que, las plantas leñosas suelen ser sensibles a las altas concentraciones de sales, por este motivo las concentraciones de sales que WPM^{1/2} posee, al ser más bajas comparadas con MS^{1/4}, hace que el explante se adapte satisfactoriamente y se obtenga mejores resultados. Además Ordoñez (2013) manifiesta que el medio de cultivo WPM^{1/2} es una formulación que posee bajos niveles de nitratos comparados con el medio de cultivo MS^{1/4}, que influye en la formación del sistema radical.

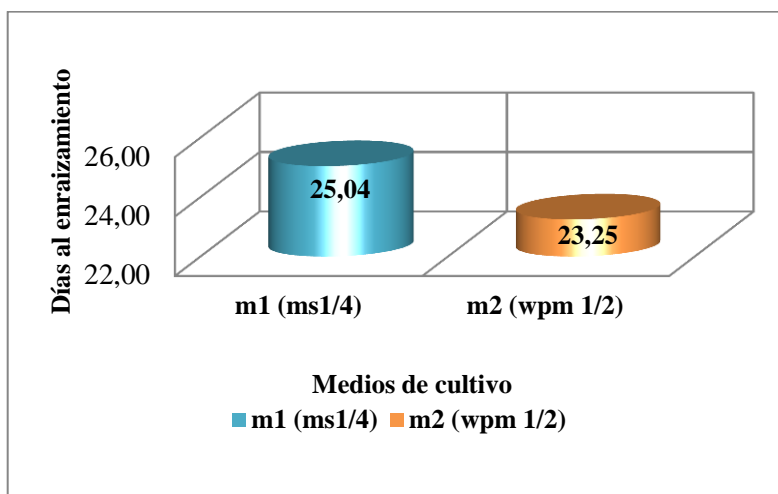


Gráfico 10. Promedios de días al enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.
Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 19. Tukey al 5 % para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (IBA)	PROMEDIO DE DÍAS AL ENRAIZAMIENTO
i1	0.2 ppm IBA	19.92 a
i2	0.4 ppm IBA	22.25 a b
i0	0.0 ppm IBA	23.83 b
i3	0.6 ppm IBA	30.58 c

Tukey al 5 % para el factor concentración de ácido indolbutírico (IBA), **Cuadro 19**, detectó tres rangos de significancia estadística. Encabeza el primer rango con una mejor respuesta 0.2 ppm IBA (i1) con un promedio de 19.92 días al enraizamiento; mientras que 0.6 ppm IBA (i3) ocupó el tercer rango con 30.58 días de promedio. Este efecto posiblemente se deba a que los brotes de “Yalomán” tienen niveles elevados de hormona endógena. Resultados que se ajustan a lo expresado por Jordán y Casaretto (2006) quienes indican que, en las células vegetales existen receptores de auxinas, que son proteínas que se encuentran en fracciones en la membrana, retículo endoplasmático y citoplásmicas, la más reconocida es Auxin binding protein (ABP1), la cual posiblemente a, altas concentraciones de auxina se satura, generando la ineficiencia de la hormona;

como muestra el **Gráfico 11**, a medida que las concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) aumentan, los días al enraizamiento también se incrementan, existiendo entonces una tendencia cuadrática.

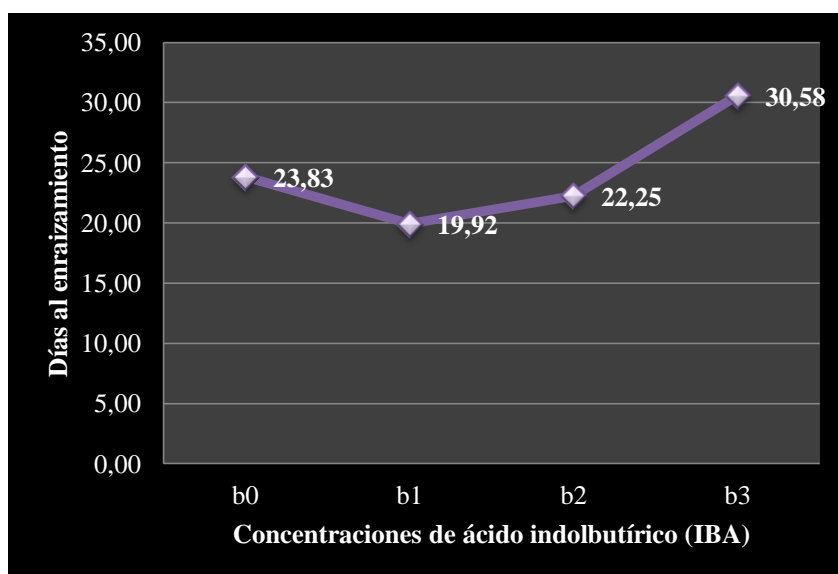


Gráfico 11. Promedios de días a la brotación para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 20. Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	INTERACCIONES M x I	PROMEDIO DE DÍAS AL ENRAIZAMIENTO
m2i1	WPM ^{1/2} + 0.2 ppm IBA	17.00 a
m2i2	WPM ^{1/2} + 0.4 ppm IBA	19.17 a b
m2i0	WPM ^{1/2} + 0.0 ppm IBA	21.00 a b c
m1i1	MS ^{1/4} + 0.2 ppm IBA	22.83 b c
m1i2	MS ^{1/4} + 0.4 ppm IBA	25.33 c
m1i3	MS ^{1/4} + 0.6 ppm IBA	25.33 c
m1i0	MS ^{1/4} + 0.0 ppm IBA	26.67 c
m2i3	WPM ^{1/2} + 0.6 ppm IBA	35.83 d

Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico IBA (MxI), **Cuadro 20**, detectó cuatro rangos de significancia estadística, encabezando el primer rango con el mejor promedio WPM^{1/2} más 0.2 ppm IBA (m2i1) con 17.00 días; mientras que, la interacción WPM^{1/2} más 0.6 ppm IBA (m2i3) se ubicó en el cuarto rango con 35.83 días al enraizamiento. Los promedios de la interacción M x I se muestran en el **Gráfico 12**.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Santos (2011) en el estudio de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum en donde el enraizamiento de las brotes se logró disminuyendo la concentración de sales del medio de cultivo y usando el efecto sinérgico de dos auxinas sintéticas (IBA y ANA). Del mismo modo Remache (2011), en la micropropagación de cedro (*Cedrela monatana*), el enraizamiento de las plántulas formadas se logró usando el efecto sinérgico de dos auxinas sintéticas IBA y ANA en Woody Plant Medium a la mitad de la concentración de sales, semejante a lo que se realizó en esta investigación, considerando que ANA estuvo como base en los medios de cultivo en una concentración de 0.01 ppm y suplementado con 1 g/l de carbón activado.

Además Dubos (2006) expresó que el ácido naftalénacético (ANA) es una auxina fuerte, muy estable, utilizada especialmente para promover la rizogénesis.

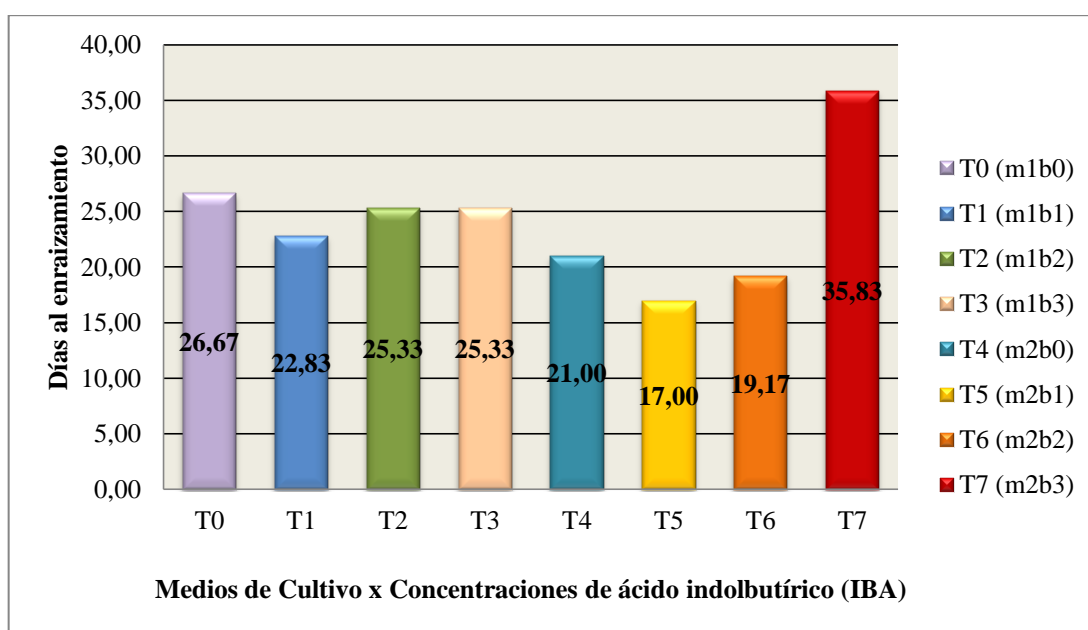


Gráfico 12. Promedios de días al enraizamiento para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

4.2.2. Número de raíces/planta

En el Análisis de la varianza para la variable número de raíces por planta, **Cuadro 21**, se detectó diferencia altamente significativa para concentraciones de ácido indolbutírico (IBA), efecto cuadrático y cúbico, además detectó diferencias significativas para el efecto lineal. El promedio general fue de 1.16 raíces por planta y el coeficiente de variación fue de 17.21 %, que se considera como muy bueno para este tipo de investigaciones (González, 2010), lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.

Cuadro 21. Análisis de la varianza para la variable número de raíces por planta, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS
		Número de raíces/planta
TOTAL	47	---
TRATAMIENTOS	7	0.33 ^{**}
Medios de cultivo (M)	1	0.14 ^{ns}
Concentraciones IBA (I)	3	0.68 ^{**}
Lineal	1	0.26 [*]
Cuadrático	1	0.81 ^{**}
Cúbico	1	0.98 ^{**}
M x I	3	0.06 ^{ns}
ERROR EXPERIMENTAL	40	0.04

PROMEDIO:	1.16 raíces/planta
COEFICIENTE DE VARIACIÓN:	17.21 %



Fotografía 5: (A) Número de raíces en MS^{1/4}. (B) Número de raíces en WPM^{1/2}. (C) Número de raíces en una planta germinada *in vitro*.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 22. Promedios del número de raíces por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	NÚMERO DE RAÍCES/PLANTA
m2	Woody Plant Medium (WPM ^{1/2})	1.22
m1	Murashige & Skoog (MS ^{1/4})	1.11

Para la variable número de raíces por planta en la evaluación de medios de cultivo, **Cuadro 22** y **Gráfico 13**, se observa que el medio WPM^{1/2} (m2) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 1.22 raíces/planta.

Los resultados obtenidos se deben a la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física, (Gamborg, 1991) y aludiendo a lo que expresa Pierik (1990) que los explantes muy jóvenes requieren concentraciones de sacarosa relativamente altas, ya que habitualmente el crecimiento y desarrollo se incrementa con la concentración de sacarosa. En la investigación se incrementó en cada medio de cultivo la fuente de sacarosa (azúcar) a 45 g/l y se adiciono 1 g/l de carbón activado con lo que se obtuvo estos éxitos resultados que son ratificados por Ocampo y Núñez (2007) quienes al trabajar en *Psidium guajaba* mostraron que efectivamente WPM½ es el adecuado para cultivo *in vitro* de especies leñosas, esto sugiere que el tipo y la concentración de sales del medio basal tiene una influencia directa sobre el número raíces. Del mismo modo Hannapel *et al.* (1981) citado por Dubos (2006) ratifican estos resultados en la micropropagación de *Rhododendron* obteniendo favorables resultado al utilizar bajas concentraciones de sales en el medio de cultivo.

Resultados similares se alcanzaron al trabajar con Woody Plant Medium en *Cedrela odorata*, y podría atribuirse a que la morfogénesis⁵ y el crecimiento del cultivo de tejido de especies leñosas prefieren concentraciones bajas de sales y a que la sacarosa es una gran fuente de energía, para que las plantas desarrollen tejidos y órganos, como por ejemplo las raíces (Pérez *et al.*, 2001). Para las especies que son difíciles de formar la raíz, como muchas especies leñosas, con el fin de aumentar el enraizamiento y la calidad de las raíces, otras sustancias se pueden añadir al medio de cultivo; un ejemplo es el carbón activado, lo que condujo al enraizamiento de brotes, y mejoró la calidad del sistema radicular de fresno (*Fraxinus americana*) (Preece *et al.*, 1987) citado por (Santos, 2011).

Como se puede observar en la **Fotografía 5** (C) el número de raíces obtenido a partir de semillas germinadas *in vitro* en el medio WPM, fue menor al ser comparado con en el número de raíces obtenidas en ambos medios de cultivo con baja concentración de sales y un incremento de la fuente de carbono (azúcar) y la adición de carbón activado, **Fotografía 5** (A) y (B), en los que se puede notar una marcada diferencia.

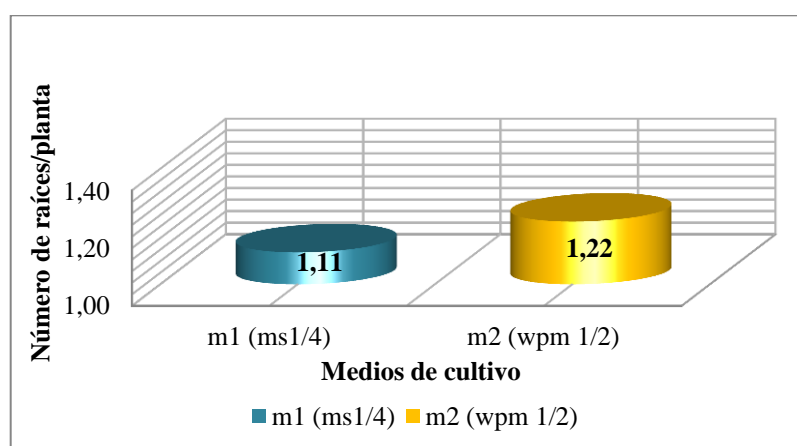


Gráfico 13. Promedios del número de raíces por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

⁵ Morfogénesis.- proceso biológico por el cual lleva a que un organismo desarrolle su forma (raíz, tallos, hojas etc) a partir de estructuras indiferenciadas

Cuadro 23. Tukey al 5 % para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (IBA)	PROMEDIO DE NÚMERO DE RAÍCES/PLANTA (cm)
i1	0.2 ppm	1.52 a
i2	0.4 ppm	1.07 b
i0	0.0 ppm	1.07 b
i3	0.6 ppm	1.00 b

Tukey al 5 % para la concentraciones de ácido indolbutírico (IBA), **Cuadro 23**, detectó dos rangos de significancia. En el primer rango se ubicó 0.2 ppm de IBA (i1) con la mejor respuesta con un promedio de 1.52 raíces por planta, mientras que al final del segundo rango se ubicó 0.6 ppm de IBA (i3) con 1.00 raíces por planta de promedio. Contrastando estos resultados Abedini *et al*, (2000), quienes al trabajar con secciones nodales de Ceibo (*Erythrina crista-galli*) obtuvieron un promedio de 3 raíces evaluando 0.1 ppm de IBA.

Además se observa en el **Grafico 14**, que el número de raíces disminuye cuando se incrementa la concentración de ácido indolbutírico (IBA), este resultado se obtuvo probablemente a que los brotes de Yalomán mantiene un nivel basal de auxinas endógenas, efecto evidenciado en la concentración b0 (sin auxina) en el que existió la formación de raíces adventicias como lo confirman Pérez, *et al*. (2001) quienes en *Cedrela odorata* (Bignoniaceae) expresan que, los brotes jóvenes se caracterizan por poseer un alto contenido interno de auxinas que bien puede ser suficiente para inducir el enraizamiento y al adicionar más concentración de IBA, puede generar un efecto tóxico que se traduce en una reducción de la emisión de raíces o a su total inhibición.

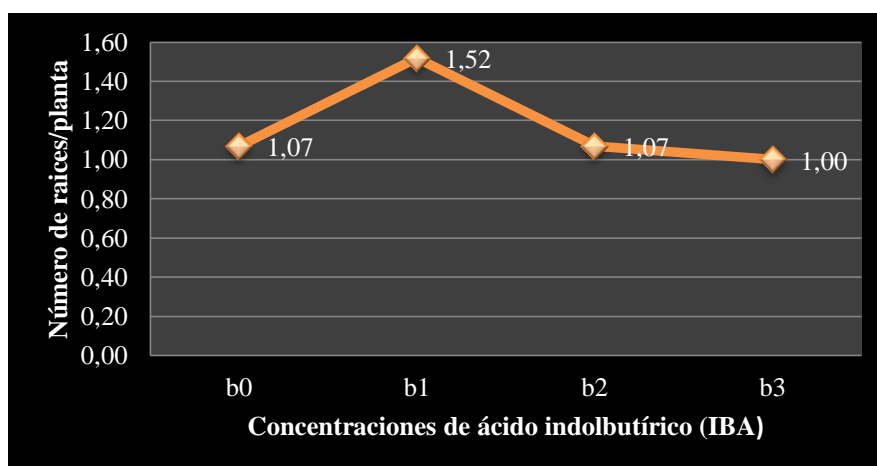


Grafico 14. Promedios del número de raíces por planta para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 24. Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	INTERACCIONES M x I	PROMEDIO DE NÚMERO DE RAÍCES/PLANTA		
m2i1	WPM ¹ / ₂ + 0.2 ppm IBA	1.66	a	
m1i1	MS ¹ / ₄ + 0.2 ppm IBA	1.37	a	b
m2i0	WPM ¹ / ₂ + 0.0 ppm IBA	1.14		b c
m2i2	WPM ¹ / ₂ + 0.4 ppm IBA	1.07		b c
m1i2	MS ¹ / ₄ + 0.4 ppm IBA	1.07		b c
m2i3	WPM ¹ / ₂ + 0.6 ppm IBA	1.00		c
m1i3	MS ¹ / ₄ + 0.6 ppm IBA	1.00		c
m1i0	MS ¹ / ₄ + 0.0 ppm IBA	1.00		c

Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico (MxI), **Cuadro 24**, detectó tres rangos de significancia. Encabeza el primer rango con mayor número de raíces WPM¹/₂ más 0.2 ppm IBA (m2i1) con un promedio de 1.66 raíces por planta; en tanto que al final del tercer rango se ubicó MS¹/₄ + 0.0 ppm IBA (m1i0) con un promedio de 1.00 raíz/planta.

Pérez *et al.*, (2001) ratifican estos resultados en la micropropagación de *Cedrela odorata* en donde WPM ¹/₂ con un incremento de la fuente de carbono (sacarosa), la adición de carbón activado y la utilización de combinaciones de IBA y ANA (1.0 y 0.5 ppm) permitieron obtener mayor número de raíces 1.23 de promedio, semejante a lo realizado y a los resultados obtenidos en esta investigación. Palla y Pijut (2011) señalan que, el enraizamiento *in vitro* por lo general se obtiene en soluciones minerales diluidas y en presencia de auxina, en fresno (*Fraxinus spp*) WPM¹/₂ suplementado con 0.1 ppm ha demostrado ser exitoso para la formación de raíces en donde obtuvieron un promedio de 1.8 raíces, similar a lo detectado en el **Gráfico 15**, WPM¹/₂ más 0.2 ppm IBA (T5).

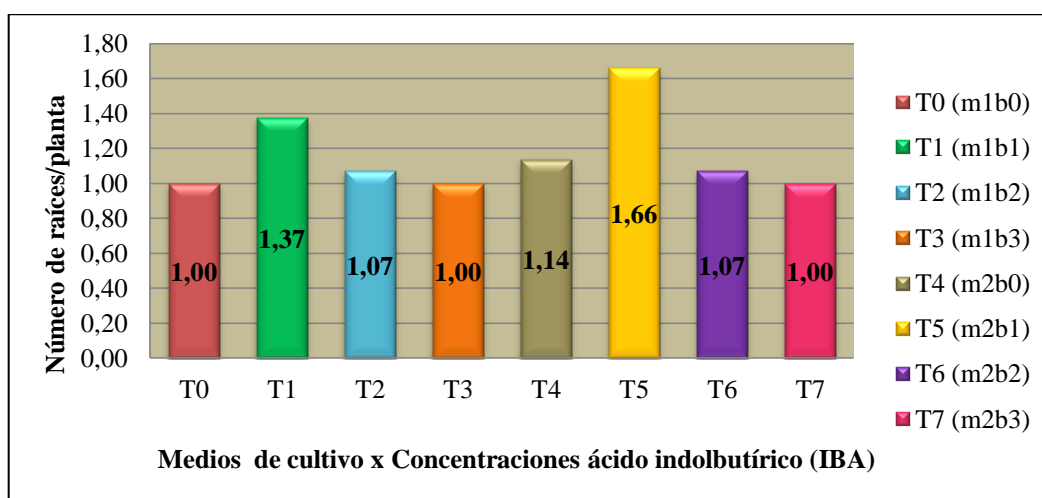


Gráfico 15. Promedios del número de raíces por planta para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

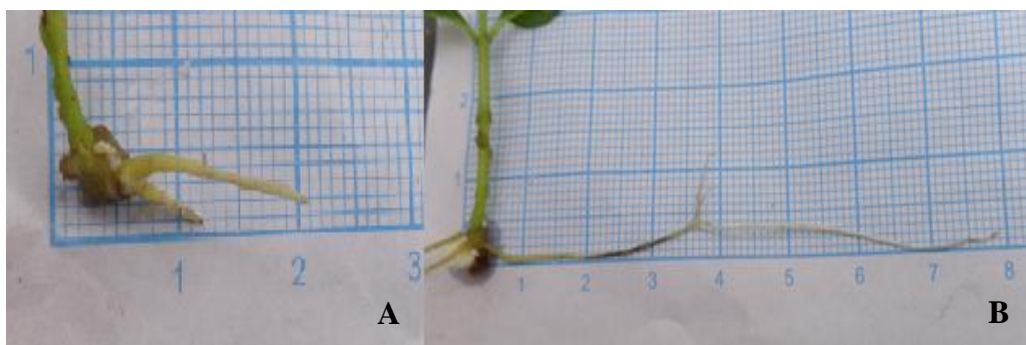
4.2.3. Longitud de la raíz/planta

En el análisis de la varianza para la variable longitud de la raíz por planta, **Cuadro 25**, se detectó diferencias altamente significativas para medios de cultivo, concentraciones de IBA, efecto cuadrático y cúbico, además detectó diferencia significativa para el efecto lineal. El promedio general fue de 3.71 cm por raíz y el coeficiente de variación fue de 13.34 %, que se considera como muy bueno para este tipo de investigaciones (González, 2010), lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.

Cuadro 25. Análisis de la varianza para la variable longitud de la raíz por planta, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS
		Longitud de raíz/planta
TOTAL	47	---
TRATAMIENTOS	7	38.99**
Medios de cultivo (M)	1	160.60**
Concentraciones IBA (I)	3	17.19**
Lineal	1	1.50*
Cuadrático	1	45.24**
Cubico	1	4.81**
M x B	3	20.26**
ERROR EXPERIMENTAL	40	0.24

PROMEDIO:	3.71 cm/raíz
COEFICIENTE DE VARIACIÓN:	13.34 %



Fotografía 6: (A) Longitud de la raíz en MS^{1/4}. (B) Longitud de la raíz en WPM^{1/2}.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 26. DMS al 5% en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	LONGITUD DE LA RAÍZ/PLANTA (cm)
m2	Woody Plant Medium (WPM ^{1/2})	5.54 a
m1	Murashige & Skoog (MS ^{1/4})	1.88 b

DMS al 5% en la evaluación de medios de cultivo, **Cuadro 26**, detectó dos rangos de significancia. Encabeza el primer rango el medio Woody Plant Medium^{1/2} (m2) con mayor longitud de raíz con un promedio de 5.54 cm/raíz; mientras que el medio Murashige & Skoog^{1/4} (m1) ocupó el segundo rango con 1.88 cm/raíz de promedio.

Los resultados conseguidos se lograron gracias a la modificación del medio; al que se diluyó a la mitad de su concentración de sales y se incrementó la fuente de sacarosa a 45 gramos. Esto se confirma con lo expresado por Pérez *et al.* (2001), quienes reportaron resultados similares al trabajar con este medio en *Cedrela odorata*, estos resultados podría atribuirse a que la morfogénesis y el crecimiento de los cultivos de tejidos de especies leñosas prefieren concentraciones bajas de sales y a que la sacarosa es una gran fuente de energía, para que las plantas desarrollen tejidos y órganos, como por ejemplo las raíces. Ordoñez (2013) manifiesta que, el medio de cultivo WPM ^{1/2} es una formulación que posee bajos niveles de nitratos comparados con el medio de cultivo MS^{1/4}, que influye en la formación e incrementa el desarrollo de raíces en algunos cultivares de manzano.

Además Castillo (2004) citado por Toro (2009) mencionan que en la composición de los medios de cultivo y los reguladores de crecimiento juegan un rol de primer orden, los cuales dependen de la especie vegetal y de la etapa de micropropagación en la que se encuentren.

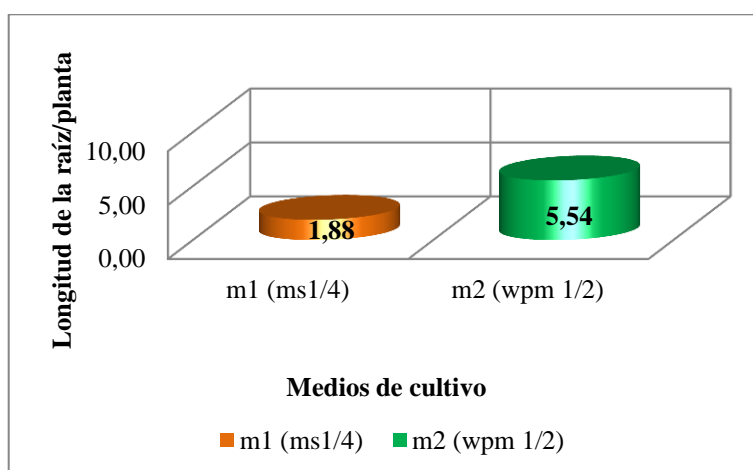


Gráfico 16. Promedios de la longitud de la raíz por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 27. Tukey al 5% para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (IBA)	PROMEDIO DE LONGITUD DE LA RAÍZ/PLANTA (cm)
i1	0.2 ppm	5.03 a
i2	0.4 ppm	4.33 b
i3	0.6 ppm	3.12 c
i0	0.0 ppm	2.36 d

Tukey al 5% para el factor concentraciones de ácido indolbutírico (IBA), **Cuadro 27**, detectó cuatro rangos de significancia. En el primer rango se ubicó 0.2 ppm IBA (i1) con la mejor respuesta con un promedio de 5.02 cm de longitud de raíz; mientras que, 0.0 ppm IBA (i0) se ubicó en el cuarto rango con 2.36 cm de promedio. Los resultados contrastan con los obtenidos por Santos (2011) en el estudio de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum, en donde en concentraciones de 0.01 ppm de IBA obtuvo la mejor respuesta con 2.6 cm de longitud promedio, similar a lo que Cáceres (2012) reportó en el estudio de cholán (*Tecoma stans*) donde la mejor respuesta se obtuvo en 0.0 ppm de IBA, demostrando que la concentración de hormona endógena es distinta en cada especie aunque pertenezcan a la misma Familia, motivó por el cual se logró obtener mayor longitud de raíces en comparación con las investigaciones anteriormente mencionadas.

Además se detecta en el **Gráfico 17**, que la longitud de la raíz decrece cuando se incrementa la concentración de ácido indolbutírico (IBA). Según Olmos *et al.* (2010), manifiesta que, cuando las concentraciones de auxinas se elevan en la planta, se torna contraproducente ya que aumenta la posibilidad de que se disminuya el desarrollo normal de la planta viéndose también afectada la raíz: por lo tanto, es necesario la optimización de un protocolo de enraizamiento único para cada especie, tratando en lo posible de minimizar la formación de callo y maximizar la tasa de enraizamiento, para aumentar la supervivencia de las plantas.

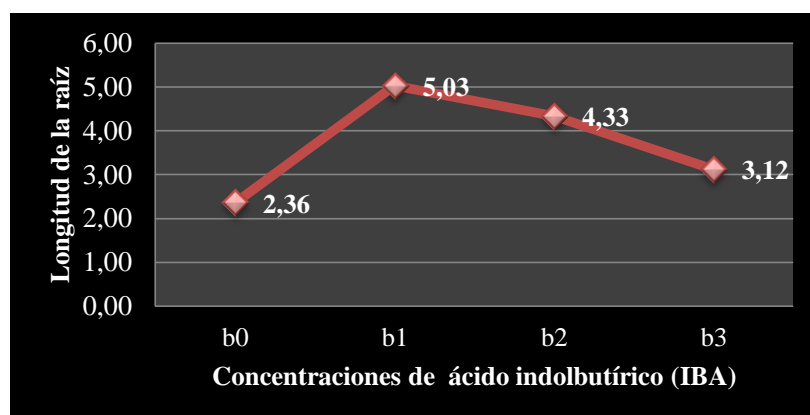


Gráfico 17. Promedios de la longitud de la raíz por planta para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 28. Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	INTERACCIONES M x I	PROMEDIO DE LONGITUD DE LA RAÍZ/PLANTA (cm)
m2i1	WPM ^{1/2} + 0.2 ppm IBA	8.53 a
m2i2	WPM ^{1/2} + 0.4 ppm IBA	6.47 b
m2i3	WPM ^{1/2} + 0.6 ppm IBA	3.65 c
m2i0	WPM ^{1/2} + 0.0 ppm IBA	3.50 c
m1i3	MS ^{1/4} + 0.6 ppm IBA	2.58 d
m1i2	MS ^{1/4} + 0.4 ppm IBA	2.20 d e
m1i1	MS ^{1/4} + 0.2 ppm IBA	1.52 e f
m1i0	MS ^{1/4} + 0.0 ppm IBA	1.22 f

Tukey al 5 % para la interacción medio de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico (MxB), **Cuadro 28**, detectó seis rangos de significancia. Encabeza el primer rango con mayor longitud de raíz/planta WPM^{1/2} más 0.2 ppm IBA (m2i1) con un promedio de 8.53 cm por raíz; mientras que, MS^{1/4} más 0.0 ppm IBA (m1i0) se ubicó al final del sexto rango con un promedio de 1.22 cm por raíz

Los resultados obtenidos se debe a la selección del medio de cultivo el mismo que se utilizó a la mitad de su concentración (WPM^{1/2}), a la adecuada concentración de auxinas (0.2 ppm IBA), al incrementó del azúcar a 45 g/l y a la adición de 1 g/l de carbón activado con lo que se obtuvo estos exitosos resultados los cuales son ratificados por Ocampo y Núñez (2007) quienes al trabajar en *Psidium guajaba* mostraron que efectivamente WPM^{1/2} es el adecuado para el cultivo *in vitro* de especies leñosas, esto sugiere que el tipo de sales del medio basal tiene una influencia directa sobre la longitud de raíces.

Jordán y Casaretto (2006) expresan que, las auxinas en concentraciones adecuadas tiene la capacidad de producir elongación celular, expansión de los tejidos, división celular y formación de raíces adventicias.

Marinucci *et al.* (2004) citados por Ramírez (2013) señalan que, la sacarosa a más de ser una fuente de carbono, en concentraciones elevadas (30 a 90 g/l) actúa como un regulador osmótico, produciendo estrés fisiológico causado por el desequilibrio en el balance osmótico del medio nutritivo, siendo dicho estrés el que genera la señal para la formación y elongación de raíces adventicias.

Preece *et al.* (1987) citados por Santos (2011) mencionan que, el uso de carbón activado en fresno (*Fraxinus americana*) condujo al enraizamiento de brotes, y mejoró la calidad del sistema radicular. Los promedios de la interacción M x I se muestran en el **Gráfico 18**.

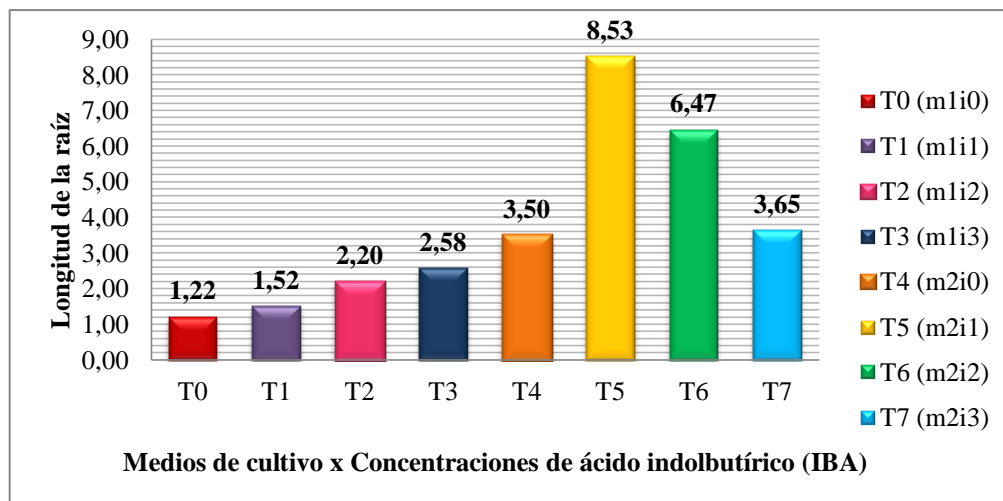


Gráfico 18. Promedios de longitud de raíz por planta para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbútrico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

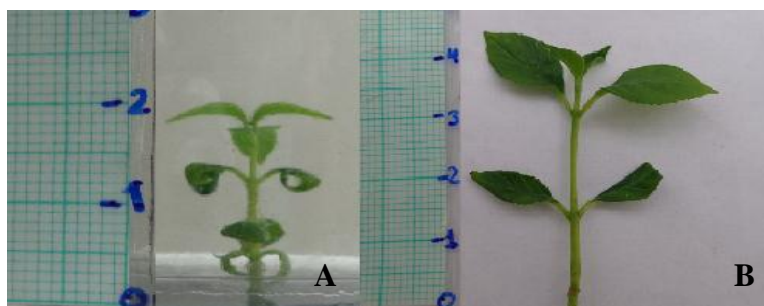
4.2.4. Longitud de la planta

En el Análisis de la varianza para la variable longitud de la planta, **Cuadro 29**, se detectó diferencias altamente significativas para medios de cultivo, concentraciones de IBA, efecto cuadrático y cúbico, además detectó diferencia significativa para el efecto lineal. El promedio general fue de 3.09 cm por planta y el coeficiente de variación fue de 12.15 %, que se considera como muy bueno para este tipo de investigaciones (González, 2010), lo cual valida los resultados que se reportan en esta variable.

Cuadro 29. Análisis de la varianza para la variable longitud de la planta, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS
		Longitud de la planta
TOTAL	47	---
TRATAMIENTOS	7	2.82**
Medios de cultivo (M)	1	4.44**
Concentraciones IBA (I)	3	3.39**
Lineal	1	0.75*
Cuadrático	1	3.97**
Cubico	1	5.46**
M x B	3	1.70**
ERROR EXPERIMENTAL	40	0.14

PROMEDIO:	3.09 cm/planta
COEFICIENTE DE VARIACIÓN:	12.15 %



Fotografía 7: (A) Longitud de la planta en $MS^{1/4}$ (B) Longitud de la planta en $WPM^{1/2}$.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 30. DMS al 5% en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO DE LONGITUD DE LA PLANTA (cm)
m2	Woody Plant Medium ($WPM^{1/2}$)	3.39 a
m1	Murashige & Skoog ($MS^{1/4}$)	2.78 b

DMS al 5% en la evaluación de medios de cultivo, **Cuadro 30**, detectó dos rangos de significancia. Encabeza el primer rango con una mayor longitud de Woody Plant Medium $^{1/2}$ (m2) con un promedio de 3.39 cm/planta; mientras que, Murashige & Skoog $^{1/4}$ (m1) ocupó el segundo rango con 2.88 cm/planta, como se puede observar también en el **Gráfico 19**.

Los resultados obtenidos se debe a la adecuada selección del medio de cultivo, WPM al que se diluyó a la mitad de su concentración y al incremento de la fuente de carbono (45 g de azúcar) confirmando estos resultados Abedini *et al.* (2000) quienes al trabajar con Ceibo (*Erythrina crista-galli*) utilizaron concentraciones bajas de micro y macro nutrientes como los que posee $WPM^{1/2}$ obteniendo como resultado el crecimiento optimó del material vegetal.

Roca y Mroginski (1993) explican que WPM está especialmente indicado para la micropropagación de especies leñosas y diluido presenta aún más, resultados favorables que en concentraciones completas. Reafirmando estos resultados Cáceres (2012) quien menciona que, el medio $WPM^{1/2}$ contiene sulfato cúprico el cual es ausente en el medio $MS^{1/2}$, siendo este un componente necesario para mejorar la respuesta morfogénica en el cultivo de tejidos, el cobre es también un cofactor enzimático, que ayuda en los procesos metabólicos como la fotosíntesis, respiración, regulación hormonal y metabolismo de compuestos secundarios.

Además Pierik (1990) indica que los explantes muy jóvenes requieren concentraciones de sacarosa relativamente altas, ya que habitualmente el crecimiento y desarrollo se incrementa con la concentración de sacarosa.

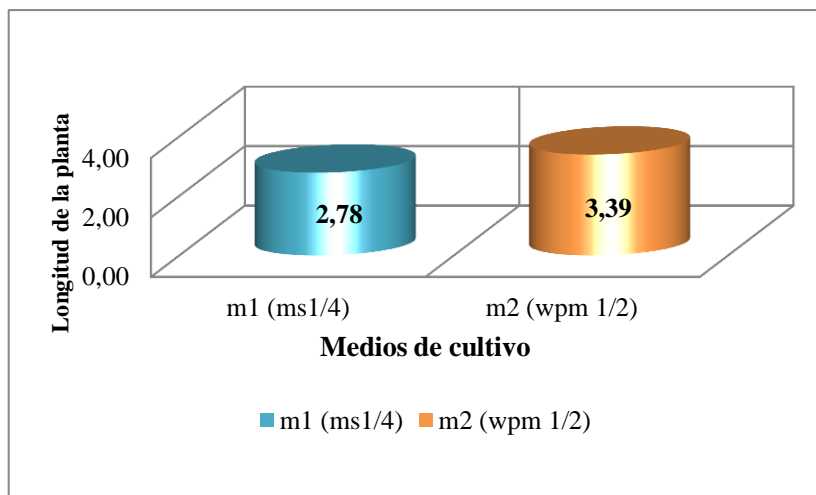


Gráfico 19. Promedios de la longitud de la planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 31. Tukey al 5% para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	CONCENTRACIONES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (IBA)	PROMEDIO DE LONGITUD DE LA PLANTA (cm)
i1	0.2 ppm	3.88 a
i2	0.4 ppm	2.87 b
i0	0.0 ppm	2.82 b
i3	0.6 ppm	2.78 b

Tukey al 5% para el factor concentraciones de ácido indolbutírico (IBA), **Cuadro 31**, detectó dos rangos de significancia. En el primer rango se ubicó 0.2 ppm IBA (i1) con la mejor respuesta con un promedio de 3.88 cm de longitud de la planta; mientras que, 0.6 ppm IBA (i3) se ubicó en el final del cuarto rango con 2.78 cm promedio. Salisbury y Ross (2000) citados por Ordoñez (2013) mencionan que, estos resultados coinciden con las respuestas fisiológicas que normalmente son desencadenadas por la presencia de auxinas, además afirman que este fitoregulador en bajas concentraciones favorece el crecimiento primario de la planta y estimulan los procesos de multiplicación celular.

Además se detecta en el **Gráfico 20**, que la longitud decrece cuando se incrementa la concentración de IBA. Ya que según Sunseri (2001) y Cáceres (2012) la concentración de auxina aplicada para su correcta función, depende de los niveles naturales de auxina presente en el explante al inicio de la fase de enraizamiento, de la capacidad del tejido para sintetizar la auxina endógena y la interacción entre la auxina endógena y sintética, por lo tanto el aumento de la dosis de auxina ocasiona que los sistemas saturables mejor conocidos como receptores, son inhibidos a altas concentraciones de hormona, disminuyendo una de sus funciones importantes que es la elongación celular.

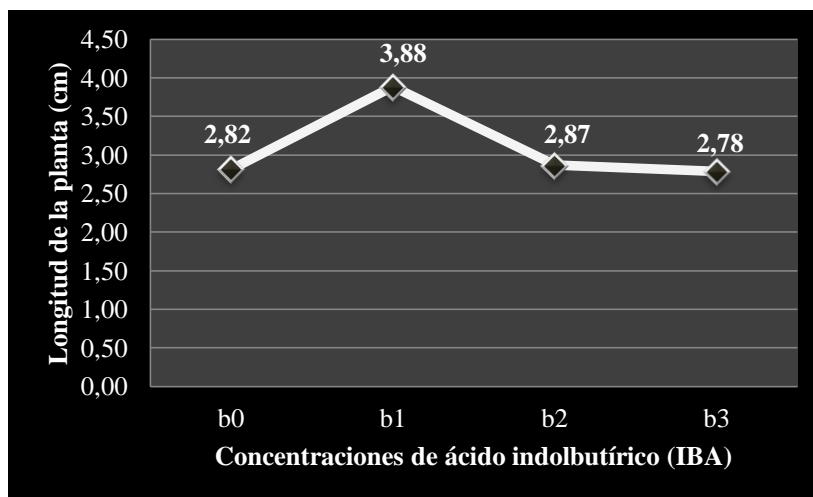


Grafico 20. Promedios de la longitud de la planta para el factor concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.
Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Cuadro 32. Tukey al 5 % para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

CODIFICACIÓN	INTERACCIONES M x I	PROMEDIO DE LONGITUD DE LA PLANTA (cm)	
m2i1	WPM ¹ / ₂ + 0.2 ppm IBA	4.62	a
m2i0	WPM ¹ / ₂ + 0.0 ppm IBA	3.18	b
m2i2	WPM ¹ / ₂ + 0.4 ppm IBA	3.17	b
m1i1	MS ¹ / ₄ + 0.2 ppm IBA	3.15	b
m1i3	MS ¹ / ₄ + 0.6 ppm IBA	2.97	b c
m2i3	WPM ¹ / ₂ + 0.6 ppm IBA	2.60	b c
m1i2	MS ¹ / ₄ + 0.4 ppm IBA	2.57	b c
m1i0	MS ¹ / ₄ + 0.0 ppm IBA	2.45	c

Tukey al 5 % para la interacciones medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico (M x I), **Cuadro 32**, detectó tres rangos de significancia. Se ubicó en el primer rango con mayor número de longitud WPM¹/₂ más 0.2 ppm IBA (m2i1) con un promedio de 4.62 cm/planta; mientras que, MS¹/₄ más 0.0 ppm IBA (m1i0) se ubicó al final del tercer rango con un promedio de 2.45 cm/planta.

Estos exitosos resultados se obtuvieron gracias a la adecuada selección del medio de cultivo el mismo que se utilizó a la mitad de su concentración (WPM¹/₂), a la apropiada concentración de auxinas (0.2 ppm IBA), al incrementó del azúcar a 45 g/l, a la adición de 1 g/l de carbón activado, los cuales son ratificados por Pérez, *et al.* (2001) en *Cedrela odorata* quienes expresan que, la morfogénesis y el crecimiento de los cultivos de tejidos de especies leñosas, prefieren concentraciones bajas de sales demostrando que efectivamente WPM ¹/₂ es el apropiado, además

el incremento de sacarosa es beneficioso pues, sirve como fuente de energía y producen los esqueletos de carbono necesarios para la formación de tejidos y órganos vegetales nuevos, y el uso de carbón activado ayuda absorbiendo compuestos tóxicos de la microatmósfera gaseosa o los reguladores de crecimiento en exceso que están presentes en el medio de cultivo.

Montoya (1991), explica que además de los tipos de reguladores de crecimiento y las cantidades en que son suplementadas en el medio, son las interacciones cuantitativas entre los reguladores de crecimiento presentes, las que mayoritariamente proporcionan el mecanismo de regulación de los fenómenos morfogénéticos durante el cultivo *in vitro*. Los promedios de la interacción M x I se muestran en el **Gráfico 21**.

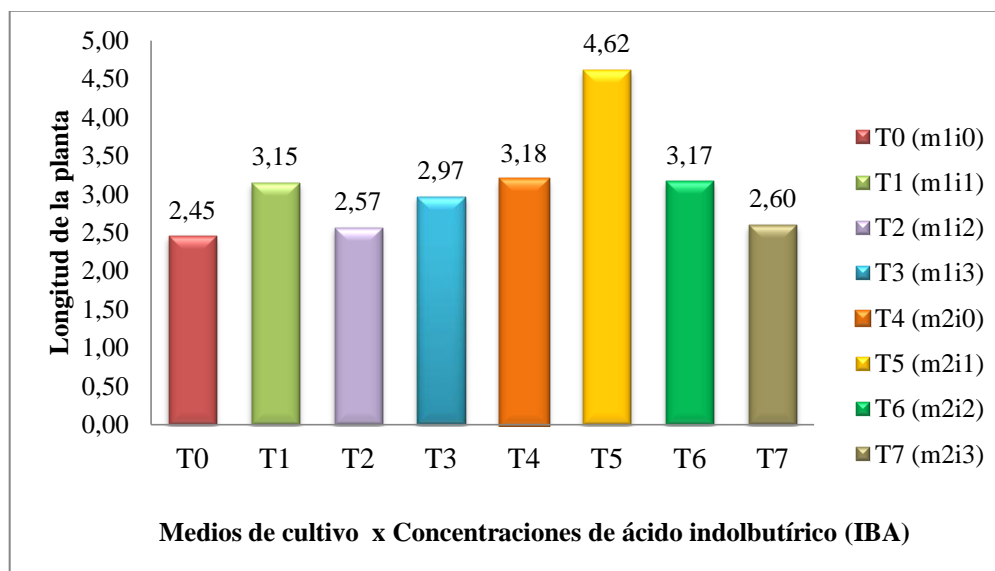


Gráfico 21. Promedios de la longitud de la planta para la interacción medios de cultivo por concentraciones de ácido indolbutírico en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

4.3. Costo de producción de las plantas obtenidas *in vitro*

Los costos de la micropropagación están influenciados por un gran número de factores, tales como el costo de las instalaciones del laboratorio (edificaciones y equipamiento), el costo del material fungible (medios de cultivo, recipientes y de más materiales), la mano de obra y el genotipo de la especie que se quiera propagar, ya que esto condicionará que los diferentes pasos del proceso del cultivo *in vitro* y la transferencia del material vegetal *in vivo*, sean mayor o menormente eficientes (Estopá, 2005).

En la mayoría de las especies, esta técnica requiere una intensa labor de mano de obra en todos los estadios del cultivo de tejidos, especialmente en las etapas que requieren mayor manipulación: las etapas de iniciación del cultivo *in vitro* (Etapa I) y de la división de macollos e introducción de los plantines en recipientes con medio de cultivo semisólido (Etapa II). Estas tareas originan altos costos de mano de obra y hacen de la micropropagación masiva un proceso relativamente caro. A pesar de ello, las plantas micropropagadas siguen teniendo ventajas. Estas son: a) generación de vástagos pequeños a partir de pequeñas porciones de tejido vegetal (lo que economiza espacio

físico); b) obtención de plantas libres de microorganismos contaminantes; c) clonado de especies difíciles de propagar vegetativamente; d) producción continua durante todo el año (FBMC, 2011)

El costo de la investigación para la evaluación de medios de cultivo tuvo un valor por planta de 4.22 USD, este valor corresponde a la sumatoria de los costos fijos y variables de la investigación divididos para el número de plántulas producidas en total. Cabe recalcar que este costo es obtenido cuando la producción se la realiza a pequeña escala, si se considera que la producción de plantas es mayor, el costo de producción en una proyección de 10 000 plantas es de 0.46 USD/planta.

Cuadro 33. Costos fijos y variables en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

COSTOS FIJOS				
RUBRO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (USD)	PRECIO TOTAL (USD)
INSUMOS				
Planta germinada <i>in vitro</i>	Unidad	250.00	0.12	30.00
<i>Subtotal</i>				30.00
MATERIALES				
Vasos de Precipitación	Unidad	10.00	7.00	70.00
Probetas	Unidad	3.00	5.00	15.00
Puntas para micropipeta	Unidad	2.00	0.13	0.26
Piseta	Unidad	1.00	2.00	2.00
Pinzas	Unidad	2.00	8.00	16.00
Mango de bisturí	Unidad	1.00	1.80	1.80
Termómetro	Unidad	1.00	8.14	8.14
Marcadores	Unidad	2.00	1.25	2.50
<i>Subtotal</i>				115.70
SERVICIOS				
Agua potable	m ³	150.00	0.28	42.00
Luz eléctrica	kWh	1000.00	0.07	70.00
<i>Subtotal</i>				112.00
EQUIPOS				
Depreciación de equipos	Mensual	10.00	49.13	884.39
<i>Subtotal</i>				884.39
SALARIO				
Tesista	Mensual	10.00	250.00	2500.00
<i>Subtotal</i>				2500.00
SUBTOTAL COSTOS FIJOS				3642.09
COSTOS VARIABLES				
RUBRO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (USD)	PRECIO TOTAL (USD)
REACTIVOS				
Woody Plant Medium	Litro	8.00	12.19	97.52
Woody Plant Medium ½	Litro	16.00	12.13	194.08
Bencilaminopurina (BAP)	g	0.025	29.00	0.75

Cuadro 33 (cont.)

RUBRO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (USD)	PRECIO TOTAL (USD)
Ácido Indolbutírico (IBA)	g	0.03	15.40	0.46
Ácido Naftalén acético (ANA)	g	0.0002	2.25	0.001
Carbón Activado	g	16	0.20	3.20
<i>Subtotal</i>				296.01
MATERIALES				
Frascos 250 ml	Unidad	500.00	0.05	25.00
Aluminio	60.9m*30.4cm	1.00	8.20	8.20
Parafilm Rollo	1400m*45cm	1.00	38.00	38.00
Alcohol potable	Galón	1.00	9.20	9.20
Hojas de bisturí	Unidad	5.00	0.19	0.95
Gas	Tanque	1.00	2.60	2.60
Servilletas	Unidad	1.00	0.50	0.50
Mascarilla	Unidad	1.00	0.05	0.05
Gorro	Unidad	1.00	0.08	0.08
<i>Subtotal</i>				84.58
<i>SUBTOTAL C. VARIABLES</i>				380.59
<i>C. FIJOS + C. VARIABLES</i>				4022.68
<i>Imprevistos 5 %</i>				201.13
TOTAL (1000 plantas)				4223.81
TOTAL/UNIDAD DE PLANTA				4.22

Fuente: Jaramillo, 2013; La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

5. CONCLUSIONES

- 5.1. El medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con la concentración 0.6 ppm de 6-bencilaminopurina (BAP), fue el medio que redujo los días a la brotación e incrementó el número y la longitud de los brotes en la Fase I. Brotación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don).
- 5.2. El medio de cultivo Woody Plant Medium a la mitad de la concentración de sales (WPM ½), con 45 g/l de sacarosa, 1 g/l de carbón activado, una base de 0.01 ppm de ácido naftalénacético (ANA) y suplementado con 0.2 ppm de ácido indolbutírico (IBA), fue el medio que redujo los días al enraizamiento e incremento el número de raíces, la longitud de la raíz y la longitud de la planta en la Fase II. Enraizamiento de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don).
- 5.3. El costo de producción de 1 000 plantas de “Yalomán” (*Delostoma integrifolium* D. Don) usando la técnica *in vitro* con el empleo de Woody Plant Medium más 0.6 ppm 6-bencilaminopurina (BAP) para brotación y Woody Plant Medium ½ más 0.2 ppm de ácido indolbutírico (IBA) para enraizamiento, tuvo un costo de 4.22 USD/planta. Realizando una proyección de producción de 10 000 plantas con la misma técnica se alcanzó un costo de 0.46 USD/planta.

6. RECOMENDACIONES

- 6.1. Aplicar la técnica *in vitro* generada en esta investigación para implementar la producción de plantas de “Yalomán” (*Delostoma integrifolium* D. Don) necesarias para actividades de reforestación.
- 6.2. Micropropagar explantes de “Yalomán” (*Delostoma integrifolium* D. Don); empleando secciones del epicótilo, provenientes de semillas germinadas *in vitro* de ocho semanas de edad en el medio basal Woody Plant Medium ya que, esto garantiza tener material vegetal axénico.

7. RESUMEN

Ecuador es reconocido a nivel mundial por su riqueza florística y faunística, que se ve en permanente amenaza, dadas por una continua y persistente presión del ser humano sobre los recursos naturales (MAE, 2012). La sobre explotación ha generado graves problemas ambientales como la deforestación indiscriminada, pérdida de la biodiversidad, mermando el equilibrio ambiental; en consecuencia para la restauración de los ecosistemas andinos de nuestro país, se requiere de material vegetal nativo y en buenas condiciones fitosanitarias (Cáceres, 2012).

Delostoma integrifolium D. Don es un árbol nativo de Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú (Gentry, 2009). Es utilizada como una especie ornamental común por su abundante y vistosa floración que se encuentra en parques y jardines (León y Ayala, 2007), considerado como un árbol patrimonial de la Ciudad de Quito y de gran valor ecológico, por ser nativo, presentar un magnífico porte y por sus notables dimensiones; siendo considerado un bien natural invaluable (JBQ, 2012). Además es una especie recomendada para la recuperación de suelos en alturas de más de 2800 msnm ya que al ser nativa se adapta fácilmente a las condiciones adversas y cumple eficientemente las función de fitorremediación (Huachi, 2008).

Sin embargo, la propagación de esta especie resulta difícil, Vozzo (2010) citado por Carranza *et al.* (2012) quienes manifiestan que, el factor que dificulta la propagación de esta especie es el bajo porcentaje de germinación de las semillas. Así también, resulta dificultoso localizar ejemplares de esta especie con características agronómicas deseables; ya que, en Ecuador es una especie con muy poca distribución geográfica, por lo que es necesario el desarrollo de iniciativas que promuevan su conservación, siendo una alternativa el uso de técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Esta técnica ha revolucionado la producción forestal en los últimos años, ya que pueden generar clones de variedades élite en grandes cantidades y en menor tiempo, permite producir plantas durante todo el año independientemente del factor climático y posibilita obtener plantas libres de enfermedades y patógenos (Recalde, 2007).

En la investigación desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador se evaluó el efecto de dos medios de cultivo y cuatro dosis de 6-bencil amino purina (BAP) para la fase de brotación y cuatro dosis de ácido indolbutírico (IBA) para la fase de enraizamiento en el cultivo *in vitro*, a partir de una sección del epicótilo con dos yemas axilares de plántulas de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don) provenientes de semillas germinadas *in vitro* de ocho semanas de edad.

Se inició el estudio con la recolección de cápsulas en el Parque Ecológico “Cachaco” que se localiza en la parroquia de Amaguaña a 28 km al sur occidente del Distrito Metropolitano de Quito, provincia de Pichincha, a 2 683 metros sobre el nivel del mar (GAA, 2011); seleccionando árboles vigorosos y representativos de la zona con gran cantidad de cápsulas y abundante follaje que no presentaron síntomas de enfermedades ni ataque de insectos, constituyéndose como la fuente donante de los explantes.

Una vez recolectados las cápsulas se las clasificó y se añadió cinco gramos de detergente, tres gotas de tenso activo Tween 80, después de una agitación continua durante diez minutos se realizó cinco lavados sucesivos, los dos primeros con agua potable y los tres últimos con agua destilada. En cámara de flujo laminar se realizó una desinfección con una solución de hipoclorito de sodio de

250 ml y 50 ml de agua destilada estéril en constante agitación por diez minutos, transcurrido el tiempo se realizó cinco enjuagues con agua destilada esterilizada de un minuto cada uno, posteriormente se tomó las cápsulas las que fueron rociadas con alcohol al 96 % y se las flameó, con la ayuda de las pinzas y el bisturí se las abrió para extraer las semillas las que fueron colocadas en un recipiente que contenía peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una concentración del 30 %, después de una agitación continua durante sesenta minutos se realizaron un lavado con agua destilada estéril, se esparció las semillas a ser sembradas (máximo 8 semillas) en una servilleta esterilizada con la ayuda de pinzas se retiró la alas, se sembró cuatro semillas en cada frasco que contenía 30 ml de medio Woody Plant Medium (Lloyd & McCown, 1980). Se selló y etiquetó los frascos una vez finalizado el proceso fueron transferidos al cuarto de cultivo.

La germinación de las semillas *in vitro* comenzó a partir de los 40 días en promedio, después de la siembra en medio basal WPM, de las plantas germinadas *in vitro* a los 60 días se seleccionaron aquellas de mayor tamaño y vigorosidad, para el establecimiento de los explantes en la fase de brotación, en cámara de flujo laminar y bajo estrictas normas de asepsia se colocó la planta germinada *in vitro* sobre papel absorbente esterilizado y con la ayuda de una pinza y bisturí se separó la radícula y la parte apical dejando únicamente la parte epicotiledonal la misma que portaba dos yemas axilares, el que constituyó como explante de partida, posteriormente con pinzas esterilizadas, se colocó un explantes en los medios para brotación $MS\frac{1}{2}$ y WPM a diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (0.0; 0.3; 0.6; 0.9 ppm BAP), se selló los frascos y etiquetó. Los explantes sembrados al final de este proceso, se trasladaron al cuarto de cultivo.

La fase de enraizamiento se realizó en cámara de flujo laminar y para iniciar, se seleccionó los brotes provenientes de la fase de brotación que tuvieron una longitud igual o mayor a 1.5 cm, se los colocó en el medio para enraizamiento $MS\frac{1}{2}$ y $WPM\frac{1}{2}$ con 45 gramos de sacarosa, 0.25 gramos de carbón activado, 0.01 ppm de ácido naftalénacético (ANA) y diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (0.0; 0.2; 0.4; 0.6 ppm IBA) se selló los frascos y etiquetó. Los explantes sembrados al final de este proceso, se trasladaron al cuarto de cultivo.

Las semillas y los explantes inoculados en los tratamientos correspondientes, se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas, con una temperatura promedio de $22\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, una intensidad luminosa de 4000 lux, una humedad relativa promedio de 60 % y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Las variables que se analizaron en la fase de brotación fueron: días a la formación de brotes, número de brotes y altura del brote; mientras que las variables analizadas en la fase de enraizamiento fueron: días al enraizamiento, longitud de raíces, número de raíces y altura del planta. Además culminado el ensayo se realizó el costo de producción por planta de Yalomán cultivada *in vitro*.

Para el análisis estadístico se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un factorial 2×4 conformado por seis observaciones por tratamiento, resultando un total de 48 unidades experimentales conteniendo 1 explantes por cada frasco. Los factores en estudio fueron: Medios de cultivo (M), dosis de 6-benciadenina (B) y dosis de ácido indolbutírico (I). Se aplicó la prueba de Tukey al 5 % para dosis de BA e IBA y para sus interacciones, mientras que para el factor medios de cultivo se aplicó la prueba de DMS al 5 %.

Conforme a los resultados obtenidos se concluyó que; en la fase de brotación, Woody Plant Medium (WPM) suplementado con 0.6 ppm de BAP, fue el medio que favoreció los días a la brotación, número de brotes y longitud de brotes. En la fase de enraizamiento, Woody Plant Medium la mitad de la concentración de sales (WPM $\frac{1}{2}$), suplementado con 0.025 ppm de ANA, 0.25 gramos de carbón activado, 45 g de sacarosa y 0.2 ppm de IBA fue el medio que favoreció los días al enraizamiento, longitud de las raíces y longitud de planta. El costo de producción de plantas de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don) usando la técnica de micropropagación tuvo un costo de 4.22 USD/planta. Realizando una proyección de producción de 10 000 plantas con la misma técnica se obtuvo un costo de 0.46 USD/planta.

Además, se recomendó micropropagar explantes de “Yalomán” (*Delostoma integrifolium* D. Don.); empleando secciones del epicótilo, provenientes de semillas germinadas *in vitro* de ocho semanas de edad, empleando el medio basal WPM.

Suplementar a WPM con 0.6 ppm de BAP para la fase de brotación y para la fase de enraizamiento utilizar WPM $\frac{1}{2}$ incrementando la fuente de carbono (45 g/l de azúcar), adicionar 0.1 ppm de ANA, 1 g/l de carbón activado y suplementar con 0.2 ppm de IBA.

SUMMARY

Ecuador is recognized worldwide for its rich flora and fauna, which is a permanent threat, given by a continuous and persistent human pressure on natural resources. Overexploitation has caused serious environmental problems such as indiscriminate deforestation, loss of biodiversity, undermining the environmental balance, and consequently for the restoration of the Andean ecosystems of our country, requires native plant material and in good sanitary conditions.

Delostoma integrifolium D. Don is a tree native to Venezuela, Colombia, Ecuador and Peru. It is used as a common ornamental species for its abundant and colorful flowering found in parks and gardens, considered a heritage tree of the City of Quito and of great ecological value, being native, present a magnificent porte and its considerable size , being considered a valuable natural asset addition it is recommended for soil remediation at heights of more than 2800 m since being native is easily adapted to adverse conditions and efficiently fulfills the function of phytoremediation species.

However, the spread of this species is difficult who state that the factor that hinders the spread of this species is the low percentage of seed germination. Also, it is difficult to locate specimens of this species with desirable agronomic traits, because in Ecuador is a species with little geographical distribution, so it is necessary to develop initiatives that promote conservation, being an alternative the use of techniques in vitro cultivation of plant tissues. This technique has revolutionized the forestry production in recent years, because they can generate clones of elite varieties in bulk and in less time, can produce plants year round regardless of climate factor and enables to obtain disease-free plants and pathogens.

In research conducted at the Laboratory of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences of the Central University of Ecuador the effect of two culture media and four doses of 6-benzylaminopurine (BAP) for the phase of sprouting was assessed four dose of indolebutyric acid (IBA) for rooting phase *in vitro* culture, from a section of the epicotyl with two axillary buds of seedlings Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don) from in vitro germinated seeds eight weeks old.

The study with capsule collection in the Ecological Park "Cachaco" which is located in the parish of Amaguaña 28 km southwest of the Metropolitan District of Quito, Pichincha province, to 2 683 meters above sea level, selecting representative vigorous trees in the area with lots of caps and abundant foliage that no symptoms of disease or insect attack, becoming the donor source of explants.

Once collected capsules were categorized five grams of detergent active tense three drops of Tween 80, after continuous stirring for ten minutes five successive washes were performed, the first two with water and the last three are added with water distilled. Laminar flow chamber disinfection was performed with a sodium hypochlorite solution of 250 ml and 50 ml of sterile distilled water with constant stirring for ten minutes, after the time five rinses with sterile distilled water one minute each are done, then the capsules which were sprayed with 96 % alcohol and the flared, with the aid of forceps and scalpel is the opened to remove the seeds which were placed in a vessel containing hydrogen peroxide (H₂O₂) was taken at a concentration of 30 %, after continuous stirring for sixty minutes wash with sterile distilled water were performed, the seeds are spread to be planted (maximum 8 seeds) in a napkin sterilized with the help of tweezers the wings are removed, four

seeds were planted in each flask containing 30 ml of medium Woody Plant Medium was sealed and labeled bottles once the process is completed were transferred to the culture room.

The *in vitro* germination of seeds started from 40 days on average after planting WPM basal medium, the plants germinated *in vitro* at 60 days those larger and vigor were selected for the establishment of explants at the stage of budding, in laminar flow chamber and under strict aseptic plant *in vitro* germinated on absorbent paper and with sterilized tweezers and scalpel was placed radicle was removed and the apical part leaving only the part epicotiledonal the same as that carried two axillary buds, which constituted as starting explant subsequently with sterile tweezers, explants were placed on MS media for budding WPM $\frac{1}{2}$ and different concentrations of 6-benzylaminopurine (0.0, 0.3, 0.6, 0.9 ppm BAP), the bottles were sealed and labeled. The explants planted at the end of this process, moved the grow room.

The rooting phase was conducted in laminar flow chamber and to initiate buds from sprouting stage that had a length equal to or greater than 1.5 cm, was selected will be placed in the rooting medium for MS $\frac{1}{4}$ and WPM $\frac{1}{2}$ with 45 g of sucrose, 0.25 g of activated carbon, 0.01 ppm of naphthaleneacetic acid (NAA) and different concentrations of indolebutyric acid (0.0, 0.2, 0.4, 0.6 ppm IBA) sealed vials and labeled. The explants planted at the end of this process, moved the grow room.

The seeds and explants inoculated in the corresponding treatments were kept under controlled environmental conditions, with an average temperature of 22 ° C + / - 2 ° C, a light intensity of 4000 lux, an average relative humidity of 60 % and a photoperiod 16 hours light and 8 hours dark.

The variables that were analyzed in the budding stage were: days to shoot formation , number of shoots and shoot height, while the variables analyzed in the rooting phase were: days to rooting, root length, number of roots and plant height. Besides the cost completed the trial was carried out by plant Yalomán cultured *in vitro*.

Statistical analysis was used Design Completely Randomized (DCA) with a 2x4 factorial consists of six observations per treatment, resulting in a total of 48 experimental units containing 1 explants per jar. The factors studied were: culture medium (M), doses of 6-benzylaminopurine (B) and dose of indolebutyric acid (I). Tukey's test was applied to 5% for doses of BA and IBA and their interactions, whereas the culture media factor DMS test was applied to 5%.

In accordance to the results obtained it was concluded that, at the stage of budding, Woody Plant Medium (WPM) supplemented with 0.6 ppm of BAP was the favored medium days sprouting, number of shoots and shoot length. In the rooting phase, Woody Plant Medium half the salt concentration (WPM $\frac{1}{2}$) supplemented with 0.01 ppm of NAA, 0.25 grams of activated carbon, 45 g/l of sucrose and 0.2 ppm of IBA was the average day favoring rooting, root length and floor length. The cost of producing plants Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don) using micropropagation technique has a cost of 4.22 USD/plant. Projecting a production of 10 000 plants with the same technique cost 0.46 USD/plant was obtained.

In addition, micropropagation explants "Yalomán" (*Delostoma integrifolium* D. Don) was recommended, using sections of epicotyl, from seeds germinated *in vitro* for eight weeks old, using the basal medium WPM.

WPM supplemented with BAP 0.6 ppm for phase sprouting and rooting for stage use WPM½ increasing the carbon source (45 g/l of sugar), add 0.1 ppm ANA, 1g/l of activated charcoal and supplemented with 0.2 ppm IBA.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOUR; A. MUÑOZ, A. 2005. Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). Kurú: Revista Forestal (Costa Rica) 2 (5): p. 1 Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://www.tec-digital.itcr.ac.cr/servicios/ojs/index.php/kuru/article/download/541/467>

ABEDINI, W.; BOERI, P.; MARINUCCI L.; RUSCITTI M.; SCELZO L. 2000. Biotécnicas aplicadas a especies forestales nativas. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, AR. 43 p. Consultado 09 de may 2014 Disponible en <http://www.inia.es/IASPF/2000/vol9/abedi.pdf>

ARIAS, G. 1983. Propagación de *Alnus jorullensis*. H. B. K. var *spachii*. y *Delostoma roseus* Karst. y Tr. a nivel de invernadero en el cantón Riobamba. Tesis Ing. Agr. Riobamba, EC. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Facultad de Ingeniería Agronómica. p. 10-11

AYALA, A. 2011. Establecimiento de cultivo *in vitro* de molle (*Schinus molle* L.) a partir de yemas axilares tomadas de plantas madre como una herramienta para la propagación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito. Tesis Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología. p. 37

BASANTES, M. 2011. Evaluación del efecto de ácido α -naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA_3) en las fases de inducción, multiplicación y enraizamiento *in vitro* a partir de yemas apicales de *Valeriana scandens*. Tesis Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología. p. 11-12; 14

BILLARD, C.; LALLANA, V. 2005. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. Ciencia, Docencia y Tecnología. 16 (30): p. 208-214 Consultado el 09 may 2014 Disponible en: http://www.revistacdyt.uner.edu.ar/pdfs/Cdt30_Billard.pdf

CÁCERES, G. 2012. Cultivo *in vitro* de meristemos de plantas, previamente obtenidas por germinación *in vitro* de semillas de cholán (*Tecoma stans*). Tesis Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología. 83 p.

CÁRDENAS, M. 2011. “Determinación del protocolo de establecimiento y multiplicación *in vitro* de Quishuar (*buddleja incana*), a partir de yemas axilares de plantas madre, como una herramienta para la preservación de esta especie dentro del Distrito Metropolitano de Quito”. Tesis Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología. p. 20

CARRANZA, M.; CRUZ, O.; NIETO. E.; SAUCEDO, S.; CEVALLOS, O.; ESCOBAR, A.; REYES, X., MORANTE, J. 2012. Propagación de *Tabebuia donnell-smithii* Rose (Guayacán Blanco) utilizando hormonas de enraizamiento. Quevedo, EC. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Ambientales. p. 18

CERÓN, C. 2003. Manual de Botánica. Herbario “Alfredo Paredes” QAP”, Escuela de Biología de la Universidad Central del Ecuador. p. 73

CESA (Central Ecuatoriana de Servicios Agropecuarios, EC). 1992. Usos tradicionales de las especies forestales nativas en el Ecuador. Quito, EC. p. 23-24

CHUQUISANA, R. 1988. Estudio Fitoquímico de la *Delostoma integrifolium* D. Dom. Revista de química 11 (1) PE. p. 72 Consultado el 09 de may 2014 Disponible en: <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/download/4885/4883>

CONIF (Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal, CO). 2001. Aplicación de los Métodos de estacas e injertos para la propagación vegetativa de *Cordia alliodora* (Ruíz & Pavón) Oken y *Tabebula rosea* (Bertol.) DC. Bogotá, CO. p. 12 Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://190.60.31.203:8080/jspui/bitstream/123456789/2151/1/017.pdf>

CORANTIOQUIA (CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL CENTRO DE ANTIOQUIA, CO). 2007. Manejo de las semillas y la propagación de diez especies forestales del bosque húmedo tropical. Medellín, CO. p. 48-51 Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://nuevoportal.corantioquia.gov.co/Publicaciones/Publicaciones%20Institucionales/Bolet%C3%AD%C2%ADn%20T%C3%A9cnico%20Biodiversidad%20No%202.pdf>

DAQUINTA, M.; RAMOS, L.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; TRINA, D.; ESCALONA, M. (s/f). Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.F.). Turrialba, CR. Consultado el 09 de may 2014 p. 26-28 Disponible en: <http://web.catie.ac.cr/informacion/RFCA/rev35/pagina25-28.pdf>

DELGADILLO, J.; MORALES, J.; SANTOS, M.; PÉREZ, B. 2013. Propagación *in vitro* de Mexicanos Oaks (*Quercus* spp.). Polibotánica, núm. 35, febrero, 2013. Distrito Federal, MX. 97 p. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://www.herbario.encb.ipn.mx/pb/pdf/pb35/querc.pdf>

DUARTE, E.; LUNA, C.; SANSBERRO, P. 2011. Regeneración directa de brotes de *Jacaranda mimosifolia* por cultivo *in vitro* de embriones inmaduros. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), Instituto de Botánica del Nordeste. Buenos Aires, AR. s.p. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://agr.unne.edu.ar/Extension/Res2011/Biotecnologia/Biotec-08.pdf>

DUBOS, R. 2006. Establecimiento *in vitro* de diferentes especies y genotipos del género *Rhododendron* mediante el uso de técnicas de micropropagación. Tesis Lic. Agronomía. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía. Valdivia, CL. p. 14; 46-50 Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fad817e/doc/fad817e.pdf>

EMMOP-Q (Empresa Metropolitana del Distrito Metropolitano de Quito), s.f. Ubicación de fuentes semilleras en la región andina. Banco de semillas forestales de Cununyacu. Quito, EC. (Afiche)

ESTOPÁ, M. 2005. El cultivo *in vitro* en la producción vegetativa en plantas en vivero. Valencia, ES. p. 54

FBMC (Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, AR). 2011. Micropropagación comercial. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, AR. Consultado el 09 may 2014 Disponible en:

http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/teoricas-archivo-word/3%20-%20Cultivo%20de%20tejidos.doc/at_download/file

FERNÁNDEZ, L.; OTERO, E.; VEIGA, M. (s/f). Micropropagación de clones seleccionados de *Quercus robur* L. Universidade de Santiago de Compostela. Escola Politécnica Superior de Lugo. Dpto. de Producción Vexetal. Lugo, ES. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://apps.incamedio.com/ojssecforestales/index.php/congresos/article/download/6056/5983>

FIA (Fundación para la Innovación Agraria, CL). 2010. Resultados y Lecciones en propagación *in vitro* en especies ornamentales, Proyecto de Innovación en las regiones de Valparaíso, de Magallanes y Metropolitana, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. CL. p. 10 Consultado el 09 may 2014 Disponible en: http://bibliotecadigital.fia.cl/gsd/collect/publicac/index/assoc/HASH0b8b.dir/86_Libro_Ornamentales.pdf

FLOR, E. 2013. Evaluación de Medios de Cultivo Para La Micropropagación De Algarrobo Tropical (*Prosopis pallida*) h.b.k. Quito, Pichincha. Tesis Ing. Agr. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Carrera de Ingeniería Agronómica. p. 15-16 Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/989/1/T-UCE-0004-14.pdf>

GAA (GOBIERNO AUTONOMO DE AMAGUAÑA, EC). 2011. Datos Generales. Quito, EC. Consultado el 09 de may 2014 Disponible en: http://amaguania.gob.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=51&Itemid=83

GAMBORG, O. 1991. Plant tissue culture. In: Tissue culture for crops: Project. Physiol Department Colorado State University, For Collins. San Francisco, US. Universidad de Colorado. p. 1-24

GBIF (Global Biodiversity Information Facility, s/l). 2010. *Delostoma integrifolium* D. Don. Species: *Delostoma integrifolium* D. Don. Consultado el 09 de may 2014 Disponible: <http://www.gbif.org/species/4093319>

GENTRY, A. 2009. Bignoniaceae. Flora de Colombia No. 25. Bogotá, CO. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Printed in Colombia. p. 153-154

GONZÁLEZ, G. 2010. Métodos Estadísticos. 3 ed. Quito, EC. Editorial Universitaria. p. 20

GORDÓN, C. 2012. Establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro* a partir de segmentos nodales de cucarda (*Hibiscus rosa-sinensis*) como estrategia de reforestación del espacio público del distrito metropolitano de Quito. Tesis Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología. 110 p.

GUTIÉRREZ, S. 2008. Esterilización por calor húmedo. VE. 5 p. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Esterilizaci%C3%B3n_por_calor_h%C3%BAmedo.pdf

HGGVC, (Herbario Gabriel Gutiérrez V. Medel, CO); ICN (Instituto de Ciencias Naturales, CO). s. f. COL000211626 - *Delostoma integrifolium* D. Don - Bignoniaceae. Cundinamarca, CO. s.p Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=3109>

_____. s. f. COL000211627 - *Delostoma integrifolium* D. Don – Bignoniaceae. Valle del Cauca, CO. s.p Consultado el 09 may 2014 Disponible: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=624167>

HUACHI, L. 2008. Mejoramiento del suelo mediante la producción de un abono orgánico a partir de estiércol animal, en el parque Metropolitano de Quito. Tesis MSc en Gestión Ambiental y la Industria. Quito, EC. Universidad Internacional SEK. Facultad de Ciencias Ambientales, Maestría en Gestión Ambiental. p. 43; 124

IZQUIERDO, P. 2006. Protocolos de micropropagación para *Darwiniothamnus alternifolius* y *Scalesia affinis* endémicas de las Islas Galápagos, en peligro crítico de extinción. Tesis Ing. Agr. Quito, EC. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Carrera de Ingeniería Agronómica. p. 19-20

JÁCOME, A. 2011. Micropropagación *in vitro* de la especie endémica: Jiguerón (*Aegiphila ferruginea*), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción. Tesis Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología. p. 24-25; 36

JARAMILLO, K. 2013. Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de arrayán (*Myrcianthes hallii*) (O. Berg) mc vaugh. Quito, Pichincha. Tesis Ing. Agr. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Carrera de Ingeniería Agronómica. Quito, EC. 87 p. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1103/1/T-UCE-0004-17.pdf>

JBQ (JARDÍN BOTÁNICO DE QUITO, EC). Arboles Patrimoniales DMQ. Quito, EC. s.e. s.p.

JIMÉNEZ, C. 2007. “Estudio de prefactibilidad para la implementación de un vivero forestal en la parroquia de Alangasí, 2006”. Tesis Ing. en Maderas. Quito, EC. Universidad Tecnológica Equinoccial, Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Carrera de Ingeniería en Maderas. p. 42

JORDÁN, M; CASARETTO, J. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. Serena, CL. Universidad de La Serena. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>

LANDÁZURI, P. 1996. Introducción *in vitro*, Micropropagación, Conservación y Aclimatización de Zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza*) y Achira (*Canna edulis*). Lic. Ciencias Biológicas. Quito, EC. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ciencias Biológicas. p. 5

LEÓN, S.; AYALA, M. 2007. Flores Nativas de Quito. Guía fotográfica. Publicaciones del herbario QCA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, EC. p. 3

LLOYD, G.; B. MCCOWN. 1980. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society, Washington, US. s.e. p. 421-427

LÓPEZ, N.; MIGUEL, M.; ALEXANDRE, A. 2012. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. Madrid, ES. p. 81-82 Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://revista.nutricion.org/PDF/PROPIEDADES.pdf>

LOZANO C., 2002. Los tipos de bosque en el sur del Ecuador. Quito, EC. s.e. p. 40-41

MAE (Ministerio del Ambiente del Ecuador, EC). 2010. Reservas de Biosfera del Ecuador: lugares excepcionales. GTZ/GESORENDED- WCS- NCI-UNESCO/Quito. 116 p. Quito, EC. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: http://web.ambiente.gob.ec/sites/default/files/users/jloartefls/RB_LibroRBdelEcuador.pdf

_____. 2012. Metodología para la Representación Cartográfica de los Ecosistemas del Ecuador Continental. Quito, EC. p. 94

_____. 2012. Sistema de clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental. Subsecretaría de Patrimonio Natural. Quito, EC. MAE. 136 p.

MARÍN, J. 1997. La micropropagación y la mejora de especies frutales. Zaragoza, ES. Consultado el 09 may 2014 Disponible en http://digital.csic.es/bitstream/10261/19028/1/Mar%C3%ADnJ_DiscursoAcadCEFQN_1997.pdf

MERINO, B.; GUTIÉRREZ, M. 2010. Inventario de las plantas del Jardín Botánico “Reinaldo Espinosa” y del Parque Universitario “Francisco Vivar Castro”. Universidad Nacional de Loja. Área de Recursos Naturales Renovables. Herbario y Jardín Botánico “Reinaldo Espinosa”. Loja, EC. p. 16

MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P.; FLASCHLAND, E. 2010. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. La Plata, AR. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf

MURASHIGE, T.; F. SKOOG. 1962. A revised médium for rapid grown and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*. Washinton, US. s.e. p. 473-497

NIETO, V., VALDIVIESO, M. 2013. Establecimiento de un protocolo de regeneración *in vitro* y aclimatación para *Fichsia pilaloensis* y *Fichsia hybrida* para su conservación. Tesis Ing. Biotecnología de los Recursos Naturales. Quito, EC. Universidad Politécnica Salesiana. Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. p. 24; 33

OCAMPO, F.; NÚÑEZ, V. M. 2007. Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales *Revista Corpoica*. 8(1): 22-27 Cundinamarca, CO. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Revista/3.PropagacininvitrodePsidiumguajaba.pdf>

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E. 2010. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. La Plata, AR. p. 163-166 Consultado el 09 may 2014 Disponible en http://www.argenbio.org/adc/uploads/Libro_INTA_II/Parte_IV.pdf

ORDOÑEZ, M. 2013. Evaluación de medios de cultivo sobre las fases de micropropagación *in vitro* de la especie forestal nativa Yagual (*Polylepis incana*) en la Provincia de Pichincha-2012. Tesis Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología. p. 20; 24-25

OROZCO, W. 2012. Establecimiento del protocolo de micropropagación de Hortensia (*Hydrangea macrophylla*) a partir de segmentos nodales, como una estrategia de producción a gran escala, para su utilización ornamental en los espacios públicos del Distrito Metropolitano de Quito. Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología. p. 23, 36

OSCULLO, M. 2011. Organogénesis indirecta *in vitro* de Anturio (*Anthurium andreanum* L.), a partir de secciones de hoja. Tesis Ing. Agropecuaria. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias De La Vida, Carrera de Ingeniería En Ciencias Agropecuarias, Hacienda "El Prado" IASA. p. 21, 23

PALACIOS, W. 2011. Arboles del Ecuador. Quito, EC. Ministerio del ambiente. p. 856

PALLA, K.; PIJUT, P. 2011. Regeneration of plants from *Fraxinus americana* hypocotyls and cotyledons. West Lafayette, US. p. 250-256 Consultado el 09 may 2014 Disponible en <http://www.agriculture.purdue.edu/fnr/htirc/pdf/publications/IVCDB-P-2011-Palla-Pijut.pdf>

PATIÑO, M. 2011. Evaluación de Métodos de desinfección y medios de cultivo para la multiplicación *in vitro* de guarango (*Caesalpinia spinosa* Mol.O.Kuntz). Tesis Ing. Forestal. Riobamba, EC. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ingeniería Forestal. p. 9-10, 13-14

PAUCAR., M. 2011. Organogénesis directa *in vitro* a partir de explantes de hojas de Mora (*Rubus glaucus* Benth). Tesis Ing. Agropecuario. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento De Ciencias De La Vida, Carrera De Ingeniería En Ciencias Agropecuarias, Hacienda "el prado" IASA. p. 4

PÉREZ, J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, CU. Instituto de biotecnología de las plantas. 156 p.

PÉREZ, J.; MESÉN, F.; HILJE, L.; AGUILAR, M. (S/F). Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Optimización de la fase de multiplicación. Turrialba, CR. 71 p. Consultado el 09 may 2014 Disponible en <http://web.catie.ac.cr/informacion/RFCA/rev38/ct10.pdf>

_____. 2001. Método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata*. Fases de desarrollo y enraizamiento. Turrialba, CR. p. 146-151 Consultado el 09 de may 2014 Disponible en <http://web.catie.ac.cr/informacion/RFCA/rev46-47/Pag.%c.pdf>

PIERIK, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3 ed. Madrid, ES. Mundi- Prensa. p. 325

RAMÍREZ, P. 2013. Evaluación de Medios de Cultivo para la Micropropagación de Faique (*Acacia macrantha*). Mc Vaugh. Quito, pichincha. Tesis Ing. Agr. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Carrera de Ingeniería Agronómica. 111 p.

RAMOS, L., CRUZ, N. VILLACÍS, O. 2001. Micropropagación Clonal *in vitro* de árboles Seleccionados de *Tectona grandis* L. (Teca). Quevedo, EC. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Laboratorio De Biotecnología. p. 1

RECALDE, C. 2007. Establecimiento del cultivo *in vitro* y climatación en invernadero de *Nepeta hederacea* variegata, Tabacundo – Pedro, Moncayo, 2006. Tesis Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología. 92 p.

REMACHE, L. 2011. Desarrollo de una técnica de micropropagación *in vitro* de cedro (*Cedrela monatana*) a partir de ápices, hojas y entrenudos. Tesis Ing. Forestal. Riobamba, EC. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ingeniería Forestal. p. 14-15

ROCA, W.; MROGINSKI, L. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Establecimiento de cultivo de tejidos *in vitro*. Cali, CO. Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 969; 1039

RODRÍGUEZ, A. 2012. Estructura organizativa y de gestión del Banco de Semillas UTPL. Tesis Ing. En Gestión Ambiental. Universidad Técnica Particular De Loja. Loja, EC. Escuela de Ciencias Biológicas y Ambientales, Carrera Ingeniería en Gestión Ambiental. p. 2

RUALES, C. 2007. Estudios para la recuperación de la flora nativa en el valle de Tumbaco-Distrito Metropolitano de Quito: Inventario florístico y ensayo de propagación vegetativa. Tesis MSc. Gestión Ambiental. Quito, EC. Universidad San Francisco De Quito, Colegio de Postgrados. p. 57-58

SALAS, E. S.F. Las Micorrizas y su importancia para el manejo y conservación de los árboles del trópico. Universidad Nacional de Costa Rica, Escuela de Ciencias Agrarias. CR. p. 1-3 Consultado el 09 may 2014 Disponible: <http://virtualplant.net/forestal/resources/uploaded/resources/Eduardo-Salas.pdf>

SANTA CRUZ, L. 2011. Flora de espermatofitas del distrito de Pulán, Santa Cruz, Cajamarca. Tesis MSc. Botánica tropical con mención en Taxonomía y Sistemática Evolutiva. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 90 p. Lima, PE. Consultado el 09 de may 2014 Disponible: <http://plantasdepulan.blogspot.com/2012/08/familia-bignoniaceae.html>

SANTOS, W. 2011. Propagação *in vitro* de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae). Mestre em Botânica. Brasília DF, BR. Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica. 125 p.

SUÁREZ, I.; JARMA, A.; AVILA, M. 2006. Desarrollo De Un Protocolo Para Propagación *in vitro* de Roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural. Montería, CO. s.p. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://www.unicordoba.edu.co/revistas/rta/documentos/11-2/112-6.pdf>

SUNSERI, F. 2001. Tecniche di Colture Cellulari. Facoltà di agraria, Università degli studi della Basilicata. Potenza, IT. 91 p. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: https://www.unirc.it/documentazione/materiale_didattico/140_2012_316_15695.pdf

TORO, M. 2009. Mejoramiento del proceso de propagación *in vitro* de plantas de arándano para las variedades bluecrop, duke y misty. Universidad De Chile, Facultad De Ciencias Agronómicas, Escuela De Agronomía. Santiago de Chile, CL. p. 9 Consultado el 09 may 2014 Disponible en: http://www.tesis.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112441/Memoria_marisol.pdf?sequence=1

TORRETTA, J.; CERINO, M. 2013. Biología reproductiva de tres especies simpátricas de Bignoniaceae en Argentina. Buenos Aires, AR. p. 73 Consultado el 09 may 2014 Disponible en: http://www.botanicargentina.com.ar/boletin/48-1/06_torretta.pdf

TRUJILLO, D. 2008. Cultivo *in vitro* del Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). Tesis B.S. en Biotecnología. Quito, EC. Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. p. 36-40

ULLOA C Y MOLLER P. 1993. Árboles y arbustos de los andes del Ecuador. Departamento de ciencias biológicas PUCE. Quito, EC, CESA. p. 34

UN (Universidad Nacional de Colombia, CO); DICYT (Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y la tecnología, CO). 2010. Una avispa sirve de “insecticida” contra la dañina mosca blanca. Valle del Cauca, CO. s.p Consultado el 09 de may 2014 Disponible en: <http://www.dicyt.com/noticias/una-avispa-sirve-de-insecticida-contra-la-danina-mosca-blanca#>

USDA, ARS, Programa de Recursos Genéticos Nacional de Recursos de Germoplasma Red de Información - (GRIN) [base de datos en línea]. Nacional de Recursos de Germoplasma de laboratorio. Maryland, US. s.p Consultado el 09 may 2014 Disponible en: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?13403>

VARGAS, W. 2002. Guía Ilustrada de las Plantas de las Montañas del Quindío y los Andes Centrales. p. 179-180 Manizales, CO. Consultado el 09 de may 2014 Disponible en: <http://books.google.com.ec/books?id=Omzm3LW0mZUC&pg=PA178&dq=Gu%C3%ADa+Ilustrada+de+las+Plantas+de+las+Monta%C3%B1as+del+Quindi%CC%81o+y+los+Andes+Centrales+delostoma&hl=es&sa=X&ei=UPqIUpzZObKx4AP6pICADw&ved=0CCwQ6AEwAA#v=onepage&q=Gu%C3%ADa%20Ilustrada%20de%20las%20Plantas%20de%20las%20Monta%C3%B1as%20del%20Quindi%CC%81o%20y%20los%20Andes%20Centrales%20delostoma&f=false>

VILLAMIZAR, E. 2005. Estandarización del Protocolo *in vitro* para el Establecimiento de Encenillo (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) y de Rodamonte (*Escallonia myrtilloides* L.F) en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos del Jardín Botánico José Celestino Mutis. Universidad Francisco De Paula Santander, Facultad de Ciencias Agrarias y Del Ambiente, Programa De Ingeniería De Producción Biotecnológica San José De Cúcuta. p. 7; 11-12 San José de Cúcuta, CO. Consultado el 09 may 2014 Disponible en: http://oab.ambientebogota.gov.co/apc-aa-files/57c59a889ca266ee6533c26f970cb14a/cultivo_de_tejidos.pdf.

9. ANEXOS

Anexo 1. Componentes de Woody Plant Medium (WPM) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

STOCK	SALES	CONCENTRACIÓN INICIAL g/litro	CONCENTRACIÓN FINAL g/litro	VOLUMEN A USAR ml/litro
A	NH ₄ NO ₃	20.0	400	20
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	27.8	556	
B	K ₂ SO ₄	49.5	990	20
C	CaCl ₂ ·2H ₂ O	19.2	96	5
D	KH ₂ PO ₄	34.0	170	5
	H ₃ BO ₃	1.24	6.2	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05	0.25	
E	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74.0	370	5
	MnSO ₄ ·H ₂ O	3.38	16.9	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.72	8.6	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005	0.025	
F	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.57	27.8	5
	Na EDTA	7.45	37.3	
G	Tiamina-HCl	0.2	1.0	5
	Ácido nicotínico B3	0.1	0.5	
	Piridoxina-HCl	0.1	0.5	
	Glicina	0.4	2.0	
H	Myoinositol	20.0	100	5
Sacarosa				30
Agar				6.5
Ph	KOH	5.6		

Anexo 2. Componentes de Murashige & Skoog (MS^{1/2}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

STOCK	SALES	CONCENTRACIÓN INICIAL g/litro	CONCENTRACIÓN FINAL mg/litro	VOLUMEN A USAR ml/litro
I	NH ₄ NO ₃	82.5	1650	10
	KNO ₃	95.0	1900	
II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	37	370	5
	MnSO ₄ ·H ₂ O	2.23	22.3	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.058	10.6	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025	0.025	
III	CaCl ₂ ·2H ₂ O	44	440	5
	KI	0.083	0.83	
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025	0.025	
IV	KH ₂ PO ₄	17	170	5
	H ₃ BO ₃	0.62	6.2	
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0025	0.25	
V	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.784	27.85	5
	Na EDTA	3.724	37.25	
Vitaminas	Ácido nicotínico	100 ppm	0.5	5
	Piridoxina	100 ppm	0.5	5
	Tiamina	100 ppm	0.1	1
	Glicina	100 ppm	2.0	20
Myoinositol		1000 ppm	100	10
Sacarosa				30
Agar				6.5
pH		5.8		

Anexo 3. Componentes de Woody Plant Medium (WPM^{1/2}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

STOCK	SALES	CONCENTRACIÓN INICIAL g/litro	CONCENTRACIÓN FINAL mg/litro	VOLUMEN A USAR ml/litro
A	NH ₄ NO ₃	20.0	400	10
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	27.8	556	
B	K ₂ SO ₄	49.5	990	10
C	CaCl ₂ .2H ₂ O	19.2	96	2.5
D	KH ₂ PO ₄	34.0	170	2.5
	H ₃ BO ₃	1.24	6.2	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.05	0.25	
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	74.0	370	2.5
	MnSO ₄ .H ₂ O	3.38	16.9	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.72	8.6	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.005	0.025	
F	FeSO ₄ .7H ₂ O	5.57	27.8	2.5
	Na EDTA	7.45	37.3	
G	Tiamina-HCl	0.2	1.0	5
	Ácido nicotínico B3	0.1	0.5	
	Piridoxina-HCl	0.1	0.5	
	Glicina	0.4	2.0	
H	Myoinositol	20.0	100	5
Sacarosa				45
Agar				6.5
pH	KOH	5.6		

Anexo 4. Componentes de Murashige & Skoog (MS^{1/4}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

STOCK	SALES	CONCENTRACIÓN INICIAL g/litro	CONCENTRACIÓN FINAL mg/litro	VOLUMEN A USAR ml/litro
I	NH ₄ NO ₃	82.5	1650	5
	KNO ₃	95.0	1900	
II	MgSO ₄ .7H ₂ O	37	370	2.5
	MnSO ₄ .H ₂ O	2.23	22.3	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.058	10.6	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025	0.025	
III	CaCl ₂ .2H ₂ O	44	440	2.5
	KI	0.083	0.83	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025	0.025	
IV	KH ₂ PO ₄	17	170	2.5
	H ₃ BO ₃	0.62	6.2	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0025	0.25	
V	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.784	27.85	2.5
	Na EDTA	3.724	37.25	
Vitaminas	Ácido nicotínico	100 ppm	0.5	5
	Piridoxina	100 ppm	0.5	5
	Tiamina	100 ppm	0.1	1
	Glicina	100 ppm	2.0	20
Myoinositol		1000 ppm	100	10
Sacarosa				45
Agar				6.5
pH		5.8		

Anexo 5. Costos variables de un litro de Murashige & Skoog (MS^{1/2}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

COMPUESTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO (USD)	TOTAL (USD)
NH ₄ NO ₃	gr	0.412500	0.040	0.01650000
KNO ₃	gr	0.475000	0.004	0.00190000
MgSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.092500	0.380	0.03515000
MnSO ₄ .4H ₂ O	gr	0.005500	0.290	0.00159500
ZnSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.002000	0.308	0.00061600
CuSO ₄ .5H ₂ O	gr	0.000013	0.080	0.00000100
CaCl ₂ .H ₂ O	gr	0.110000	0.293	0.03223000
KI	gr	0.000415	0.540	0.00022410
CoCl ₂ .6H ₂ O	gr	0.000013	0.910	0.00001138
KH ₂ PO ₄	gr	0.042500	0.170	0.00722500
H ₃ BO ₃	gr	0.001500	0.179	0.00026850
NaMoO ₄ .2H ₂ O	gr	0.000013	0.480	0.00000600
FeSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.007000	0.221	0.00154700
Na ₂ EDTA	gr	0.009500	1.074	0.01020300
Ácido nicotínico	gr	0.001000	0.541	0.00054100
Piridoxina HCl	gr	0.001000	3.289	0.00328900
Tiamina HCl	gr	0.001000	2.017	0.00201700
Glicina	gr	0.002000	106.920	0.21384000
Myoinositol	gr	0.100000	1.052	0.10520000
Sacarosa	gr	30	0.040	1.20000000
Agar	gr	6.5	1.440	9.36000000
TOTAL				10.99236398

Anexo 6. Costos variables de un litro de Woody Plant Medium (WPM) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

COMPUESTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO (USD)	TOTAL (USD)
NH ₄ NO ₃	gr	0.40000	0.040	0.0160000
MgSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.37000	0.380	0.1406000
MnSO ₄ .4H ₂ O	gr	0.02230	0.290	0.0064670
ZnSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.00860	0.308	0.0026488
K ₂ SO ₄	gr	0.99000	0.540	0.5346000
CuSO ₄ .5H ₂ O	gr	0.00010	0.080	0.0000080
CaCl ₂ .H ₂ O	gr	0.09600	0.293	0.0281280
Ca(NO ₃) ₂	gr	0.55600	0.910	0.5059600
KH ₂ PO ₄	gr	0.17000	0.170	0.0289000
H ₃ BO ₃	gr	0.00620	0.179	0.0011098
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	gr	0.00010	0.480	0.0000480
FeSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.02780	0.221	0.0061438
Na ₂ EDTA	gr	0.03730	1.074	0.0400602
Ácido nicotínico	gr	0.00100	0.541	0.0005410
Piridoxina HCl	gr	0.00050	3.289	0.0016445
Tiamina HCl	gr	0.00050	2.017	0.0010085
Glicina	gr	0.00200	106.920	0.2138400
Myoinositol	gr	0.10000	1.052	0.1052000
Sacarosa	gr	30	0.040	1.2000000
Agar	gr	6.5	1.440	9.3600000
TOTAL				12.19290760

Anexo 7. Costos variables de un litro de Woody Plant Medium diluido (WPM^{1/2}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

COMPUESTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO (USD)	TOTAL (USD)
NH ₄ NO ₃	gr	0.20000	0.040	0.0080000
MgSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.18500	0.380	0.0703000
MnSO ₄ .4H ₂ O	gr	0.01115	0.290	0.0032335
ZnSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.00430	0.308	0.0013244
K ₂ SO ₄	gr	0.49500	0.540	0.2673000
CuSO ₄ .5H ₂ O	gr	0.00005	0.080	0.0000040
CaCl ₂ .H ₂ O	gr	0.04800	0.293	0.0140640
Ca(NO ₃) ₂	gr	0.27800	0.910	0.2529800
KH ₂ PO ₄	gr	0.08500	0.170	0.0144500
H ₃ BO ₃	gr	0.00310	0.179	0.0005549
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	gr	0.00005	0.480	0.0000240
FeSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.01390	0.221	0.0030719
Na ₂ EDTA	gr	0.01865	1.074	0.0200301
Ácido nicotínico	gr	0.00100	0.541	0.0005410
Piridoxina HCl	gr	0.00050	3.289	0.0016445
Tiamina HCl	gr	0.00050	2.017	0.0010085
Glicina	gr	0.00200	106.920	0.2138400
Myoinositol	gr	0.10000	1.052	0.1052000
Sacarosa	gr	45	0.040	1.8000000
Agar	gr	6.5	1.440	9.3600000
TOTAL				12.1375708

Anexo 8. Costos variables de un litro de Murashige & Skoog diluido (MS^{1/4}) en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

COMPUESTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO (USD)	TOTAL (USD)
NH ₄ NO ₃	gr	0.20625000	0.040	0.02000000
KNO ₃	gr	0.23750000	0.004	0.00095000
MgSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.04625000	0.380	0.01757500
MnSO ₄ .4H ₂ O	gr	0.00275000	0.290	0.00079750
ZnSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.00100000	0.308	0.00030800
CuSO ₄ .5H ₂ O	gr	0.00000650	0.080	0.00000052
CaCl ₂ .H ₂ O	gr	0.05500000	0.293	0.01611500
KI	gr	0.00020750	0.540	0.00011205
CoCl ₂ .6H ₂ O	gr	0.00000650	0.910	0.00000592
KH ₂ PO ₄	gr	0.02125000	0.170	0.00361250
H ₃ BO ₃	gr	0.00075000	0.179	0.00013425
NaMoO ₄ .2H ₂ O	gr	0.00000650	0.480	0.00000312
FeSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.00350000	0.221	0.00077350
Na ₂ EDTA	gr	0.00475000	1.074	0.00510150
Ácido nicotínico	gr	0.00050000	0.541	0.00027050
Piridoxina HCl	gr	0.00050000	3.289	0.00164450
Tiamina HCl	gr	0.00050000	2.017	0.00100850
Glicina	gr	0.00100000	106.920	0.10692000
Myoinositol	gr	0.05000000	1.052	0.05260000
Sacarosa	gr	45	0.040	1.80000000
Agar	gr	6.5	1.440	9.36000000
TOTAL				11.38793236

Anexo 9. Depreciación anual de equipos utilizados en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

EQUIPOS	CANTIDAD	VALOR INICIAL (USD)	VALOR RESIDUAL (10 %)	VIDA ÚTIL (años)	DEPRECIACIÓN TOTAL (USD)
Agitador magnético	1	175	17.5	10	15.75
Autoclave	1	1220	122.0	20	54.90
Balanza de analítica	1	570	57.0	10	51.30
Cámara de flujo laminar	1	7000	700.0	20	315.00
Destilador de agua	1	1400	140.0	20	63.00
Mechero	1	43	4.3	5	7.74
Microondas	1	100	10.0	5	18.00
Micropipetas	1	150	15.0	5	27.00
Potenciómetro	1	110	11.0	10	9.90
Refrigeradora	1	600	60.0	20	27.00
SUBTOTAL					589.59

Anexo 10. Datos de días a la brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

		DÍAS A LA BROTACIÓN (días)							
		OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	VI	ΣTRATAMIENTOS	\bar{x}
1	m1b0	8.0	9.0	8.0	9.0	8.0	10.0	52.0	8.67
2	m1b1	9.0	10.0	10.0	10.0	10.0	9.0	58.0	9.67
3	m1b2	12.0	9.0	10.0	14.0	10.0	10.0	65.0	10.83
4	m1b3	8.0	9.0	9.0	13.0	8.0	10.0	57.00	9.50
5	m2b0	14.0	8.0	8.0	14.0	8.0	10.0	62.00	10.33
6	m2b1	8.0	13.0	11.0	11.0	8.0	8.0	59.00	9.83
7	m2b2	8.0	6.0	7.0	9.0	8.0	8.0	46.00	7.67
8	m2b3	9.0	10.0	9.0	10.0	9.0	9.0	56.00	9.33
		ΣOBSERVACIONES						455.00	75.83
		PROMEDIO TOTAL						9.48 días	

Anexo 11. Datos reales del número de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

		NÚMERO DE BROTES/EXPLANTE					
		OBSERVACIONES					
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	VI
1	m1b0	1	1	1	1	1	1
2	m1b1	1	1	1	1	2	2
3	m1b2	1	1	2	1	1	2
4	m1b3	1	1	2	1	1	1
5	m2b0	1	1	2	1	1	1
6	m2b1	1	1	1	1	2	2
7	m2b2	2	2	2	2	1	1
8	m2b3	1	2	2	1	1	1

Anexo 12. Datos transformados del número de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

		NÚMERO DE BROTES/EXPLANTE TRANSFORMADOS \sqrt{x}						Σ TRATAMIENTOS	\bar{x}
		OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	VI		
1	m1b0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	6.00	1.00
2	m1b1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.41	1.41	6.83	1.14
3	m1b2	1.00	1.00	1.41	1.00	1.00	1.41	6.83	1.14
4	m1b3	1.00	1.00	1.41	1.00	1.00	1.00	6.41	1.07
5	m2b0	1.00	1.00	1.41	1.00	1.00	1.00	6.41	1.07
6	m2b1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.41	1.41	6.83	1.14
7	m2b2	1.41	1.41	1.41	1.41	1.00	1.00	7.66	1.28
8	m2b3	1.00	1.41	1.41	1.00	1.00	1.00	6.83	1.14
		Σ OBSERVACIONES						53.80	8.97
		PROMEDIO TOTAL						1.12 brotes/explante	

Anexo 13. Datos de longitud de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

TRATAMIENTOS		LONGITUD DE BROTES/EXPLANTE (cm)					
		OBSERVACIONES					
		I	II	III	IV	V	VI
1	m1b0	1.00	1.00	1.10	1.00	1.00	1.00
2	m1b1	2.00	1.60	2.10	1.80	1.5;1.6	2.4;1.6
3	m1b2	2.00	2.00	1.50;1.50	1.50	1.20	2.0;1.6
4	m1b3	1.50	2.00	1.6;1.6	2.00	1.50	1.90
5	m2b0	1.80	1.30	1.70;0.90	1.30	1.60	1.40
6	m2b1	1.30	1.30	1.40	1.60	1.40;1.20	1.60;1.00
7	m2b2	2.90;2.70	2.60;2.40	2.50	2.00	2.00;2.00	2.60;2.40
8	m2b3	2.50	2.00;1.20	1.60;2.00	1.80	1.60	2.80

Anexo 14. Promedio de longitud de brotes por explante en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

TRATAMIENTOS		LONGITUD DE BROTES/EXPLANTE (cm)						Σ TRATAMIENTOS	\bar{x}
		OBSERVACIONES							
		I	II	III	IV	V	VI		
1	m1b0	1.00	1.00	1.10	1.00	1.00	1.00	6.10	1.02
2	m1b1	2.00	1.60	2.10	1.80	1.55	2.00	11.05	1.84
3	m1b2	2.00	2.00	1.50	1.50	1.20	1.80	10.00	1.67
4	m1b3	1.50	2.00	1.60	2.00	1.50	1.90	10.50	1.75
5	m2b0	1.80	1.30	1.30	1.30	1.60	1.40	8.70	1.45
6	m2b1	1.30	1.30	1.40	1.60	1.30	1.30	8.20	1.37
7	m2b2	2.80	2.50	2.50	2.00	2.00	2.50	14.30	2.38
8	m2b3	2.50	1.60	1.80	1.80	1.60	2.80	12.10	2.02
		Σ OBSERVACIONES						80.95	13.49
		PROMEDIO TOTAL						1.69 longitud/explante	

Anexo 15. Promedio de días al enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

		DÍAS AL ENRAIZAMIENTO (días)						Σ TRATAMIENTOS	\bar{x}
		OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	VI		
1	m1b0	26	25	26	30	27	26	160.00	26.67
2	m1b1	20	20	21	20	28	28	137.00	22.83
3	m1b2	21	23	24	27	30	27	152.00	25.33
4	m1b3	22	25	22	28	28	27	152.00	25.33
5	m2b0	18	20	23	23	21	21	126.00	21.00
6	m2b1	14	11	13	22	22	20	102.00	17.00
7	m2b2	18	19	19	20	19	20	115.00	19.17
8	m2b3	33	40	34	33	35	40	215.00	35.83
		Σ OBSERVACIONES						1159.00	193.17
		PROMEDIO TOTAL						24.15 días	

Anexo 16. Datos reales del número de raíces por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

		NÚMERO DE RAÍCES/PLANTA					
		OBSERVACIONES					
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	VI
1	m1b0	1	1	1	1	1	1
2	m1b1	4	2	1	2	1	2
3	m1b2	1	1	1	1	1	2
4	m1b3	1	1	1	1	1	1
5	m2b0	2	1	1	2	1	1
6	m2b1	4	2	4	2	2	3
7	m2b2	1	1	1	2	1	1
8	m2b3	1	1	1	1	1	1

Anexo 17. Datos transformados del número de raíces por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

		NÚMERO DE RAÍCES/PLANTA TRANSFORMADOS \sqrt{X}							
		OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	VI	Σ TRATAMIENTOS	\bar{x}
1	m1b0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	6.00	1.00
2	m1b1	2.00	1.41	1.00	1.41	1.00	1.41	8.24	1.37
3	m1b2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.41	6.41	1.07
4	m1b3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	6.00	1.00
5	m2b0	1.41	1.00	1.00	1.41	1.00	1.00	6.83	1.14
6	m2b1	2.00	1.41	2.00	1.41	1.41	1.73	9.97	1.66
7	m2b2	1.00	1.00	1.00	1.41	1.00	1.00	6.41	1.07
8	m2b3	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	6.00	1.00
		Σ OBSERVACIONES						55.87	9.31
		PROMEDIO TOTAL						1.16 raíces/planta	

Anexo 18. Datos de longitud de la raíz por planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

		LONGITUD DE LA RAÍZ/PLANTA (cm)							
		OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	VI	Σ TRATAMIENTOS	\bar{x}
1	m1b0	1.10	1.10	1.30	1.30	1.30	1.20	7.30	1.22
2	m1b1	1.60	1.30	1.40	1.00	1.30	2.50	9.10	1.52
3	m1b2	2.20	2.00	2.30	2.30	2.10	2.30	13.20	2.20
4	m1b3	2.60	2.80	2.30	2.50	2.80	2.50	15.50	2.58
5	m2b0	4.00	3.50	3.50	3.50	3.50	3.00	21.00	3.50
6	m2b1	7.60	8.50	9.60	7.50	9.50	8.50	51.20	8.53
7	m2b2	6.40	6.50	6.60	6.00	7.20	6.10	38.80	6.47
8	m2b3	4.60	4.00	3.50	3.50	3.90	2.40	21.90	3.65
		Σ OBSERVACIONES						178.00	29.67
		PROMEDIO TOTAL						3.71 cm/raíz	

Anexo 19. Datos de longitud de la planta en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.

		LONGITUD DE LA PLANTA (cm)							
		OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS		I	II	III	IV	V	VI	∑TRATAMIENTOS	\bar{x}
1	m1b0	2.50	2.60	2.30	2.50	2.40	2.40	14.70	2.45
2	m1b1	3.50	3.10	3.20	3.40	2.80	2.90	18.90	3.15
3	m1b2	3.30	2.00	2.10	2.60	2.10	3.30	15.40	2.57
4	m1b3	2.90	3.20	3.00	2.80	2.90	3.00	17.80	2.97
5	m2b0	3.40	3.50	4.00	3.00	2.60	2.60	19.10	3.18
6	m2b1	4.60	4.50	4.80	4.60	4.20	5.00	27.70	4.62
7	m2b2	3.70	3.20	2.50	3.20	3.70	2.70	19.00	3.17
8	m2b3	2.70	2.60	2.40	2.80	2.70	2.40	15.60	2.60
		∑OBSERVACIONES						148.20	24.70
		PROMEDIO TOTAL						3.09 cm/planta	

Anexo 20. Protocolo de Lavado y Desinfección de Cápsulas de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don) para la introducción al cultivo *in vitro*.

Lavado. Fuera de Cámara de Flujo Laminar

1. De acuerdo a la cantidad de semillas que se vaya a cultivar *in vitro*, tomar la cantidad adecuada de cápsulas y colocar tres veces su volumen con agua destilada en un vaso de precipitación.
2. Añadir 5 g de detergente (3 cucharadas) y 3 gotas de tenso activo Tween 80 por cada 100 ml de solución al vaso de precipitación que contiene las semillas.
3. Colocar el vaso de precipitación que contiene las semillas con el detergente en el agitador orbital (agitación constante) durante 10 minutos.
4. Cumplido el tiempo de inmersión de las semillas en la solución con detergente, realizar cinco lavados sucesivos, los dos primeros con agua potable y los tres últimos con agua destilada.
5. Escurrir el agua del recipiente y finalmente llevar a las cápsulas a la cámara de flujo laminar para iniciar con el proceso de desinfección.

Desinfección. Dentro de cámara de flujo laminar

1. Colocar una solución de hipoclorito de sodio hasta cubrir todas las cápsulas, 33.33 ml hipoclorito de sodio por cada 100 ml de agua destilada esterilizada
2. Mantener en constante agitación por 10 minutos.
3. Escurrir el hipoclorito de sodio
4. Realizar cinco lavados de 1 minuto cada uno, con agua destilada esterilizada.
5. Depositar en una servilleta esterilizada la cápsula y rociar con alcohol al 96% y flamear

Tratamiento pregerminativo de la semilla

1. Abrir la cápsula con la ayuda de las pinzas y el bisturí extraer las semillas.
2. Colocarlas las semillas en un recipiente y colocar peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30 % pura hasta cubrir todas las semillas.
3. Mantener en constante agitación por 60 minutos.
4. Escurrir el peróxido de hidrógeno y realizar un enjuague con agua destilada para eliminar los residuos del compuesto.
5. Depositar las semillas a ser sembradas (máximo 8 semillas), manteniendo las condiciones de asepsia, para luego iniciar la siembra del cultivo *in vitro*.

Fuente: La investigación.

Autor: Isabel Loya, 2014.

Anexo 21. Árboles patrimoniales de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don).



Yalomán, Guápulo (Quito)



Parque Vicente León (Latacunga)

Fuente: La investigación.

Autor: Isabel Loya, 2014.

Anexo 22. Zona de recolección y árboles seleccionados de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don) para recolección de cápsulas.



Parque Ecológico “Cachaco”



Árboles seleccionados para recolección

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Anexo 23. Fotografías de recolección, lavado, desinfección, tratamiento pregerminativo y siembra de semillas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.



Recolección de cápsulas



Cápsulas recolectadas



Clasificación de frutos



Lavado de cápsulas



Cápsulas para lavado dentro de cámara



Desinfección con NaClO



Enjuague de semillas



Flameado de cápsulas



Abertura de cápsulas



Semillas con peróxido de hidrógeno



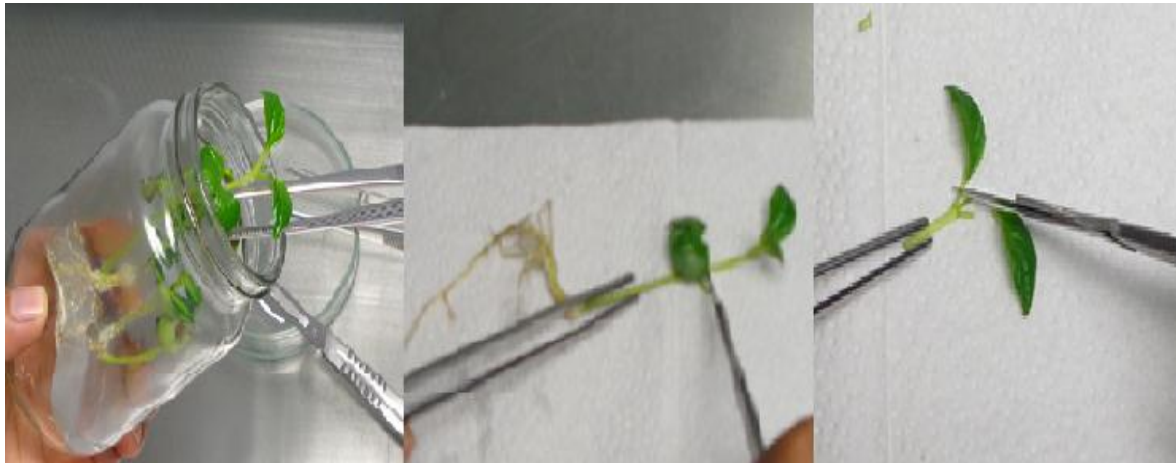
Siembra



Semillas sembradas en WPM

Fuente: La investigación.
Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Anexo 24. Fotografías de repique de explantes para la Fase I. Brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.



Extracción de explantes

Eliminación de la radícula

Corte del explante (epicótilo)



Repique de explante en medio de cultivo

Explante en medio de cultivo



Flameado del frasco

Sellado del frasco

Tratamientos de brotación

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

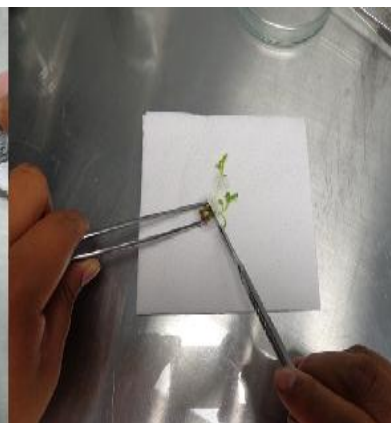
Anexo 25. Fotografías de repique de explantes para la Fase II. Enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.



Explante con brotes



Extracción del explante



Selección de los brotes



Corte de los brotes



Brote para repique



Repique de los brotes



Flameado del frasco



Sellado del frasco



Tratamiento de enraizamiento

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.

Anexo 26. Fotografías de plantas aclimatadas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Yalomán (*Delostoma integrifolium* D. Don). Quito, Pichincha. 2014.



Extracción de planta enraizada

Lavado de raíz

Trasplante a sustrato



Plantas en aclimatación en fundas



Plantas en aclimatación en tarrinas



Plantas producto de la micropropagación

Fuente: La investigación.

Elaborado por: Isabel Loya, 2014.