



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO ÓPTIMO PARA
LA INTRODUCCIÓN EN CULTIVO IN VITRO DE LAS
ESPECIES ENDÉMICAS: *Phaedranassa schizantha* y
Phaedranassa tunguraguae, EN PELIGRO DE EXTINCIÓN”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:
INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORES: PAOLA JAKELINE SOTO PÁRAMO
PAÚL ROLANDO YUQUILEMA YUPANGUI
TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA T., M.Sc.

RIOBAMBA - ECUADOR

2017

@2017, Paola Jakeline Soto Páramo, Paúl Rolando Yuquilema Yupangui

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO ÓPTIMO PARA LA INTRODUCCIÓN EN CULTIVO IN VITRO DE LAS ESPECIES ENDÉMICAS: *Phaedranassa schizantha* y *Phaedranassa tunguraguae*, EN PELIGRO DE EXTINCIÓN”** de responsabilidad de los señores egresados: Paola Jakeline Soto Páramo y Paúl Rolando Yuquilema Yupangui, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Vinueza T., M Sc.

**DIRECTOR DEL
TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Dra. Susana Abdo L., M.Sc.

**MIEMBRO DEL
TRIBUNAL**

Nosotros, Paola Jakeline Soto Páramo y Paúl Rolando Yuquilema Yupangui, declaramos que el presente trabajo de titulación es de nuestra autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autores, asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 08 de junio de 2017

Paola Jakeline Soto Páramo
C.I. 060518309-4

Paúl Rolando Yuquilema Yupangui
C.I. 060386729-2

Nosotros, Paola Jakeline Soto Páramo y Paúl Rolando Yuquilema Yupangui, somos responsables de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de investigación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Paola Jakeline Soto Páramo
C.I. 060518309-4

Paúl Rolando Yuquilema Yupangui
C.I. 060386729-2

DEDICATORIA

A mi madre por ser ese pilar fundamental en mí, por enseñarme el mundo real, a defender mis ideales, por su apoyo y amor incondicional, por formarme como persona con cada consejo en el momento exacto de necesidad. A mis hermanas Ximena y Patricia por su ayuda, por su confianza por ser mi fortaleza.

Paola

Dedico esta investigación a mi padre y mi madre, porque han sido quienes me han acompañado fielmente durante todo este proceso con su ayuda constante. A mi hermano y hermana, puesto que gracias a ellos he sabido forjarme académicamente y son mi fortaleza en este caminar. A mis amigos que gracias al equipo que formamos, hemos logrado llegar hasta este punto del camino de la vida, y es que sin ellos no pudiéramos estar aquí.

Paúl

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi madre por haberme guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad, por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad. A mis hermanos, por apoyarme en todo momento, por los valores que me ha inculcado, y por haberme dado junto a mi madre, la oportunidad de tener una excelente educación. Les agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mis profesores. A mis amigos por todos los momentos compartidos y experiencias vividas.

Paola

Agradezco infinitamente a mi padre, mi madre y mis hermanos que me han dado la fuerza, la sabiduría y la fe de creer en mí mismo. A mis maestros quienes han forjado pilares sólidos en el inicio de nuestra vida de universidad, especialmente, al BQF. Diego Vinueza T., M.Sc., y a la Ing. Jhenny Nuñez, M.Sc., quienes nos han colaborado con su experiencia y sabiduría en nuestra investigación, y; que sin ellos no pudiéramos alcanzar este escalón. A mi compañera y amiga de mi investigación por toda su paciencia, compromiso, entrega y tiempo para lograr los objetivos planteados.

Paúl

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1 MARCO TEÓRICO	4
1.1 Extinción de especies.....	4
<i>1.1.1 Causas y consecuencias</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2 El ser humano como agente causante de la extinción.....</i>	<i>5</i>
1.2 Categorías y criterios de la UICN.....	5
<i>1.2.1 Familia Amaryllidaceae</i>	<i>6</i>
<i>1.2.1.1 Phaedranassa schizantha.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.1.2 Phaedranassa tunguraguae</i>	<i>8</i>
1.3 Cultivo <i>in vitro</i> o micropropagación.....	10
<i>1.3.1 Propagación vegetativa natural.....</i>	<i>10</i>
<i>1.3.2 Twin-scale.....</i>	<i>10</i>
<i>1.3.3 Morfogénesis</i>	<i>11</i>
<i>1.3.3.1 Totipotencia de las células vegetales.....</i>	<i>12</i>
<i>1.3.3.2 Tipos de morfogénesis.....</i>	<i>12</i>
1.4 Reguladores de crecimiento	13
<i>1.4.1 Auxina</i>	<i>14</i>
<i>1.4.1.1 La auxina en la planta.....</i>	<i>15</i>
<i>1.4.1.2 Efectos fisiológicos de las auxinas.....</i>	<i>15</i>
<i>1.4.2 Citoquinina.....</i>	<i>16</i>
<i>1.4.2.1 Efectos fisiológicos.....</i>	<i>17</i>
1.5 Etapas de la micropropagación.....	17
<i>1.5.1 Etapa 0: Banco clonal.....</i>	<i>18</i>
<i>1.5.2 Etapa 1: Establecimiento del cultivo</i>	<i>18</i>
<i>1.5.3 Etapa 2: Multiplicación</i>	<i>19</i>
<i>1.5.4 Etapa 3: Enraizamiento</i>	<i>20</i>
<i>1.5.5 Etapa 4: Aclimatación.....</i>	<i>21</i>
1.6 Factores que influyen en la micropropagación.....	22
<i>1.6.1 El explante.....</i>	<i>22</i>
<i>1.6.2 Planta donadora</i>	<i>22</i>
<i>1.6.3 Composición de los medios de cultivo</i>	<i>22</i>
CAPÍTULO II	
2 METODOLOGÍA	23
2.1 Ubicación geográfica.....	23

2.1.1 Sitios de muestreo	23
2.1.2 Muestreo	25
2.2 Descripción de las especies evaluadas	26
2.3 En el laboratorio	26
2.3.1 Materiales, equipos y reactivos	27
2.3.1.1 Materiales	27
2.3.1.2 Equipos.....	27
2.3.1.3 Reactivos	27
2.3.2 Ensayo I: <i>Phaedranassa schizantha</i>	27
2.3.2.1 Preparación medio de cultivo	27
2.3.2.2 Desinfección.....	30
2.3.2.3 Siembra	32
2.3.3 Ensayo II: <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	33
2.3.3.1 Preparación del medio	33
2.3.3.2 Desinfección.....	36
2.3.3.3 Siembra	37
2.4 Evaluación de la respuesta de los explantes	38
2.5 Análisis estadístico	38
CAPÍTULO III	
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1 Resultados	39
3.1.1 Localización de las especies <i>P. schizantha</i> y <i>P.tunguraguae</i>	39
3.1.2 Ensayo I: <i>Phaedranassa schizantha</i>	40
3.1.2.1 Explantes que respondieron a los tratamientos	42
3.1.2.2 Caracterización morfológica	43
3.1.3 Ensayo II: <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	45
3.1.3.1 Explantes que respondieron a los tratamientos	46
3.1.3.2 Caracterización morfológica	48
3.1.3 Análisis Estadístico	50
3.1.3.1 Ensayo I: <i>Phaedranassa schizantha</i>	50
3.1.3.2 Ensayo II: <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	54
3.2 Discusión	57
3.2.1 Desinfección del material vegetal	57
3.2.2 Número de explantes que respondieron	58
3.2.3 Caracterización morfológica	58
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Tratamientos utilizados en la investigación para <i>P. schizantha</i>	28
Tabla 2-2: Tratamientos utilizados en la investigación para <i>P. tunguraguae</i>	33
Tabla 1-3: Brote de los tratamientos a los 45 días de evaluación de <i>P. schizantha</i>	41
Tabla 2-3: Número de explantes contaminados en cada tratamiento a los 45 días de evaluación de <i>P. schizantha</i>	42
Tabla 3-3: Longitud de las hojas asépticas de los bulbillos a los 45 días de evaluación de <i>P. schizantha</i>	44
Tabla 4-3: Diámetro de los bulbillos asépticos producidos a los 45 días de evaluación de <i>P. schizantha</i>	45
Tabla 5-3: Brote de los tratamientos a los 45 días de evaluación de <i>P. tunguraguae</i>	46
Tabla 6-3: Número de explantes contaminados en cada tratamiento a los 45 días de evaluación de <i>P. tunguraguae</i>	47
Tabla 7-3: Longitud de las hojas asépticas de los bulbillos a los 45 días de evaluación de <i>P. tunguraguae</i>	49
Tabla 8-3: Diámetro de los bulbillos asépticos producidos a los 45 días de evaluación de <i>P. tunguraguae</i>	50
Tabla 9-3: Prueba de Bartlett y medida de adecuación muestral de KMO (<i>P. schizantha</i>)....	51
Tabla 10-3: Varianza total explicada (<i>P. schizantha</i>).....	51
Tabla 11-3: Comunalidades (<i>P. schizantha</i>).....	52
Tabla 12-3: Matriz de componentes rotados (<i>P. schizantha</i>).....	52
Tabla 13-3: Pruebas de los efectos inter-sujetos (<i>P. schizantha</i>).....	53
Tabla 14-3: Prueba de Bartlett y medida de adecuación muestral de KMO (<i>P. tunguraguae</i>).....	55
Tabla 15-3: Varianza total explicada (<i>P. tunguraguae</i>).....	55
Tabla 16-3: Comunalidades (<i>P. tunguraguae</i>).....	55
Tabla 17-3: Matriz de componentes (<i>P. tunguraguae</i>).....	56
Tabla 18-3: Pruebas de los efectos inter-sujetos (<i>P. tunguraguae</i>).....	56

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Ubicación de las poblaciones de la especie <i>P. schizantha</i>	39
Gráfico 2-3: Ubicación de las poblaciones de la especie <i>P. tunguraguae</i>	40
Gráfico 3-3: Respuesta de brotes de <i>P. schizantha</i>	54
Gráfico 4-3: Respuesta de brotes <i>P. tunguraguae</i>	65

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-1. <i>Phaedranassa schizantha</i>	7
Fotografía 2-1. <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	8
Fotografía 1-2. Colección muestra vegetal <i>P. schizantha</i>	25
Fotografía 2-2. Colección muestra vegetal <i>P. tunguraguae</i>	26
Fotografía 3-2. Disolución de MS y sacarosa.....	29
Fotografía 4-2. Tratamientos <i>P. schizantha</i>	29
Fotografía 5-2. Medio preparado en estado de ebullición.....	30
Fotografía 6-2. Distribución de medio en cada unidad experimental.....	30
Fotografía 7-2. Cortes para la obtención de bulbo de <i>P. schizantha</i>	31
Fotografía 8-2. Bulbos sumergidos en solución de Benomyl®.....	31
Fotografía 9-2. Enjuague material vegetal (bulbo <i>P. schizantha</i>).....	32
Fotografía 10-2. Obtención de explantes mediante la técnica twin-scale (<i>P. schizantha</i>).....	32
Fotografía 11-2. Tamaño aproximado del explante.....	33
Fotografía 12-2. Tratamientos <i>P. tunguraguae</i>	34
Fotografía 13-2. Aforado de BAP y ANA.....	35
Fotografía 14-2. Corrección del pH.....	35
Fotografía 15-2. Sellado de cada unidad experimental.....	36
Fotografía 16-2. Cortes para la obtención de bulbo de <i>P. tunguraguae</i>	36
Fotografía 17-2. Bulbos sumergidos en soluciones de Benomyl®, etanol y cloro.....	37
Fotografía 18-2. Enjuague material vegetal (bulbo <i>P. tunguraguae</i>).....	37
Fotografía 19-2. Obtención de explantes mediante la técnica twin-scale (<i>P. tunguraguae</i>)...	38
Fotografía 1-3. a) Contaminación fúngica. b) Contaminación bacteriana (<i>P. schizantha</i>)...	42
Fotografía 2-3. Tratamiento 3 repetición 10 a los 45 días de cultivo (<i>P. schizantha</i>).....	43
Fotografía 3-3. Tratamiento 0 repetición 15 a los 45 días de cultivo (<i>P. schizantha</i>).....	43
Fotografía 4-3. Tratamiento 0 repetición 6 a los 45 días de cultivo (<i>P. schizantha</i>).....	44
Fotografía 5-3. Tratamiento 2 repetición 13 a los 45 días de cultivo (<i>P. schizantha</i>).....	44
Fotografía 6-3. Tratamiento 0 repetición 1 a los 45 días de cultivo (<i>P. tunguraguae</i>).....	46
Fotografía 7-3. Tratamiento 2 repetición 3 a los 10 días de cultivo (<i>P. tunguraguae</i>).....	47
Fotografía 8-3. a) Tratamiento 0 repetición 5. b) Tratamiento 0 repetición (<i>P. tunguraguae</i>)...	48
Fotografía 9-3. Tratamiento 3 repetición 9 a los 45 días de cultivo (<i>P. tunguraguae</i>).....	48
Fotografía 10-3. Tratamiento 3 repetición 9 con tres hojas a los 45 días (<i>P. tunguraguae</i>)...	49
Fotografía 11-3. Tratamiento 2 repetición 10 con diámetro de 0,5 (<i>P. tunguraguae</i>).....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Ubicación <i>Phaedranassa schizantha</i>	8
Figura 2-1. Ubicación <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	9
Figura 3-1. Técnica twin-scale.....	11
Figura 4-1. Tipos de morfogénesis.....	13
Figura 5-1. Ácido indol B-acético.....	14
Figura 6-1. Diagrama de las etapas del cultivo <i>in vitro</i>	18
Figura 1-2. Localización de la especie vegetal <i>P. schizantha</i>	24
Figura 2-2. Localización de la especie vegetal <i>P. tunguraguae</i>	24

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: UBICACIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

Gráfico 1A: Ubicación de la especie vegetal <i>Phaedranassa schizantha</i>	65
Gráfico 2A Ubicación de la especie vegetal <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	66

ANEXO B: PROCEDIMIENTO GENERAL

Fotografía 1B: Hábitat de la especie <i>P. schizantha</i>	67
Fotografía 2B: <i>Phaedranassa schizantha</i>	67
Fotografía 3B: <i>Phaedranassa tunguraguae</i>	67
Fotografía 4B: Hábitat de la especie <i>P. tunguraguae</i>	67
Fotografía 5B: Toma de la muestra.....	67
Fotografía 6B: Lavado de la muestra vegetal a utilizarse (<i>P. schizantha</i> y <i>P. tunguraguae</i>)....	67
Fotografía 7B: BAP Y ANA MARCA LOBACHEMIE	68
Fotografía 8B: Fungicida - Benomyl® 50 PM (g/kg).....	68
Fotografía 9B: Medio Murashige & Skoog y Sacarosa MARCA PHYTOTECH.....	68
Fotografía 10B: Tween® 20 MARCA LOBACHEMIE.....	68
Fotografía 11B: Área de pesaje para preparación de medios de cultivo.....	68
Fotografía 12B: Corte del bulbo previa desinfección.....	68
Fotografía 13B: Cortes de explantes mediante la técnica twin-scale.....	69
Fotografía 14B: Unidades experimentales sembradas.....	69
Fotografía 15B: Unidades experimentales en el cuarto de incubación (<i>P. schizantha</i>).....	69
Fotografía 16B: Unidades experimentales en el cuarto de incubación (<i>P. tunguraguae</i>).....	69
Fotografía 17B: Tratamiento 0 repetición a los 30 días de siembra de <i>P. tunguraguae</i>	69
Fotografía 18B: Tratamiento 3 repetición 5 a los 45 días de siembra de <i>P. tunguraguae</i>	69
Fotografía 19B: Tratamiento dos con bulbillo y hojas brotadas de <i>P. tunguraguae</i>	70
Fotografía 20B: Tratamiento 1 con hoja formada de <i>P. tunguraguae</i>	70
Fotografía 21B: Tratamiento 0 repetición a los 45 días de siembra de <i>P. schizantha</i>	70
Fotografía 22B: Tratamiento 1 repetición a los 45 días de siembra de <i>P. schizantha</i>	70
Fotografía 23B: Bulbillo y hojas brotadas en el Tratamiento 2 de la especie <i>P. schizantha</i>	70
Fotografía 24B: Hoja con mayor longitud en el Tratamiento 3 de la especies <i>P. schizantha</i> ...	70
Fotografía 25B: Siembras a los 45 días de siembra de <i>P. schizantha</i> y <i>P. tunguraguae</i>	71
Fotografía 26B: Bulbillos brotados.....	71
Fotografía 27B: Siembras contaminadas.....	71

Fotografía 28B: Invasión de contaminación en el explante.....	71
--	----

ANEXO C: PERMISOS OTORGADOS POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE

Gráfico 1C: Permiso de investigación otorgado por el MAE para la especie <i>P. schizantha</i> ...	72
--	----

Gráfico 2C: Permiso de investigación otorgado por el MAE para la especie <i>P. tunguraguae</i>	73
---	----

Gráfico 3C: Acta de movilización de la especie <i>P. tunguraguae</i>	74
---	----

ANEXO D: CÁLCULOS DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	75
---	----

ANEXO E: “PROTOCOLO ÓPTIMO PARA LA INTRODUCCIÓN EN CULTIVO IN VITRO DE LAS ESPECIES ENDÉMICAS: <i>Phaedranassa schizantha</i> y <i>Phaedranassa tunguraguae</i>, EN PELIGRO DE EXTINCIÓN”.....	76
---	----

RESUMEN

Se estableció un protocolo óptimo para introducción en cultivo *in vitro* de las especies endémicas en peligro de extinción: *Phaedranassa schizantha* y *Phaedranassa tunguraguae*, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal - Facultad de Recursos Naturales-ESPOCH. Se realizó una revisión bibliográfica de estudios realizados sobre la Familia Amaryllidaceae. Se procedió a la localización y toma de muestras vegetales en las ciudades de Riobamba (*P. schizantha*) y Baños (*P. tunguraguae*). Posteriormente, la desinfección del material vegetal partió con un enjuague con agua de grifo, seguido del corte de: tallos, hojas y raíces. Los bulbos obtenidos fueron sumergidos en diversas soluciones para garantizar una desinfección adecuada, en el siguiente orden: jabón líquido (10%), etanol (70%), Benomyl® (10%), NaClO (3%) y Tween® 20. El medio basal (MB) constituido de Medio Murashige&Skoog (4,32 g/L), Sacarosa (30 g/L), Agar (10 g/L) y ajustado a pH 5,6. Se utilizaron 4 tratamientos (T0, T1, T2, T3) con 15 repeticiones (*P. schizantha*) y 10 repeticiones (*P. tunguraguae*), respectivamente. El tratamiento control (T0) constituido por MB; T1: MB + BAP 0,5 ppm + ANA 0,1 ppm; T2: MB + BAP 1 ppm + ANA 0,1 ppm; y T3: MB + BAP 1,5 ppm + ANA 0,1 ppm. En cabina de flujo laminar y técnica de twin-scale fueron obtenidos los explantes, que fueron sembrados e incubados durante 45 días, 16/8 horas de fotoperiodo, temperatura (25°C±1) y humedad (70%±1). Mediante evaluación cualitativa se observó que el T3 presentaba mejor respuesta en longitud y tamaño de hojas, así como en número y diámetro de bulbillos. A través del Método de Diseño de Componentes Principales, se determinó que el T3 (BAP 1,5 ppm + ANA 0,1 ppm) constituye el procedimiento óptimo para la introducción en cultivo *in vitro*, para ambas especies. Se recomienda al momento de realizar los cortes de los explantes y la siembra de los mismos, tener las suficientes medidas de asepsia, con el fin de prevenir las contaminaciones de hongos y/o bacterias y obtener cultivos axénicos.

PALABRAS CLAVE: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROPROPAGACIÓN>, <FALSA CEBOLLA (*Phaedranassa schizantha*)>, <FALSA CEBOLLA (*Phaedranassa tunguraguae*)>, < BENCILAMINOPURINA (BAP) >, <ÁCIDONAFTALENACÉTICO (ANA)>, <TWIN SCALE (TÉCNICA)>, <EXPLANTE>.

ABSTRACT

It was established optimal protocol for the *in vitro* cultivation of endemic species in danger of extinction: *Phaedranassa schizantha* and *Phaedranassa tunguraguae*, at the vegetal Biotechnology Laboratory-Natural Resources Faculty-ESPOCH. A literature review of studies was conducted about the Amaryllidaceae Family. Planting and sampling were carried out in the cities of Riobamba (*P. schizantha*) and Baños (*P. tunguraguae*). Later, the disinfection of the vegetal material departed with a rinse with tap water, followed buy the cut of: steams, leaves and roots. The resulting bulbs were immersed in various solutions in order to ensure adequate disinfection in the following order: liquid soap (10%), ethanol (70%), Benomyl® (10%), NaClO (3%) and Tween® 20. The basal medium (MB) consisting of Murashigue & Skoog medium (4,32 g/L), Sacarosa (30 g/L), Agar (10 g/L) and adjusted to pH 5,6. Four treatments (T0, T1, T2, T3) were used with 15 repetitions (*P. schizantha*) and 10 repetitions (*P. tunguraguae*), respectively. The control treatment (T0) constituted by MB; T1: MB + BAP 0,5 ppm + ANA 0,1 ppm; T2: MB + BAP 1 ppm + ANA 0,1 ppm; y T3: MB + BAP 1,5 ppm + ANA 0,1 ppm. In the laminar flow cabin and the twin-scale technique, the explants were obtained which were harvested and incubated during 45 days, 16/8 hours of photoperiod, temperature (25°C±1) and humidity (70%±1). By means of a qualitative evaluation, it was observed that the T3 presented better response in length and size of leaves, as well as in number and diameter of bulbillos. Through the Principal Component Design Method, was determined that T3 (BAP 1,5 ppm + ANA 0,1 ppm) constitutes the optimal procedure for *in vitro* cultivation, for both species. It was recommended at the moment of cutting the explants and planting them, to have sufficient measures of asepsis, in order to prevent the contamination of fungus and/ or bacterium and obtain axenic cultivation.

KEY WORDS: <BIOTECHNOLOGY>, <MICROPROPAGATION>, <FALSE ONION (*Phaedranassa schizantha*)>, <FALSE ONION (*Phaedranassa tunguraguae*)>, <BENCYLAMINOPURIN (BAP) >, <ACIDONAFTALENACETICO (ANA)>, <TWIN SCALE (TECHNIQUE)>, <EXPLANT>.

INTRODUCCIÓN

Identificación del problema

Ecuador es catalogado como uno de los países más megadiversos, posee el mayor número de especies por unidad de área. La mayor parte de especies vegetales endémicas se encuentran localizadas en la zona de los Andes a 1500 y 3500 msnm. Debido a las actividades antropogénicas, los bosques andinos han sido considerablemente afectados; de aquí surge el interés de conocer el estado de conservación de dichas especies amenazadas y poder tomar medidas para evitar la extinción completa de las mismas. (Oleas, 2012).

Las especies *Phaedranassa schizantha* y *Phaedranassa tunguraguae*, pertenecen a la familia Amaryllidaceae, son endémicas de las Provincias de Chimborazo y Tungurahua, respectivamente. A causa de su distribución geográfica limitada y la pequeña cantidad de sus poblaciones, *P. schizantha* y *P. tunguraguae* se encuentran categorizadas “En Peligro de Extinción” según los criterios de la lista roja para especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

Estas especies habitan en áreas perturbadas como bordes de caminos, prados y acantilados; por lo que muchas de sus poblaciones se han visto afectadas por el desdoblamiento de carreteras, explotación comercial como plantas ornamentales, la destrucción de su hábitat por la agricultura y el pastoreo que se realiza alrededor de las áreas donde habitan, consecuentemente evitan el desarrollo de dichas especies. (Pacific Bulb Society, 2016).

La extinción de especies endémicas se debe principalmente a la sobre explotación de los recursos naturales, ocasionado pérdida de la biodiversidad, provocando cambios y alteraciones, es decir; la modificación de los hábitats, entendida como fragmentación de los bosques e introducción y propagación de especies exóticas invasoras fuera de su área de distribución habitual. Al ser desplazadas por actividades como el pastoreo y la agricultura, ocasionan un impacto ambiental negativo, especialmente la contaminación inducida por el abuso de los fertilizantes, que se traduce en un exceso de nutrientes en los suelos y el agua, alterando su calidad y convirtiéndose en una de las principales orígenes de los efectos del cambio climático; por los motivos expuestos resulta importante que se tomen medidas de conservación de especies en peligro de extinción y así,

renovar el entorno de bosques andinos que son fuente de vida y de preservación de precipitaciones. (Estrella, 2003, pp. 65-67).

El suelo en particular es un ecosistema muy frágil y el sobrepastoreo y los cultivos en los que no se aplican técnicas de conservación de especies endémicas vegetales, terminan degradadas rápidamente. (FAO, 2016).

Justificación de la investigación

Los investigadores de nuestro país, respaldándose en estudios tanto nacionales como internacionales sobre cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro*, están conscientes sobre la importancia de la conservación de especies endémicas. La comunidad científica del país debe involucrarse en el desarrollo de la técnica citada, dado el amplio beneficio para obtener plantas a nivel de laboratorio en una escala considerable.

El cultivo *in vitro* es una técnica que permite obtener plantas a nivel de laboratorio de una manera acelerada, en comparación al crecimiento *ex vitro* que resulta difícil para la mayoría de especies vegetales. La técnica *in vitro* contribuye a la solución de problemas como la preservación de especies vegetales, porque se propagan plantas en forma masiva, mejorando su calidad, sanidad y homogeneidad, debido a que el tejido se multiplica en un ambiente controlado, con todos los elementos necesarios que permiten un crecimiento óptimo en condiciones favorables, para que los nuevos individuos se desarrollen y formen una planta con todas las características de su progenitora y libres de enfermedades que afecten su desarrollo. Asimismo, su crecimiento libre de contaminantes que resulta importante en la disminución del impacto ambiental negativo respecto al suelo y otras especies.

La familia Amaryllidaceae a la que pertenecen las especies en estudio, presentan vital importancia a nivel farmacéutico, debido a su alto contenido de metabolitos secundarios, particularmente alcaloides con actividades terapéuticas; como la galantamina y licorina, mismos que presentan actividad anticancerígena y antipalúdica, además para tratar la enfermedad de Alzheimer, por ello pueden ser utilizados tanto para fines biomédicos, como ambientales.

En esta investigación se pretende establecer un protocolo óptimo para la introducción en cultivo *in vitro* de las especies endémicas: *Phaedranassa schizantha* y *Phaedranassa tunguraguae*, las cuales se registran en peligro de extinción, donde se identificará y recolectará los explantes de ambas especies, además; se tomarán en cuenta el tipo de desinfección, el medio apropiado para la inducción de brotes, la combinación apropiada de los macro y micronutrientes, y especialmente el uso de reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas, entre otros requerimientos que se necesiten para llevar a cabo la investigación.

Con esta investigación se contribuirá con una herramienta biotecnológica para la conservación y propagación de estas especies vegetales, incrementando el número de especies nativas para incluirlas en los programas de reforestación que llevan a cabo las diferentes entidades del país. Cumpliendo así con el Objetivo 7, literal 7.2, ítem a. del Plan Nacional del Buen Vivir que menciona “Fortalecer el Sistema Nacional de Áreas Protegidas, y otras formas de conservación basadas en la gestión integral y participativa, y la seguridad territorial de los paisajes terrestres, acuáticos y marinos, para que apoyen al mantenimiento de su estructura, funciones, ciclos naturales y evolutivos, asegurando el flujo y la provisión de servicios ambientales.” (SENPLADES, 2013).

La investigación ecuatoriana entorno al desarrollo de metodologías de cultivo *in vitro* de especies nativas de esta familia es escasa. No existen investigaciones sobre cultivo *in vitro* de las especies en estudio (*Phaedranassa schizantha* y *Phaedranassa tunguraguae*) desarrolladas por ningún investigador nacional o extranjero.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

- Establecer un protocolo óptimo para la introducción en cultivo *in vitro* de las especies endémicas: *Phaedranassa schizantha* y *Phaedranassa tunguraguae*, en peligro de extinción.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y recolectar muestras de las especies *Phaedranassa schizantha* y *Phaedranassa tunguraguae* de los sitios de muestreo.
- Identificar un protocolo eficiente de desinfección que permita obtener explantes libres de contaminantes microbianos exógenos.
- Evaluar la respuesta óptima de los explantes de las especies *Phaedranassa schizantha* y *Phaedranassa tunguraguae*, a diferentes concentraciones utilizando dos reguladores de crecimiento.

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Extinción de especies

1.1.1 Causas y consecuencias

La extinción de especies vegetales se verifica como consecuencia, cuando un área específica experimenta cambios o alteraciones ambientales radicales, frente a los cuales las especies vegetales nativas no tienen la capacidad de adaptarse. Entre las alteraciones ambientales tenemos:

- Calentamiento global.
- Alteración de precipitaciones.
- Generación de movimientos orogénicos.
- División del hábitat continuo en secciones.

- Aumento de individuos dominantes que se apoderan de la totalidad de los recursos, quedando excluidas las especies endémicas.
- Invasión de especies exóticas inducidas.

Dichas extinciones provocan que las especies exógenas e invasivas se adapten al medio ambiente, y aquellas que mejores condiciones y/o adaptación ecológica tengan, permanezcan; mientras las que no desarrollen las condiciones necesarias para sobrevivir, desaparecen. (Castellanos, 2006a).

1.1.2 El ser humano como agente causante de la extinción.

La extinción es un evento que afecta en gran porcentaje a muchos países tropicales, incluido el Ecuador. El principal causante de extinción, el ser humano, por su intervención no racional en los ecosistemas, generando una pérdida permanente de especies endémicas. Dado que a nivel nacional no se cuenta con un inventario completo de la biota, se desconocen el verdadero impacto y pérdida de individuos endémicos.

Entre las actividades antropogénicas que conllevan a la extinción se cuentan: el pastoreo, construcción de vías y caminos, degradación de las cuencas, la deforestación y pérdida de la diversidad biológica. Algunos de estos problemas representan la causa de la pérdida completa de una especie y resultan muy preocupantes alrededor del mundo, por ello; esto genera gran interés por el mejoramiento del medio ambiente y de una necesidad de proponer técnicas que mejoren la persistencia a largo plazo de dichas especies. (Castellanos, 2006b).

1.2 Categorías y criterios de la UICN

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), es la encargada de catalogar, monitorear y evaluar el estado de conservación de especies extrañas o en peligro en todo el mundo. La UICN para catalogar el estado de conservación de las especies (hongo, pájaro, ballena o árbol); califica su cantidad, su distribución geográfica, su mecánica y su historia; respetando una serie de criterios ya establecidos. De aquel establecimiento, se puede concluir el grado de conservación de las especies y si se encuentran o no en peligro de extinción. Luego, al asignar una categoría se indica el estado de conservación de la especie; hasta que exista información nueva que indique modificación. Una vez determinadas las categorías, se proponen estrategias para la protección de las especies que se encuentran en un grado alto de extinción. (Valencia et al, 2000a: p.5).

La clasificación según su categoría corresponde a: Extinto (**EX**), Extinto en la Naturaleza (**EW**), En Peligro Crítico (**CR**), En Peligro (**EN**), Vulnerable (**VU**), Casi Amenazada (**NT**), Preocupación Menor (**LC**), Datos Insuficientes (**DD**), No Evaluado (**NE**). (Valencia et al, 2000b: p.5-6).

1.2.1 Familia Amaryllidaceae

Hasta ahora se registran 4.011 especies de plantas endémicas en el Ecuador, lo cual representa aproximadamente un 26% de su flora nativa. El número no es exacto, sino más bien un corte a una cuenta siempre cambiante, producto de nuevas especies endémicas descritas para el país. El alto número de especies endémicas concentradas en la zona andina del Ecuador, corrobora la tradicional idea de la gran diversidad y endemismo de la zona. El endemismo de los andes ecuatorianos sobresale por los números de especies de distribución restringida; la mayoría de valles y crestas tienen sus propias especies endémicas. (Valencia et al, 2000c: p.15-16).

Las especies de la familia Amaryllidaceae generalmente son no epífitas, es decir; que no germinan en troncos y ramas de los árboles, por ello se las conoce como plantas herbáceas, terrestres, no trepadoras; que se caracterizan por presentar bulbo subterráneo, además, sus flores son hermafroditas y no poseen tallo aéreo verdadero. Algunas de estas especies se encuentran catalogadas en peligro de extinción según el Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador y la UICN, dentro de ellas se encuentran las especies en estudio de esta investigación: *Phaedranassa schizantha* y *Phaedranassa tungurahuae*, pertenecientes a la provincia de Chimborazo y Tungurahua, respectivamente.

La familia Amaryllidaceae ha ganado un gran interés debido a la presencia de metabolitos específicos que muestran diferentes propiedades biológicas. Además, comprende un gran grupo de plantas bulbosas, que incluyen 1000 especies en 60 géneros distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En particular, están muy extendidos en América del Sur. En Ecuador, son popularmente conocidos por sus hermosas flores y en gran medida se han utilizado en el pasado en la medicina tradicional de los pueblos indígenas de diferentes regiones. Como consecuencia y teniendo en cuenta sus principios activos, especialmente alcaloides, los investigadores han proporcionado una plataforma viable para el descubrimiento de fármacos basado en estos componentes fitoquímicos. A pesar de estos atributos medicinales interesantes, las plantas del género Amaryllidaceae son conocidas por ser venenosas y varias de ellas han sido clasificadas como tales. (Nair y Van Staden, 2013).

1.2.1.1 *Phaedranassa schizantha*



Fotografía 1-1. *Phaedranassa schizantha*

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Taxonomía

- Reino: Plantae
- Filo: Tracheophyta
- Clase: Liliopsida
- Orden: liliales
- Familia: Amaryllidaceae
- Nombre científico: *Phaedranassa schizantha* (IUCN, 2016a).

Es una especie ornamental endémica de Ecuador, existen muy pocos especímenes, debido a que habitan en áreas perturbadas, se localizan principalmente en la zona interandina del centro del país (Figura 1-1). El sobrepastoreo y la invasión de especies exógenas son las principales causas para que en la actualidad se encuentre catalogada en peligro de extinción, además no existen aún medidas de conservación que eviten la extinción total de esta especie endémica. (Oleas, Meerow y Francisco-Ortega, 2016).

Se encuentra distribuida en diferentes puntos:

- Hacienda Yamayacu
- Jardín Botánico-Ambato
- Ambato
- Santa Rosa
- Tilulun
- Carretera antigua Ambato-Guaranda
- Pelileo
- Salasaca

- Penipe
- Riobamba-Ambato
- Locaciones cercanas de Punín (Oleas, Meerow y Francisco-Ortega, 2016).

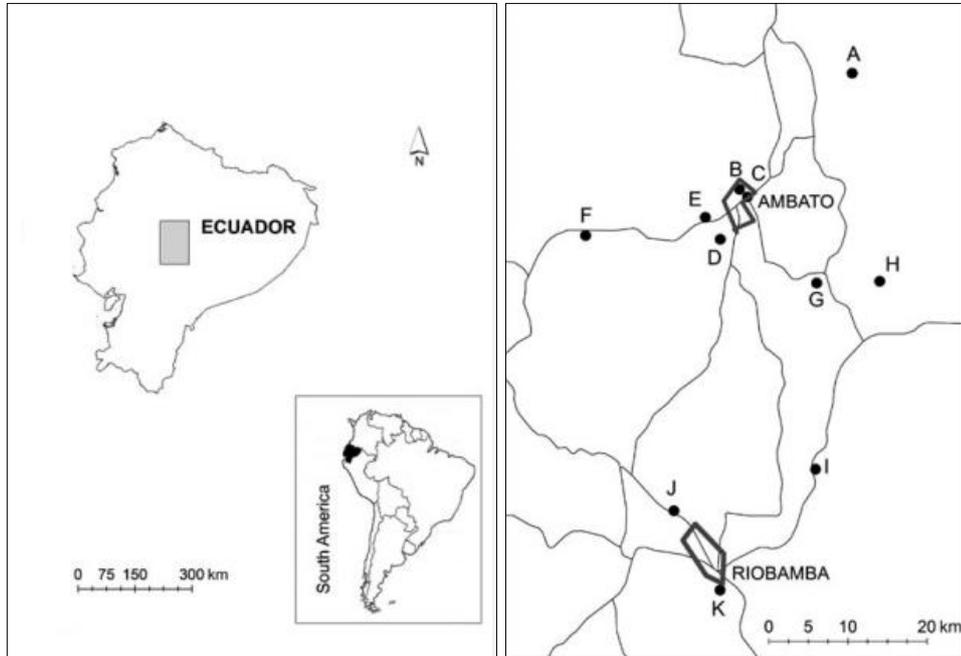


Figura 1-1. Ubicación *Phaedranassa schizantha*

Fuente: (Oleas, Meerow y Francisco-Ortega, 2016)

1.2.1.2 *Phaedranassa tunguraguae*



Fotografía 2-1. *Phaedranassa tunguraguae*

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

Taxonomía

- Reino: Plantae
- Filo: Tracheophyta

- Clase: Liliopsida
- Orden: Liliales
- Familia: Amaryllidaceae
- Nombre científico: *Phaedranassa tunguraguae* (IUCN, 2016b).

Es una especie que se localiza en los andes del Ecuador, principalmente en zonas pertenecientes a la provincia de Tungurahua, como la carretera Baños-Puyo y en lugares cercanos a las laderas orientales del volcán Tungurahua, entre 1500-2100 msnm. (Figura 2-1). Está distribuida en diferentes puntos:

- Baños
- San Vicente
- Runtún
- Ulba
- Agoyán
- Río Verde
- Machay

P. tunguraguae se encuentra en zonas donde existe un alto porcentaje de deforestación, es por ello que según los criterios de la UICN es catalogada en peligro de extinción. Las especies de *Phaedranassa* tienen la capacidad de adaptarse a cualquier área natural abierta, como acantilados, alrededor de las carreteras, ríos, etc.; lugares que presentan un alto riesgo para la misma, lo que permite que sobrevivan unas pocas especies son sus semillas, dado que presentan un ala pequeña que favorece su dispersión con el viento y su posterior polinización. (Oleas, Meerow y Francisco-Ortega 2012).

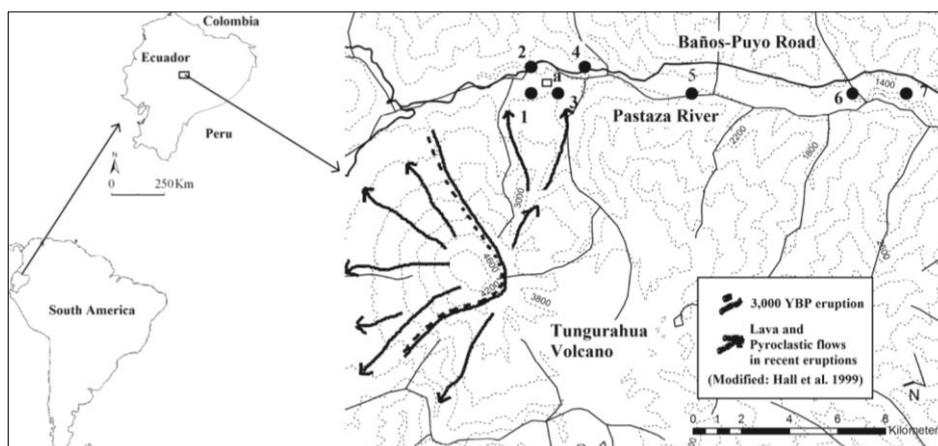


Figura 2-1. Ubicación *Phaedranassa tunguraguae*.
Fuente: (Oleas, Meerow y Francisco-Ortega, 2012)

1.3 Cultivo *in vitro* o micropropagación

El término cultivo de tejidos vegetales abarca muchas técnicas de cultivo de material vegetal, incluyendo a los protoplastos, células, tejidos, órganos y plantas completas. A través de estas técnicas es posible obtener plantas libres de microorganismos en un medio de cultivo estéril y en condiciones ambientales controladas. (Segretín, 2010a: p. 1).

Dentro de la micropropagación son destacables: la velocidad rápida de propagación (reproducción), la explotación eficiente del espacio, el mejoramiento de las condiciones sanitarias de las plantas y la facilidad del intercambio internacional de germoplasma; que constituyen algunas de las ventajas que se pueden encontrar. (Meena et al., 2015a: p. 49-53). Entre los factores de importancia que influyen en el cultivo *in vitro* se cuentan: la naturaleza de los reguladores de crecimiento de las plantas (hormonas vegetales), la luz (fotoperiodo), la fuente de carbono y el pH del medio. Del mismo modo otros factores internos como la posición del explante derivado de la planta madre deberían ser considerados. (Meena et al., 2015b: p. 49-53).

1.3.1 Propagación vegetativa natural

En forma general, la propagación vegetativa natural, utiliza partes del vegetal que conserve la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular, para generar nuevos tallos y raíces a partir de cúmulos celulares presentes en diversos órganos. Dentro de la propagación vegetativa natural podemos encontrar cuatro técnicas: 1) Scaling; 2) Croos – cutting and scooping; 3) Chipping and twin-scaling; y 4) Cuttings. (Bach et al., 2013a: p. 265).

1.3.2 Twin-scale

El cultivo *in vitro* de las especies de Amaryllidaceae se realiza mediante la técnica “*twin scale*”, la cual consiste en la obtención de explantes de escala gemela que forman parte de dos escalas adyacentes conectadas por una porción de tejido de placa basal (Bach et al., 2013b: p. 265).

Muchas especies bulbosas producen brotes adventicios a partir de tejido en la base de las escamas de bulbo y de la unión de las escamas en la placa basal. Por lo tanto, el cultivo mediante esta técnica ha demostrado ser una estrategia muy útil para la conservación de plantas nativas con clones de alto valor genético y de alta calidad. (Bach et al., 2013c: p.265).

A partir de un bulbo de la especie de género *Narcissus* (aproximadamente de 12 - 14 cm de circunferencia) se pueden obtener de 20 - 45 explantes. Sin embargo, un número demasiado alto de escamas cortadas reduce los resultados en bulbos más pequeños (Bach et al., 2013d: p.266).

Esta técnica requiere altos niveles de saneamiento o asepsia. Todas las superficies de trabajo deben estar limpias y todos los instrumentos deben ser esterilizados periódicamente durante el trabajo. Además, es necesario proteger las twin-scales del secado y el ataque de hongos durante la incubación. Las twin-scales deberían ser tratadas por inmersión en una alta concentración de solución fungicida o polvo fungicida para evitar la contaminación de los explantes. (Bach et al., 2013e: p. 266).

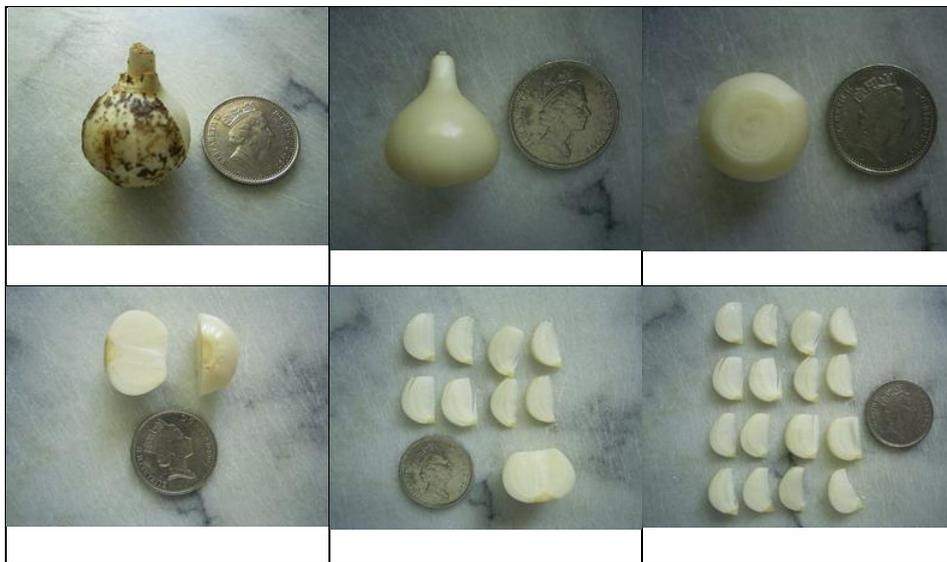


Figura 3-1. Técnica twin-scale.

Fuente. Bach et al., 2013

1.3.3 Morfogénesis

La embriogénesis somática y la organogénesis, son procesos morfogénicos que se utilizan más a menudo en el cultivo *in vitro* de especies vegetales. El primer proceso, embriogénesis somática, es un proceso en donde sin la fertilización de los gametos, da como resultado un embrión cigótico, y el segundo proceso, organogénesis, se pueden obtener tallos, raíces o flores sin la necesidad de una fertilización de los gametos; estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según ciertas condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división. A esto se denomina totipotencialidad.

1.3.3.1 Totipotencia de las células vegetales

La totipotencia es la característica que presentan las células vegetales que permite a partir de un explante extraído de una planta madre y condiciones de cultivo adecuadas, regenerar una planta entera con el genoma completo de la planta. (Loberant et al., 2010: p. 1).

Esta capacidad, es característica de un grupo de células vegetales conocidas como células meristemáticas, presentes en distintos órganos de la planta. Básicamente, la reproducción asexual se da debido a que las células vegetales poseen un mecanismo de división mitótico, al igual que las células animales, mediante el cual cumplen sucesivas etapas de crecimiento y desarrollo. (Segretín, 2010b: p: 2)

La potencialidad que posee una célula diferenciada, para generar tejidos nuevos por ende un organismo completo, disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por esa célula, pero puede revertirse parcial o completamente según las condiciones de cultivo a las que se la someta. (Segretín, 2010c: p: 4).

1.3.3.2 Tipos de morfogénesis

Dentro de la morfogénesis, podemos encontrar tres tipos: la primera es la organogénesis directa si la formación se traduce en brotes, raíces o flores; la segunda, constituye la embriogénesis directa, si se induce la formación de embriones somáticos y si a partir de la siembra de un explante *in vitro* se da la proliferación de células en forma desordenada y sin ninguna función predeterminada, se iniciará la producción de callos o suspensiones celulares.

La regeneración es un proceso que comprende diferentes fases que se suceden de manera similar para los tres tipos. Estas fases se denominan como: adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización. (Klerk et al., 1997; citados en Segretín, 2010d).

- I. En la adquisición de la competencia, las células no dan una respuesta al estímulo organogénico, pero logran obtener esta competencia durante una fase de desdiferenciación.
- II. En la fase de inducción, las células receptan al estímulo morfogénico, haciendo que exista relación entre el órgano a desarrollar con el tipo, concentración y combinación de los reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo.
- III. En la fase de realización, ya se forma totalmente el órgano mediante las divisiones continuas de la célula.

Las líneas continuas expresan organogénesis o embriogénesis directa mientras que las líneas quebradas indican que la morfogénesis se obtiene por vía indirecta (Figura 3-1).

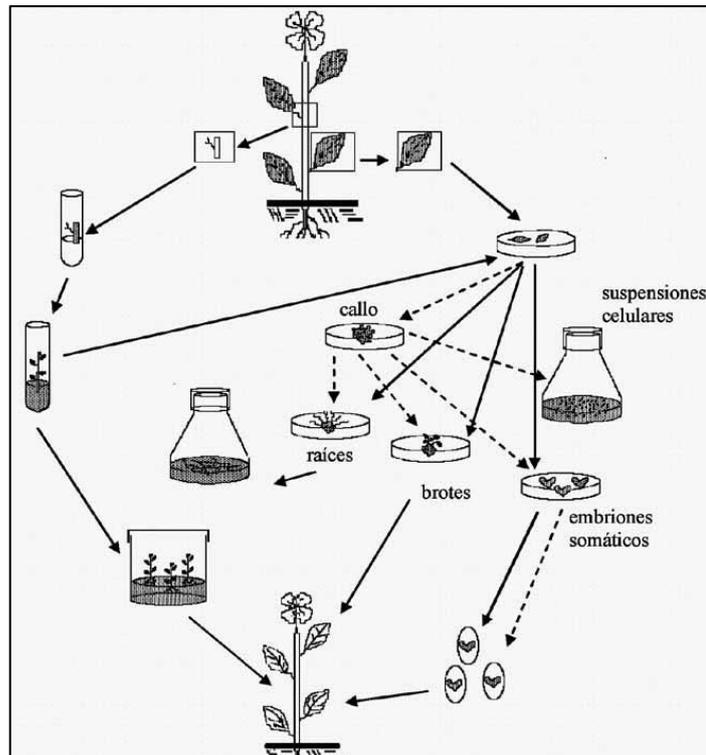


Figura 4-1. Tipos de morfogénesis.

Fuente: (Klerk et al., 1997; citados en Segretín, 2010d).

En la revisión bibliográfica (Paredes et al., 2014: pp. 207-214), se menciona que se han utilizado técnicas de micropropagación con fines de conservación para la familia Amaryllidaceae para la recuperación de especies bulbosas amenazadas, generando entre 1,13 a 1,6 bulbillos por bulbo madre, sin embargo, mediante el uso de la técnica de twin-scale se pueden obtener hasta 30 bulbillos por bulbo madre. Lo que demuestra resulta eficiente el uso del bulbo como punto de partida para la obtención de explantes utilizando la técnica de twin-scale.

1.4 Reguladores de crecimiento

Las auxinas, giberelinas y las citocininas son hormonas que actúan de manera estimulante sobre el metabolismo celular (Auge et al., 1986a: p.10). Son endógenas, es decir, que pueden ser sintetizadas por el vegetal. Existen hormonas naturales, sin embargo, hay hormonas que son producto de síntesis, cuyas fórmulas químicas son diferentes a las sustancias naturales pero presentan una actividad semejante. Ambas sustancias, endógenas y de síntesis, están dentro de la categoría de los reguladores de crecimiento. (Auge et al., 1986b: p.10).

Todos estos compuestos tienen características en común (Auge et al., 1986c: p.10):

- Si se les utiliza en dosis altas, actúan como herbicidas, por lo que se usan en dosis muy bajas.
- No pueden accionar autónomamente el cambio en el vegetal, necesitan interactuar con otros reguladores. Su correcto funcionamiento se da cuando existe un equilibrio establecido entre ellos.
- Intervienen en varios procesos fisiológicos, lo que implica varias modalidades de acción, por esta razón, la noción de “hormonas específicas” (de efecto rizógeno o colágeno sobre tallo, etc.) en la actualidad se ha abandonado.
- Aquí hay que observar una diferencia muy importante entre reguladores endógenos y de síntesis: a los primeros los controla la maquinaria metabólica celular, por lo que son controlados o eliminados rápidamente; en contraste, los segundos persisten durante mucho más tiempo y a menudo se prefieren debido a sus aplicaciones prácticas.

1.4.1 Auxina

Su nombre se debe a la acción en el alargamiento celular (auxesia). (Auge et al., 1986d: p:11). Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que normaliza el desarrollo y crecimiento de las plantas. Podemos encontrar una variedad de hormonas de este tipo, por ejemplo, ácido indolacético (AIA), que es el más utilizado, muy activo en bioensayos presente en concentraciones nanomolares, otras auxinas importantes son; ácido 4-cloro-indolacético (4-ClIAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (Jordán et al., 2006a: p: 3). Las auxinas poseen un compuesto de núcleo indol, cuya fórmula es: $C_{10}H_9O_2N$, cuyo nombre es: Ácido indol B-acético (Figura 4-1) (Auge et al., 1986e: p:11)

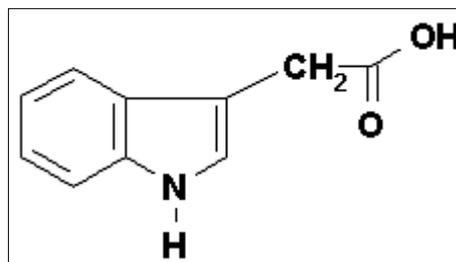


Figura 5-1. Ácido indol B-acético

Fuente: Auge et al., 1986e: p:11

Las concentraciones óptimas son diferentes para cada tipo de acción, lo que ocasiona un agrandamiento y alargamiento celular en los tejidos. (Roca y Mroginski, 1991a: p.64).

1.4.1.1 La auxina en la planta

Existen diferentes sitios de la planta, en donde se da la síntesis de las auxinas como las hojas y frutos jóvenes, vástagos florales y yemas. Esta síntesis es posible, gracias a que todas las plantas pueden sintetizar auxinas. (Auge et al., 1986f: p.12).

El proceso inicia desde la parte superior hacia la base de los órganos con una polaridad en los órganos jóvenes, exactamente en este recorrido la auxina es descompuesta por las auxina-oxidasas, esto ocasiona que las concentraciones de auxina sean siempre mayores cerca de los lugares de síntesis. Así, estas hormonas están presentes con una concentración apta en los puntos vegetativos, asegurando la multiplicación y el alargamiento celular. (Auge et al., 1986g: p.12).

1.4.1.2 Efectos fisiológicos de las auxinas

- Crecimiento y formación de raíces. – Las auxinas influyen en diferentes procesos de la planta durante el cultivo *in vitro*; están involucradas en el desarrollo, división, crecimiento y diferenciación celular. Se han realizado diferentes estudios sobre el efecto de las auxinas en las plantas, el principal es el crecimiento de los tallos y coleoptilos, así como la formación de raíces secundarias. La concentración óptima para el crecimiento de los tallos se encuentra entre 10^{-6} y 10^{-5} M, pero, para la formación de las raíces resulta demasiado alta, se necesitan niveles menores a 10^{-9} M de IAA para inducir crecimiento de raíces. (Jordán et al., 2006b: p.8).
- Regulación de tropismos. – El tropismo es el movimiento que tiene la planta de manera que crece en cierta dirección debido a una respuesta a un estímulo también direccional; estos movimientos pueden ser curvaturas, giros o inclinaciones. Las auxinas son las que controlan estos tropismos sobre el crecimiento de los tallos y raíces. (Jordán et al., 2006c: p.8).
- Si el movimiento se debe al estímulo de luz se llama fototropismo, de gravedad geotropismo o gravitropismo, o de contacto, tigmotropismo. (Jordán et al., 2006d: p.8).
- Dominancia apical. – El desarrollo de brotes axilares laterales en toda la longitud del tallo suele reprimirse debido al gradiente de auxina que se distribuye desde el ápice primario hacia la base de la planta, manteniendo así la dominancia apical. (Jordán et al., 2006e: p.8).

- Abscisión de órganos. – Las auxinas también previenen la caída de hojas, flores y frutos jóvenes. El transporte de esta hormona por afuera de la lámina foliar a la base del pecíolo hace que se inhiba la abscisión de los órganos; además inhibe la hormona etileno, principal efector de la formación de la zona de abscisión. (Jordán et al., 2006f: p.8).
- Desarrollo de flores y frutos. – Ayuda al crecimiento de frutos y es adecuada para el desarrollo de flores, porque al ser tratadas con inhibidores de transporte de auxinas muestran deformidades en las inflorescencias y en la arquitectura floral. (Jordán et al., 2006g: p.9).

No existe una concentración exacta y adecuada que se necesite para el cultivo *in vitro* ya que este varía dependiendo de la especie. Sin embargo, en general podemos decir que las concentraciones que más se usan corresponden a (Roca y Mroginski, 1991b: p.64):

- AIA (0.001 a 10 mg/L), con un punto óptimo de 0.1 a 1 mg/L)
- 2,4-D (0.1 a 10 mg/L) con un punto óptimo de 1 a 5 mg/L
- ANA (1 a 10 mg/L), con un punto óptimo de 2 mg/L

1.4.2 Citoquinina

Las citoquininas son hormonas vegetales que favorecen la división y diferenciación celular. (Mok y Mok, 2001a: p.90). El uso de citoquininas en el cultivo de tejidos tiene por finalidad superar la dominancia apical obteniéndose así la proliferación de yemas axilares. (Cossio, 2013a: p.17).

Si se aplican externamente citoquininas a un tejido que necesite de estas hormonas, ésta promueve un mecanismo autoinductor de síntesis de citoquininas, por tal motivo el efecto fisiológico puede ir más allá del sitio en el que se aplicó, es decir, a todos los órganos, ocasionando beneficios a la planta más generalizados. (Cossio, 2013b: p.18).

Al igual que en el caso de las auxinas, dentro de las citoquininas se pueden distinguir dos tipos (Jordán et al., 2006h: p.19):

- I. Citoquininas naturales, que son generadas por las plantas y que su síntesis sucede en la raíz, meristema apical y semillas inmaduras, dentro de las cuales podemos encontrar unas hormonas naturales endógenas, a saber, la zeatina, trans-zeatina o isopentiladenina
- II. Citoquininas artificiales, que son de origen sintético. Dentro de su estructura presentan la base adenina con diversas moléculas ligadas, generándose así hormonas derivadas como la

benciladenina (BA) o la furfurilaminopurina (kinetina) u hormonas de este tipo que dentro de sus estructuras no poseen la adenina, con acción biológica similar a las citoquininas como el tidiazurón (TDZ).

Estos reguladores sintéticos son más potentes que las hormonas naturales endógenas. No pueden ser degradadas o metabolizadas por el tejido. Un ejemplo claro es el tidiazurón que es un inductor potente en la formación de nuevos brotes o embriones somáticos tanto en plantas leñosas como herbáceas.

1.4.2.1 Efectos fisiológicos

- Promueven la división celular. - En conjunto con las auxinas, las citoquininas favorecen la formación de callos de cicatrización. (Cossio, 2013c: p.18).
- Promueven la formación y crecimiento de brotes laterales (axilares). – Sin la presencia de las auxinas, éstas logran vencer la dominancia apical promoviendo una exagerada brotación lateral, provocando la escoba de brujas. (Cossio, 2013c: p.19)
- Promueven la germinación de algunas semillas.
- Promueven la maduración de los cloroplastos. – Junto con la luz y nutrientes, las citoquininas participan en la síntesis de pigmentos fotosintéticos y proteínas enzimáticas. (Cossio, 2013d: p.19).
- Retrasan la senescencia de las hojas. – Según, Cossio, 2013e: p.19, la senescencia es un proceso genético programado que afecta todos los tejidos vegetales. Este proceso en las hojas está regulado por un equilibrio hormonal dado por los distintos niveles de citoquininas y de etileno, por esta razón la aplicación de citoquininas en órganos de plantas adultas retrasa la senescencia.

1.5 Etapas de la micropropagación

Antes de elegir el explante adecuado para iniciar el cultivo *in vitro*, se deben considerar cuatro puntos (Olmos et al, 2010a: p.163):

- El tipo de órgano y el lugar.
- La edad o el estado del inóculo.

- La temporada en la cual se deba tomar el inóculo.
- Y la calidad de la planta.

Cada una de las etapas que integra la micropropagación, necesitan condiciones particulares de medio ambiente y tipo de inóculo. A continuación, se presentan las etapas:

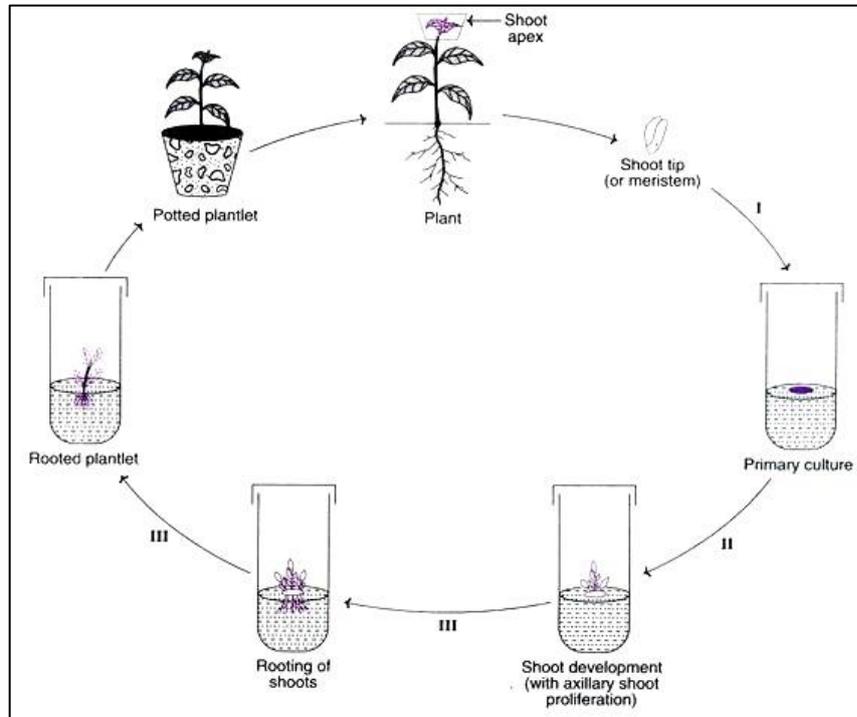


Figura 6-1. Diagrama de las etapas del cultivo *in vitro*.
Fuente: Nandkishor Jha, 2016

1.5.1 Etapa 0: Banco clonal

El cultivo *in vitro* va de la mano con la selección de material vegetal inicial. Esta etapa es primordial puesto que se logra reducir los problemas de contaminación, especialmente los problemas fúngicos y obtener una alta tasa de sobrevivencia de los explantes. (Smith, 2013).

1.5.2 Etapa 1: Establecimiento del cultivo

Primero hay que seleccionar el explante que va ser utilizado, para seguidamente desinfectarlo superficialmente; la obtención de cultivos axénicos, es decir libres de contaminación, se puede lograr tratándolos mediante aproximaciones preventivas y curativas. Una acción preventiva es el empleo de métodos de verificación de patógenos en los explantes. Debido a que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos (bacterias y hongos), que competirán con el explante es

necesario tomar las precauciones necesarias para que el cultivo se mantenga axénico. (Roca y Mroginski, 1991c: p.128).

Generalmente se emplean soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, cloro comercial, alcohol a distintos porcentajes para la desinfección (Roca y Mroginski, 1991d: p.129). Es muy importante mantener un cuidado adecuado de los explantes, porque de este paso depende en gran magnitud la viabilidad de los mismos. (Bhojwani, 2013a: p.43).

Para poder determinar la solución desinfectante adecuada, su concentración y el tiempo de inmersión, se pueden determinar por las características del explante; en la práctica, se establece experimentalmente por ensayo y error. (Roca y Mroginski, 1991e: p.129).

Durante la manipulación pueden llegar a infectarse los explantes y/o el medio de cultivo por bacterias y hongos que se pueden encontrar en el ambiente, o también por patógenos endógenos latentes que se encuentran dentro del sistema vascular. Estos patógenos se pueden tratar con bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo. (Olmos et al., 2010c: p.164).

Dentro de los problemas que se pueden encontrar, la fenolización de los explantes es un aspecto a considerar, dado que es uno de los principales problemas en esta etapa; los fenoles tornan al medio de cultivo de un color café, el cual puede ser tóxico para el tejido vegetal. Este problema se presenta en tejidos maduros de plantas leñosas. (Bhojwani, 2013b: p.43).

El proceso general de desinfección incluye varios pasos (Olmos et al., 2010b: p.164):

- Lavado de los explantes con agua de grifo.
- Inmersión en etanol al 70% por 1 minuto.
- Inmersión del explante a concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0,5 - 1,5%), con pequeñas cantidades (gotas) de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad.
- Seguidamente los explantes deben ser enjuagados por lo menos tres veces con agua destilada estéril.

1.5.3 Etapa 2: Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los siguientes ciclos de micropropagación y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción como la multiplicación y enraizamiento. (Olmos et al., 2010d: p.356).

En esta etapa se hace uso de los reguladores de crecimiento, sus niveles dependen de los endógenos en el explante. Altos niveles de citoquininas son usados para incentivar la formación de brotes. (Ahuja, 2013a: p.4).

Dentro de este paso se debe tratar que no exista mucha variabilidad genética, mediante estudios se ha demostrado que esta variabilidad es mayor en plantas obtenidas por callos, mientras que los cultivos de órganos y de meristemas presentan mínimas posibilidades de cambios genéticos. (Ahuja, 2013b: p.4).

El proceso de la organogénesis se da por inducción de yemas axilares o adventicias. Este proceso comprende la multiplicación de las yemas preformadas, que consecuentemente derivan de la inducción de yemas axilares, usualmente sin formación de callo. La inducción de yemas adventicias se da mediante el tratamiento con reguladores de crecimiento con el uso de tejido meristemático. (Levitus, 2010a: p.356).

Un tejido vegetal puede sufrir un estrés producto del aislamiento del explante de la planta madre, en este proceso surge la presencia de compuestos fenólicos oxidados que inhiben el crecimiento e incluso pueden llegar a causar la muerte del explante. Para minimizar el daño de estos compuestos se emplea generalmente carbón activado y polivinilpirrolidona que son agentes adsorbentes de fenoles en el medio de cultivo. (Levitus, 2010b: p.357)

No se puede exagerar en el número de subdivisiones o subcultivos ya que puede haber cambios genéticos por la acción de las hormonas. (Rojas, 2003a: p.35).

1.5.4 Etapa 3: Enraizamiento

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil, mientras que en las especies leñosas resulta complicado, debido a su limitada capacidad rizogénica. Para el enraizamiento en condiciones *in vitro* pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (auxinas), de modo que se promueva la rizogénesis (Levitus, 2010c: p.357). Generalmente en el enraizamiento se reduce o se elimina de acuerdo con la cantidad de citoquininas, sin embargo, en algunas especies de plantas la eliminación de hormonas lo induce. (Rojas, 2003c: p.35).

Los sustratos incluyen medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua. En un medio solidificado con agar, los nutrientes se reducen de 1/2 a 1/4

de la composición original, y la sacarosa se reduce a una concentración final de 1-2%. Medios con baja concentración salina, incrementan el porcentaje de enraizamiento de vástagos axilares en plantas latifoliadas. (Olmos et al., 2010e: pp.356).

El empleo de agar presenta ventajas y desventajas sobre la rizogénesis. Por un lado, el enraizamiento de especies forestales en agar se favorecería al producirse una rizogénesis más sincrónica como resultado del contacto íntimo de las estacas con el medio de cultivo. Sin embargo, las raíces producidas por este método son usualmente delgadas y no se forman raíces cabellera. Adicionalmente, el empleo de agar está asociado con la formación de callo en la base de las estacas, que conduce al establecimiento de conexiones vasculares interrumpidas entre raíces y vástagos. (Olmos et al., 2010f: p356).

La auxina más utilizada es el IBA (ácido 3-indolbutírico), que puede utilizarse a concentraciones de 1-10 mM durante pocas horas (Olmos et al., 2010g: p.356). Es importante acentuar que el uso de auxinas a elevadas concentraciones es contraproducente porque induce la formación de callo en la base de las estacas. Por ello, para cada cultivo es necesario optimizar un protocolo de rizogénesis que minimice la formación de callo y maximice la tasa de rizogénesis y supervivencia de las plantas. (Levitus, 2010d: p.357).

1.5.5 Etapa 4: Aclimatación

La aclimatación es una etapa importante debido a que las plantas que se forman en condiciones *in vitro*, crecen bajo un ambiente controlado artificialmente y en recipientes cuya humedad relativa es muy alta, se desarrollan muy débiles y con hojas que carecen de cutícula, si son llevadas a su ambiente natural pueden deshidratarse fácilmente y morir, por lo tanto, es muy importante que las “vitroplantas” no sufran stress por falta de agua o iluminación directa del sol. Deben ser sometidas a un pre - acondicionamiento llamado endurecimiento. (Rojas, 2003d: p.35).

Al ser extraídas del envase contenedor del medio de cultivo, deben ser limpiadas de todo vestigio del medio de cultivo con agua tibia y sumergidas en una solución de un fungicida sistémico, pues pueden ser una fuente de contaminación; se colocan en vasos o materas de 250 mL en una mezcla balanceada de suelo, arena y material inerte, estéril y almacenadas en un invernadero bajo condiciones de humedad constante y baja radiación solar (condiciones de cámara húmeda). Se requiere durante los tres primeros días un ambiente cercano al 95% de humedad relativa y 40% de exposición a la luz, la humedad relativa se va disminuyendo paulatinamente y la luz se va aumentando a medida que la plántula va creciendo y adaptándose al nuevo ambiente. Al cabo de

unos siete días una vez endurecidas deben ser aclimatadas por lo que se trasplantan a un nuevo sustrato con suelo, arena y materia orgánica en condiciones de vivero. (Rojas, 2003e: pp.35).

1.6 Factores que influyen en la micropropagación

1.6.1 El explante

El explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. La selección del explante puede hacerse teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta. (Roca y Mroginski, 1991e: p.135).

El tamaño del explante no tiene aparentemente mayor influencia. Solamente en el caso de que se pretenda obtener plantas libres de virus, los meristemas tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos; sin embargo, es más difícil regenerar de ellos plantas completas. (Roca y Mroginski, 1991f: p.135).

1.6.2 Planta donadora

Se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro*. A este respecto, los meristemas apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies. (Roca y Mroginski, 1991g: p.133).

La posición relativa de las yemas es otro factor importante. Se ha observado, por ejemplo, que las yemas axilares de rosa, obtenidas de la parte media del tallo, se desarrollan más rápidamente que aquéllas obtenidas de la base o la porción apical. (Roca y Mroginski, 1991h: p.133).

En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes han sido generalmente la fuente del explante. (Roca y Mroginski, 1991i: p.133).

1.6.3 Composición de los medios de cultivo

El éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física. (Roca y Mroginski, 1991k: p.133).

CAPÍTULO II

2 METODOLOGÍA

2.1 Ubicación geográfica

Los experimentos y ensayos del proyecto de titulación se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, perteneciente a la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en el Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2.1.1 Sitios de muestreo

Para la selección de los sitios de muestreo, se realizó un recorrido de identificación del número de especies que se encontraban en el sector. Es importante aclarar que se tomaron dos muestras de cada especie, por disposición del Ministerio del Ambiente; la primera muestra fue empleada en el estudio y la segunda entregada al herbario designado.

Los diferentes puntos identificados fueron georreferenciados con el Sistema de Posicionamiento Global (GPS), con la proyección WGS84, cuyos datos fueron registrados en los mapas de las diferentes especies.

El sector donde se realizó la toma de muestra de la especie *Phaedranassa schizantha* fue la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Parroquia Lizarzaburu, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, a una altitud de 2809,298 m.s.n.m. con coordenadas 758528,64 m; 9816595.99 m; 17 Sur. (Figura 1-2).

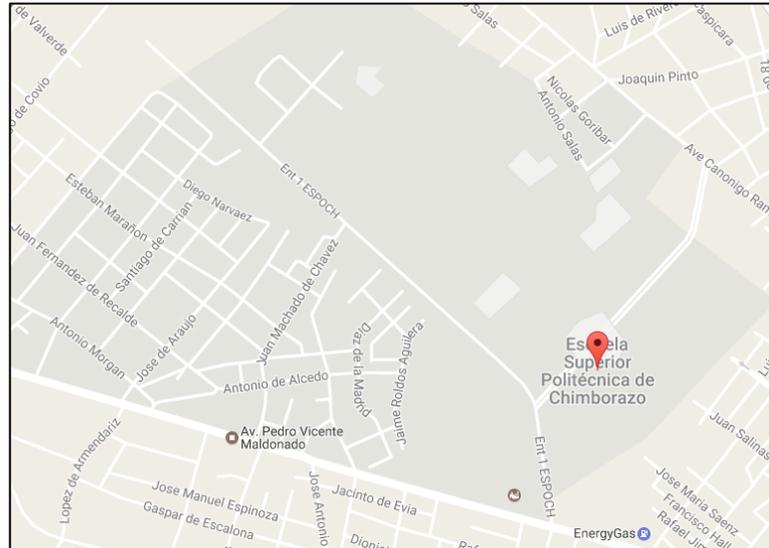


Figura 1-2. Localización de la especie vegetal *Phaedranassa schizantha*
Fuente: Pixelis Maps. 2017

El sector donde se realizó la toma de la muestra de la especie *Phaedranassa tunguraguae* fue en la Vía Baños – Puyo, Parroquia Ulba, Cantón Baños, Provincia de Tungurahua, a una altitud de 1702.453 m.s.n.m. con coordenadas 789977,91 m; 9845514,64 m; 17 Sur. (Figura 2-2).

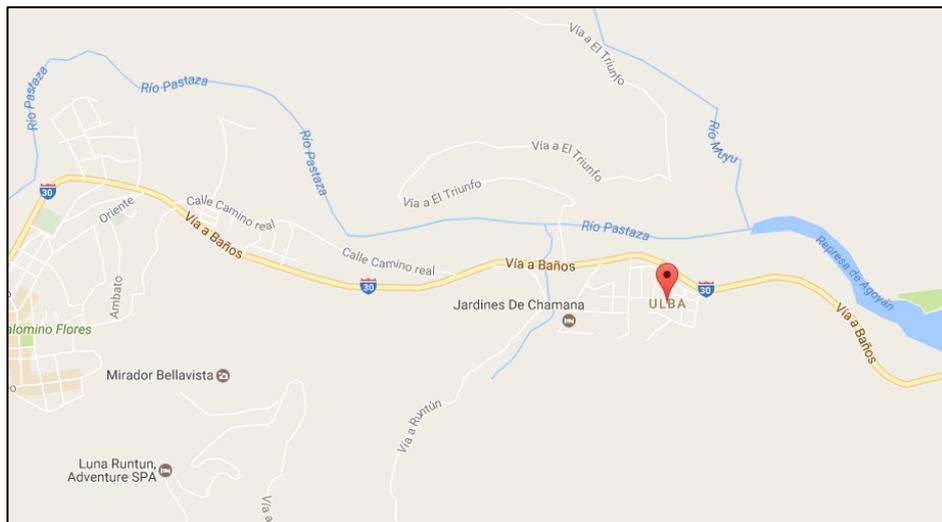


Figura 2-2. Localización de la especie vegetal *Phaedranassa tunguraguae*
Fuente: Pixelis Maps. 2017

Según, Oleas et al., 2012, la especie *P. schizantha* se localiza en diferentes puntos en Riobamba, ubicando de esta manera el lugar más cercano para el muestreo. Identificando 9 poblaciones, donde se pudo notar que existen alrededor de 5 plantas por cada punto; mientras que en la segunda especie *P. tunguraguae*, fueron localizadas 7 poblaciones en las cercanías de uno de los lugares donde habitan estas especies, pero a diferencia de la primera, en cada población únicamente se encontraba una sola planta, debido a que se encuentra en una zona donde la depredación es muy alta.

2.1.2 Muestreo

El muestreo de la especie *P. schizantha*, fue realizado en un solo día (Fotografía 1-2), mediante la autorización de la investigación científica solicitada al Ministerio del Ambiente (MAE), donde autorizó la colección de 2 muestras de material vegetal que fueron destinados de la siguiente manera:

- 1 muestra para almacenamiento en el herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- 1 muestra para la investigación.

P. schizantha, al encontrarse dentro de la Provincia de Chimborazo, lugar donde se llevó a cabo la investigación no fue necesario de un Acta de Movilización de Especímenes de Vida Silvestre otorgada de igual manera por el MAE.



Fotografía 1-2. Colección muestra vegetal, *P. schizantha*
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

La toma de muestras de la especie *P. tunguraguae* se realizó en un día, de igual manera se cumplió en la colección de únicamente 2 muestras vegetales (Fotografía 2-2), designadas de la siguiente manera:

- 1 muestra para almacenamiento en el herbario “Ambato Misael Acosta Solís” de la Universidad Técnica de Ambato.
- 1 muestra para la investigación.

Esta especie se localiza en la Provincia de Tungurahua, y fue necesario solicitar al Ministerio del Ambiente Provincial, el Acta de Movilización de Especímenes de Vida Silvestre, para movilizar la especie al lugar donde se realizó la investigación.



Fotografía 2-2. Colección muestra vegetal, *P. tunguraguae*
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

2.2 Descripción de las especies evaluadas

El material vegetal empleado en la investigación fue obtenido de la colección de las especies pertenecientes a la familia Amaryllidaceae, identificadas como *Phaedranassa schizantha* y *Phaedranassa tunguraguae*, mismas que se caracterizan por ser plantas bulbosas, entonces se seleccionó ese órgano para la obtención de explantes. Estas especies son procedentes de una población natural en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Provincia de Chimborazo y Vía Baños -Puyo, Provincia de Tungurahua respectivamente.

2.3 En el laboratorio

La presente investigación se codificó como ensayos, en orden de facilitar la identificación de cada especie:

- Ensayo I: *Phaedranassa schizantha*
- Ensayo II: *Phaedranassa tunguraguae*

Mediante revisión bibliográfica (Segretín, 2010; Meena et al., 2015; Bach et al., 2013; Loberant et al., 2010; Paredes et al., 2014; Auge et al., 1986; Jordán et al., 2006; Cossio, 2013; Smith, 2013; Bhojwani, 2013); se determinó el siguiente protocolo que incluye: preparación de medio, desinfección y siembra.

2.3.1 Materiales, equipos y reactivos

2.3.1.1 Materiales

Envases de plástico, envases de vidrio, vasos de precipitación, pipetas, bisturí, pinzas, papel aluminio, ligas, mecheros, probetas, pie de rey.

2.3.1.2 Equipos

Destilador, balanza analítica, pH-metro, agitador magnético, autoclave, refrigeradora, cámara de flujo laminar, cámara de cultivo.

2.3.1.3 Reactivos

Medio basal Murashige & Skoog (MS), Auxina (Ácido 1 naftalenacético), Citoquinina (6-N-Bencilaminopurina), agar-agar, agua destilada, agua destilada estéril, etanol (70%), hipoclorito de sodio (3%), tween® 20, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, benomyl® 50 PM, jabón líquido.

2.3.2 Ensayo I: *Phaedranassa schizantha*

2.3.2.1 Preparación medio de cultivo

Hay que tomar en cuenta que se realizaron 4 tratamientos con 15 repeticiones teniendo en total 60 unidades experimentales (UE).

Cada unidad experimental consta de Medio Basal (MB), el cual está compuesto por Medio Murashige - Skoog, Sacarosa y Agar. Las cuales fueron discutidas y consultadas mediante la bibliografía.

Los tratamientos se describen a continuación. (Tabla 1-2)

Tabla 1-2. Tratamientos utilizados en la investigación para *P. schizantha*.

Tratamiento	Medio de cultivo	Sacarosa	Hormonas		Gelificante	pH
			Auxinas	Citoquininas		
0	Murashige y Skoog 4.32 g/L	30 g/L	-	-	Agar 10 g/L	5,6
1	Murashige y Skoog 4.32 g/L	30 g/L	Ácido 1 naftalenacético ANA 0,1 ppm	6-N Bencilaminopurina BAP 0,5 ppm	Agar 10 g/L	5,6
2	Murashige y Skoog 4.32 g/L	30 g/L	Ácido 1 naftalenacético ANA 0,1 ppm	6-N Bencilaminopurina BAP 1,0 ppm	Agar 10 g/L	5,6
3	Murashige y Skoog 4.32 g/L	30 g/L	Ácido 1 naftalenacético ANA 0,1 ppm	6-N Bencilaminopurina BAP 1,5 ppm	Agar 10 g/L	5,6

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

Previo a los pasos posteriores se tomaron en cuenta condiciones asépticas en todos los materiales que se utilizaron para la investigación, tales como vasos de precipitación, jarra plástica, varilla de agitación, jeringa, probetas, etc.; además se realizaron los siguientes cálculos:

- Volumen a preparar

$$60 \text{ UE} * 40 \text{ mL} = 2400 \text{ mL} \approx 2500 \text{ mL}$$

- Medio Basal

-Murashigue y Skoog

$$4.32 \text{ g/L} * 2.5 \text{ L} = 10.8 \text{ g (gramos a pesar)}$$

-Sacarosa

$$30 \text{ g/L} * 2.5 \text{ L} = 75 \text{ g (gramos a pesar)}$$

-Agar

$$10 \text{ g/L} * 2.5 \text{ L} = 25 \text{ g (gramos a pesar)}$$

Mediante el uso de una balanza analítica fueron pesadas las cantidades de reactivos calculadas anteriormente; después en un recipiente se colocaron 2,5 L de agua destilada desionizada con la ayuda de una probeta de 1000 mL. Fueron disueltos completamente en el solvente, medio Murashigue y Skoog (MS) y después la sacarosa, en ese orden. (Fotografía 3-2).



Fotografía 3-2. Disolución de MS y sacarosa
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Luego se distribuyó 625 mL de la solución preparada en cuatro vasos de precipitación. Cada vaso de precipitación se rotuló de la siguiente manera: T₀, T₁, T₂, T₃. (Fotografía 4-2).



Fotografía 4-2. Tratamientos *P. schizantha*.
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Posteriormente se agregaron las concentraciones respectivas de BAP Y ANA en cada uno de los tratamientos: T₁: BAP 0,5 ppm + ANA 0,1 ppm; T₂: BAP 1 ppm + ANA 0,1 ppm; y T₃: BAP 1,5 ppm + ANA 0,1 ppm. (Anexo D).

Una vez agregado las concentraciones tanto de BAP como de ANA; el pH fue ajustado a 5.6, utilizando gotas de KOH y HCl. Inmediatamente, fueron trasladados a un agitador magnético cada uno de los vasos de precipitación y se colocaron 6.25 g de agar en cada uno de ellos. Luego se esperó a que llegue al punto de ebullición y se mantuvo durante 5 minutos, el agar se disolvió completamente (Fotografía 5-2).



Fotografía 5-2. Medio preparado en estado de ebullición

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Después fueron distribuidos 40 mL de medio, en cada unidad experimental (Fotografía 6-2), y se sellaron con papel aluminio, papel periódico y ligas, de tal manera que quede bien sujeta al frasco. Una vez sellados los frascos fueron llevados a autoclave con 121 psi y 119 °C.



Fotografía 6-2. Distribución de medio en cada unidad experimental.

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

2.3.2.2 *Desinfección*

Una vez recolectado el material vegetal, fue trasladado al área de lavado donde fue sometida a un lavado superficial, con el fin de remover las partículas del suelo y otras impurezas, para ello se utilizó agua de grifo y una estopa, después se realizaron los cortes de las hojas, flores, tallo y raíz, con el auxilio de un bisturí desinfectado con alcohol al 70 %, dejando únicamente los bulbos (Fotografía 7-2). Con los bulbos obtenidos se procedió a realizar dos lavados en una solución con jabón líquido durante 5 minutos, después se hizo dos enjuagues con agua destilada estéril.



Fotografía 7-2. Cortes para la obtención del bulbo de *P. schizantha*
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Posteriormente fueron sometidos a una solución de fungicida curativo, Benomyl® 50 PM (1 g/L), durante 20 minutos (Fotografía 8-2). Después fueron sumergidos a una solución de etanol al 70% por 1 minuto.



Fotografía 8-2. Bulbos sumergidos en solución de Benomyl®
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Seguidamente, fueron expuestos a una solución de hipoclorito de sodio al 3% y Tween® 20 (4 gotas por cada 100 mL), durante 60 minutos; además fue necesario agitar cada 15 minutos con el fin de que la solución rodee todo el material vegetal. Finalmente, fueron llevados dentro de la cabina de flujo laminar en envases de vidrio cerrados esterilizados y se procedió a realizar tres enjuagues con agua destilada estéril. (Fotografía 9-2).



Fotografía 9-2. Enjuague material vegetal (bulbo *P. schizantha*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

2.3.2.3 Siembra

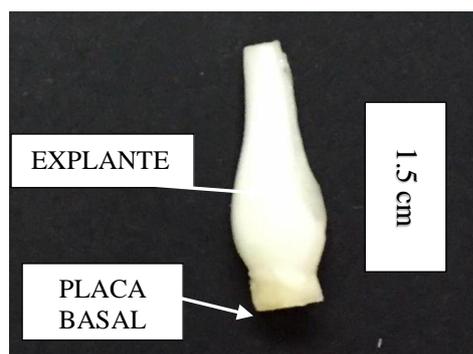
Después de realizar los enjuagues respectivos en el último paso de desinfección, dentro de la cabina laminar, se empiezan a obtener los explantes. Es importante recalcar que fue usada la técnica de twin-scale (Fotografía 10-2), debido a que es la más utilizada según revisión bibliográfica en plantas bulbosas, y permite obtener un mayor número de explantes, resultando beneficioso en este tipo de especies que se encuentran en peligro de extinción.



Fotografía 10-2. Obtención de explantes mediante la técnica twin scale (*P. schizantha*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

En este sentido, se deben precisar cuidados al momento de los cortes, puesto que cada explante debe contar con la placa basal necesaria para ser cultivado, además se lograron alrededor de 60 explantes de tamaños entre 1-1.5 cm aproximadamente (Fotografía 11-2).

Cada explante obtenido fue sembrado uno en cada unidad experimental, después fueron sellados con plástico estéril para evitar que ingresen microorganismos exógenos. Finalmente, fueron llevados a la cámara de cultivo con las condiciones: 25 °C ± 1, humedad (70% ± 1) y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, estas condiciones fueron aplicadas siguiendo la recomendación de Rojas, 2014f.



Fotografía 11-2. Tamaño aproximando del explante
 Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

2.3.3 Ensayo II: *Phaedranassa tunguraguae*

2.3.3.1 Preparación del medio

Se utilizaron 4 tratamientos con 10 repeticiones teniendo en total 40 unidades experimentales (UE).

Cada unidad experimental constó de Medio Basal (MB), el cual está compuesto por Medio Murashigue - Skoog, Sacarosa y Agar, mismas que fueron discutidas y consultadas mediante la bibliografía. Los tratamientos se describen a continuación. (Tabla 2-2).

Tabla 2-2. Tratamientos utilizados en la investigación para *P. tunguraguae*.

Tratamiento	Medio de cultivo	Sacarosa	Hormonas		Gelificante	pH
			Auxinas	Citoquininas		
0	Murashigue y Skoog 4.32 g/L	30 g/L	-	-	Agar 10 g/L	5,6
1	Murashigue y Skoog 4.32 g/L	30 g/L	Ácido 1 naftalenacético ANA 0,1 ppm	6-N Bencilaminopurina BAP 0,5 ppm	Agar 10 g/L	5,6
2	Murashigue y Skoog 4.32 g/L	30 g/L	Ácido 1 naftalenacético ANA 0,1 ppm	6-N Bencilaminopurina BAP 1,0 ppm	Agar 10 g/L	5,6
3	Murashigue y Skoog 4.32 g/L	30 g/L	Ácido 1 naftalenacético ANA 0,1 ppm	6-N Bencilaminopurina BAP 1,5 ppm	Agar 10 g/L	5,6

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Previo a los posteriores pasos se tomaron en cuenta las precauciones sobre mantener condiciones asépticas en todos los materiales que se utilizaron para la investigación, tales como vasos de precipitación, jarra plástica, varilla de agitación, jeringa, probetas, etc.; además se realizaron los siguientes cálculos:

➤ Volumen a preparar

$$60 \text{ UE} * 40 \text{ mL} = 2400 \text{ mL} \approx 2500 \text{ mL}$$

➤ Medio Basal

-Murashigue y Skoog

$$4.32 \text{ g/L} * 2.5 \text{ L} = 10.8 \text{ g (gramos a pesar)}$$

-Sacarosa

$$30 \text{ g/L} * 2.5 \text{ L} = 75 \text{ g (gramos a pesar)}$$

-Agar

$$10 \text{ g/L} * 2.5 \text{ L} = 25 \text{ g (gramos a pesar)}$$

Se procedió mediante el uso de una balanza analítica a pesar lo calculado anteriormente, después en un recipiente se colocó 2,5 L de agua destilada desionizada con la ayuda de una probeta de 1000 mL. Una vez medido el volumen de agua se disolvió el medio Murashigue y Skoog (MS) y después la sacarosa.

Luego se distribuyeron 625 mL de la solución preparada en cuatro vasos de precipitación. Cada vaso de precipitación se rotuló de la siguiente manera: T₀, T₁, T₂, T₃ (Fotografía 12-2).



Fotografía 12-2. Tratamientos *P. tunguraguae*
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Inmediatamente se agregaron las concentraciones siguientes de BAP y ANA, en cada tratamiento (Fotografía 13-2): T1: BAP 0,5 ppm + ANA 0,1 ppm; T2: BAP 1 ppm + ANA 0,1 ppm; y T3: BAP 1,5 ppm + ANA 0,1 ppm. (Anexo D)



Fotografía 13-2. Aforado de BAP y ANA
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Después se procede a ajustar el pH a 5.6 (Fotografía 14-2), usando gotas de KOH y HCl. Inmediatamente, se trasladan los vasos a un agitador magnético y se colocan 6.25 g de agar en cada uno de ellos. Se espera a que llegue a punto de ebullición durante 5 minutos hasta que el medio se encuentre completamente disuelto.



Fotografía 14-2. Corrección del pH
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

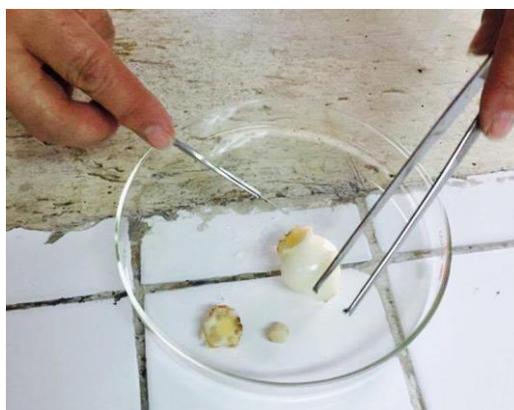
Después se distribuyen 40 mL del medio, en cada unidad experimental, y se sella cada unidad experimental con papel aluminio, papel periódico y ligas de tal manera que quede bien sujeta al frasco (Fotografía 15-2). Una vez sellados los frascos son esterilizados con autoclave a 121 psi y 119°C.



Fotografía 15-2. Sellado de cada unidad experimental.
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

2.3.3.2 Desinfección

Una vez recolectado el material vegetal, fue trasladado al área de lavado donde fue sometido a un lavado superficial, con el fin de remover las partículas del suelo y otras impurezas, para ello se hizo uso de agua del grifo y de una estopa, después se procede a realizar los cortes de las hojas, flores, tallo y raíz, con la ayuda de un bisturí desinfectado con alcohol al 70 %, dejando únicamente los bulbos (Fotografía 16-2). Con los bulbos obtenidos se realizan dos lavados en una solución con jabón líquido durante 5 minutos, y finalmente dos enjuagues con agua destilada estéril.



Fotografía 16-2. Cortes para la obtención del bulbo de *P. tunguraguae*
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Posteriormente, los explantes fueron sumergidos en una solución del fungicida (Benomyl® 50 PM (1 g/L), durante 20 minutos. Después fueron sumergidos en una solución de etanol al 70% por 1 minuto (Fotografía 17-2).



Fotografía 17-2. Bulbos sumergidos en soluciones de Benomyl®, etanol y cloro
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

Después fueron expuestos en una solución de hipoclorito de sodio al 3% y Tween® 20 (4gotas por cada 100 mL), durante 60 minutos; además fue necesario agitar cada 15 minutos con el fin de que la solución alcance todo el material vegetal. Finalmente, se trasladan dentro de la cabina de flujo laminar en envases de vidrio cerrados y se llevan a cabo tres enjuagues con agua destilada estéril. (Fotografía 18-2).



Fotografía 18-2. Enjuague material vegetal (bulbo *P. tunguraguae*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

2.3.3.3 Siembra

Después de haberse realizado los respectivos enjuagues en el último paso de desinfección dentro de la cabina laminar, los explantes fueron obtenidos mediante la técnica de twin-scale (Fotografía 19-2), debido a que es la más utilizada según revisión bibliográfica en plantas bulbosas, y porque permite obtener un mayor número de explantes, resultando beneficioso en este tipo de especies que se encuentran en peligro de extinción.



Fotografía 19-2. Obtención de explantes mediante la técnica twin scale (*P. tunguraguae*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

Es necesario un cuidado especial al momento de los cortes, puesto que cada explante debe contar con la placa basal necesaria para ser cultivado, se lograron alrededor de 40 explantes de tamaños entre 1-1.5 cm aproximadamente.

Cada explante obtenido se sembró uno en cada tratamiento, después fueron sellados con plástico para evitar que ingresen microorganismos exógenos, finalmente fueron llevados a la cámara de cultivo con las siguientes condiciones: $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, humedad ($70\% \pm 1$) y fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, estas condiciones se aplicó siguiendo la recomendación de Rojas, 2004g.

2.4 Evaluación de la respuesta de los explantes

La respuesta de los explantes fue registrada de forma cualitativa y cuantitativa. Cualitativamente se tomó en cuenta la presencia o ausencia de contaminación bacteriana y/o fúngica, el desarrollo de hojas y bulbillos por explante. Cuantitativamente se consideraron las siguientes variables: 1) factor: involucra los cuatro tratamientos en estudio, 2) brotes, 3) longitud, 4) diámetro, y 5) contaminación.

2.5 Análisis estadístico

Mediante el software IBM SPSS Statistics se realizó el análisis por el método Diseño de Componentes Principales (DCP) Método Multivariado, con un nivel de confianza del 95% a los datos obtenidos a 45 días después de la siembra.

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados

3.1.1 Localización de las especies *P. schizantha* y *P. tunguraguae*

➤ *Phaedranassa schizantha*

La especie fue ubicada mediante bibliografía y recorridos de observación, identificando así 9 puntos con sus respectivas coordenadas (Gráfico 1-3) en el Cantón Riobamba, dentro de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Cada población cuenta con alrededor de 5 individuos, fue seleccionado el punto 5 para la toma de las dos muestras vegetales en la investigación.

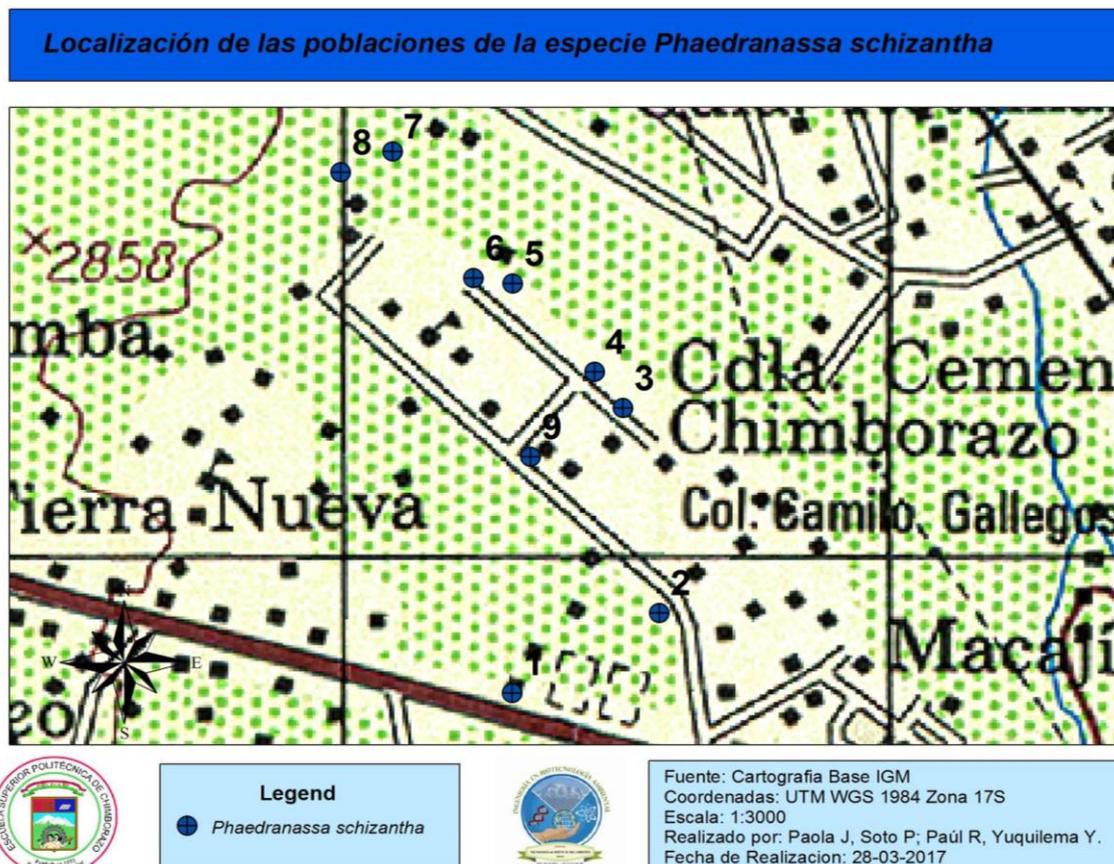


Gráfico 1-3: Ubicación de las poblaciones de la especie *P. schizantha*.
Realizado por: Paola J. Soto P; Paúl R. Yuquilema Y. 2017.

➤ *Phaedranassa tunguraguae*

Las poblaciones de esta especie fueron encontradas mediante bibliografía y recorridos de investigación, en la Provincia de Tungurahua, Cantón Baños, localizando 7 puntos (Gráfico 2-3); en cada punto se identificó 1 especie. Se seleccionaron los puntos 1 y 2 para obtener las muestras vegetales necesarias para la investigación.

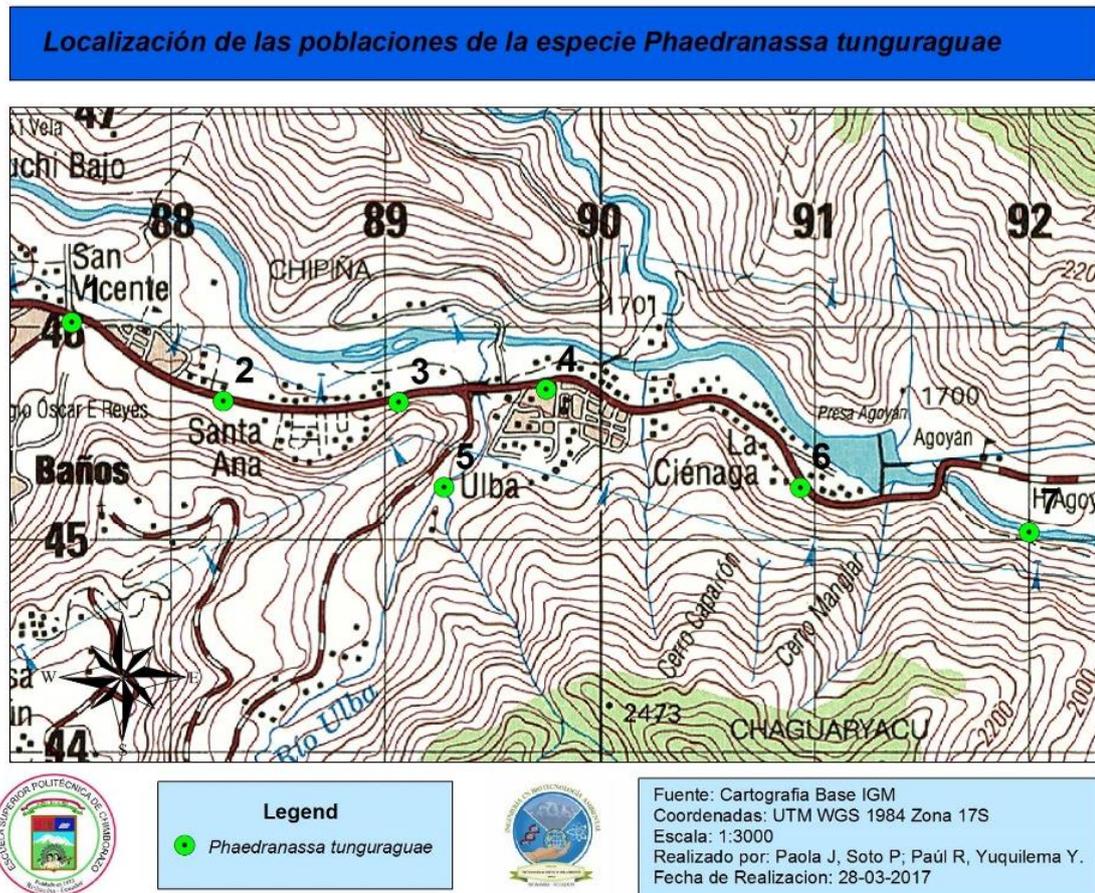


Gráfico 2-3: Ubicación de las poblaciones de la especie *P. tunguraguae*.

Realizado por: Paola J. Soto P; Paúl R. Yuquilema Y. 2017.

3.1.2 Ensayo I: *Phaedranassa schizantha*

A los 15 días después de la siembra se encontraron 4 unidades contaminadas, a los 30 días 12 unidades contaminadas y a los 45 días se encontró un total de 19 unidades contaminadas (Tabla 2-3), esto indica que el método de desinfección es efectivo y recomendable para esta especie, puesto que la contaminación no se debe al explante, sino responde a una mala manipulación (cierre deficiente de los envases de cultivo) y ausencia de mayores controles de asepsia dentro del laboratorio. La siembra que presentó contaminaciones corresponden a los tratamientos: T0: 4 contaminados; T1: 4 contaminados; T2: 5 contaminados; T3: 6 contaminados. Los tratamientos

que no presentaron respuesta al desarrollo de brotes fueron: T0: 4 sin brote; T1: 3 sin brote; T2: 1 sin brote. (Tabla 1-3).

Tabla 1-3: Brotes de los tratamientos a los 45 días de evaluación de *P. schizantha*

Tratamientos Repeticiones	0 BAP 0 ppm ANA 0 ppm	1 BAP 0,5 ppm ANA 0,1 ppm	2 BAP 1 ppm ANA 0,1 ppm	3 BAP 1,5 ppm ANA 0,1 ppm
1	1 Contaminado	Sin brote	1 Contaminado	1 Contaminado
2	Sin brote Contaminado	1	1 Contaminado	1
3	1	1 Contaminado	2	2
4	1 Contaminado	2 Contaminado	1	1 Contaminado
5	Sin brote	Sin brote	Sin brote	1 Contaminado
6	1	2	1	2 Contaminado
7	Sin brote	2	2	3
8	1	1	2	2
9	1	1	3	2
10	Sin brote	2	1 Contaminado	1
11	1	1	2	1 Contaminado
12	1 Contaminado	Sin brote	1 Contaminado	2
13	1	1 Contaminado	1	1
14	1	1	1	1 Contaminado
15	1	1 Contaminado	1 Contaminado	1

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

La contaminación encontrada estaba distribuida a lo largo del medio de cultivo, más no en el explante, debido como se mencionó preliminarmente a la mala manipulación de los medios al momento de realizar la siembra de los explantes y deficiencia en el cierre de los envases.

El tipo de contaminación observada tenía un aspecto blanco lechoso característico de las bacterias y de una estructura esponjosa de color blanco, característico de los hongos. (Fotografía 1-3)



Fotografía 1-3. a) Contaminación fúngica. b) Contaminación bacteriana (*P. schizantha*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

A continuación, se presenta una tabla en donde se expone el porcentaje de contaminación en las unidades experimentales.

Tabla 2-3: Número de explantes contaminados en cada tratamiento a los 45 días de evaluación de *P. schizantha*

Repetición	T0	T1	T2	T3
Unidades experimentales contaminadas	4 de 15	4 de 15	5 de 15	6 de 15
Contaminación (%)	26 %	26 %	33 %	40 %

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

3.1.2.1 Explantes que respondieron a los tratamientos

Se evaluaron a los 15, 30 y 45 días, el número y diámetro de los brotes, así como la longitud de las hojas obtenidas, tras los periodos indicados de incubación. Se observa que la mayoría de los explantes respondieron adecuadamente a los medios de cultivo, desarrollando en primer término bulbillos y posteriormente hojas.

Los explantes respondieron de forma apropiada en cada una de las siembras, incluso en las que presentaban contaminación, sin embargo, se aislaron las unidades experimentales por el riesgo de contaminación para las demás siembras.

Para la medición de la longitud de las hojas, las unidades experimentales fueron llevadas a la cabina de flujo laminar, en donde se constató que la repetición 10 del tratamiento 3 (Fotografía 2-3), presentó un mayor desarrollo de su hoja, con una longitud de 12,5 cm, después de los 45 días de siembra.



Fotografía 2-3. Tratamiento 3 repetición 10 a los 45 días de cultivo (*P. schizantha*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

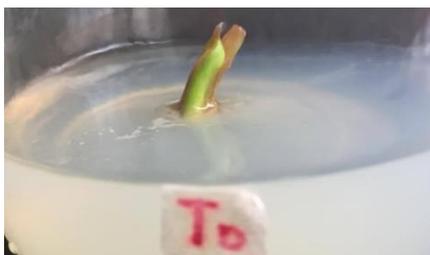
Adicionalmente, se puede indicar que visualmente el tratamiento 3 a concentraciones de 1,5 ppm BAP y 0,1 ppm ANA de reguladores de crecimiento, fue el que mejor desarrollo de hojas y bulbillo presentó, si se compara con el tratamiento 0 (control) que no contenía reguladores de crecimiento, dado que en este caso el desarrollo tanto de hojas y bulbillos resulta mucho menor. (Fotografía 3-3).



Fotografía 3-3. Tratamiento 0 repetición 15 a los 45 días de cultivo (*P. schizantha*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

3.1.2.2 Caracterización morfológica

Mediante observación se pudo determinar que las hojas más largas eran las que provenían del tratamiento 3, de las repeticiones 2, 3, 7, 8, 9, 10 y 13. Mientras que las hojas pequeñas fueron las correspondientes al tratamiento 0, repeticiones 6, 11 y 15. (Fotografía 4-3 y Tabla 3-3)



Fotografía 4-3. Tratamiento 0 repetición 6 a los 45 días de cultivo (*P. schizantha*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Las hojas en el tratamiento 1, fueron pequeñas una longitud aproximada de 3 a 6 cm. En el tratamiento 2 la mayor longitud de hoja fue la repetición 13 con 8,5 cm (Fotografía 5-3).



Fotografía 5-3. Tratamiento 2 repetición 13 a los 45 días de cultivo (*P. schizantha*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

A continuación, se presenta una tabla en la que se muestra la longitud de las hojas en todos los tratamientos, en los que no se verificó contaminaron hasta los 45 días de evaluación

Tabla 3-3: Longitud de las hojas de los bulbillos a los 45 días de evaluación de *P. schizantha*

Número de Repetición	T0 (cm)	T1 (cm)	T2 (cm)	T3 (cm)
1	0	0	0	0
2	0	3	0	9,5
3	5	0	7	11,5
4	0	0	7	0
5	0	0	0	0
6	1	4,5	7,5	0
7	0	3	9	10
8	3	3,5	6	13
9	4	3	6	10
10	0	4,5	0	12,5
11	2	6	7	0
12	0	0	0	8
13	4	0	8,5	9,5
14	3,5	6	8	0
15	3	0	0	7,5

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Además, fue registrado el diámetro de los bulbillos obtenidos a los 45 días, con el objetivo de calcular el diámetro promedio de los bulbillos en cada tratamiento. Según la Tabla 4-3, se puede verificar que el tratamiento que presenta mayor diámetro promedio de los bulbillos (sin contaminación) corresponde al del tratamiento 3. Por otra parte, los bulbillos que presentan menor diámetro promedio son los pertenecientes al tratamiento 0 y 1, con valores de 0.185 cm y 0.213 cm respectivamente, indicando un bajo nivel de respuesta sobre la producción de bulbillos.

Tabla 4-3: Diámetro de los bulbillos asépticos producidos a los 45 días de evaluación de *P. schizantha*

Tratamiento	Total de bulbillos obtenidos	Promedio (cm)
0	8	0,185
1	11	0,213
2	15	0,394
3	15	0,467

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

3.1.3 Ensayo II: *Phaedranassa tunguraguae*

El número de unidades experimentales disminuyeron en este ensayo, por las restricciones de acceso y el tamaño de la muestra vegetal, que únicamente se pudo obtener 40 unidades experimentales, mediante la técnica twin-scale, mismas que fueron repartidas en 10 unidades por cada tratamiento.

El protocolo de desinfección utilizado fue similar al empleado en el Ensayo I, obteniendo porcentajes de contaminación bajos en comparación al Ensayo I. A los 45 días, se visualizaron 3 unidades experimentales contaminadas en el tratamiento 0; 2 en el tratamiento 1 y 1 en el tratamiento 3 y 4. Demostrando que el protocolo de desinfección utilizado fue efectivo (Tabla 5-3).

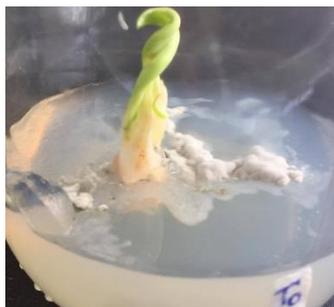
Tabla 5-3: Brotes de los tratamientos a los 45 días de evaluación de *P. tunguraguae*

Tratamientos Repeticiones	0 BAP 0 ppm ANA 0 ppm	1 BAP 0,5 ppm ANA 0,1 ppm	2 BAP 1 ppm ANA 0,1 ppm	3 BAP 1,5 ppm ANA 0,1 ppm
1	1 Contaminación	1	1	2
2	1 Contaminación	2	2	2
3	1 Contaminación	1 Contaminación	1	1
4	Sin brote	1	2	2
5	Sin brote	1	1	2
6	2	1 Contaminación	1 Contaminación	3

7	1	1	1	1
8	1	1	2	2
9	1	2	2	2
10	1	1	2	1
				Contaminación

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

Se obtuvieron en total un número de 7 medios contaminados con la presencia de hongos y bacterias. El tipo de contaminación presentó un aspecto blanco lechoso, característico de las bacterias y esponjoso blanquecino propio de los hongos (Fotografía 6-3).



Fotografía 6-3. Tratamiento 0 repetición 1 a los 45 días de cultivo (*P. tunguraguae*)

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

La Tabla 6-3, describe el número y el porcentaje de unidades contaminadas de la especie *Phaedranassa tunguraguae*.

Tabla 6-3: Número de explantes contaminados en cada tratamiento a los 45 días de evaluación de *P. tunguraguae*

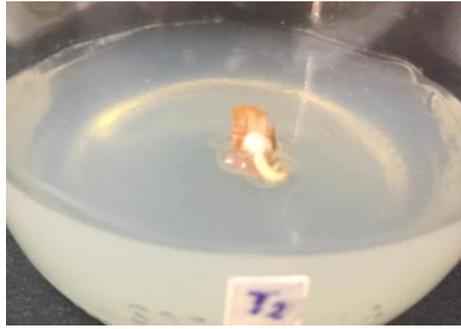
Repetición	T0	T1	T2	T3
Unidades experimentales contaminadas	3 de 10	2 de 10	1 de 10	1 de 10
Contaminación (%)	30 %	20 %	10 %	10 %

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

3.1.3.1 Explantes que respondieron a los tratamientos

Se presenta información de los explantes con una respuesta positiva en los tratamientos. Esta respuesta se manifiesta con el brote de bulbillos y hojas en cada unidad experimental. La evaluación cualitativa se realizó a los 15 30 y 45 días con el propósito de monitorizar la contaminación de microorganismos exógenos en las unidades experimentales.

El desarrollo de uno de los primeros brotes fue observado a los 10 días en el Tratamiento 2 Repetición 3 (Fotografía 7-3). A los 15 días se observó 9 explantes con brotes del total de 40 unidades experimentales. A los 30 días se visualizó hojas y brotes nuevos; presentando así 10 nuevos bulbillos con hojas de longitud mediana de color verde y ancha, característico de la *P. tunguraguae*.



Fotografía 7-3. Tratamiento 2 repetición 3 a los 10 días de cultivo (*P. tunguraguae*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

A los 45 días la repetición 4 y 5 del Tratamiento 0 no presentó brotes (Tabla 5-3), descartando estas unidades experimentales. Además, en el tratamiento 3 repetición 9 se visualizaron 2 hojas, alcanzando una longitud de 5 cm (Fotografía 9-3). Siendo este tratamiento 3, con concentraciones de 1,5 BAP y 0,1 ANA (reguladores de crecimiento) el que mejor respuesta cualitativa denotó en comparación con los demás tratamientos analizados, debido a que sus bulbillos eran notorios al igual que el desarrollo de sus respectivas hojas.



Fotografía 8-3. a) Tratamiento 0 repetición 5. b) Tratamiento 0 repetición 5 (*P. tunguraguae*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.



Fotografía 9-3. Tratamiento 3 repetición 9 a los 45 días de cultivo (*P. tunguraguae*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

3.1.3.2 Caracterización morfológica

A través de la valoración cualitativa, se observa que el tratamiento que presentó mayor longitud de hojas, fue el tratamiento 3, alcanzando una longitud de 11,5 y 11 cm en las repeticiones 2 y 4 respectivamente. Las hojas de menor desarrollo corresponden a la repetición 8 y 10 tratamiento 0 y repetición 3 tratamiento 2 con longitudes de 2,5 cm en el tratamiento 0 y 3 cm en el tratamiento 2. (Tabla 7-3).

Tabla 7-3: Longitud de las hojas asépticas de los bulbillos a los 45 días de evaluación de *P. tunguraguae*

Número de Repetición	T0 (cm)	T1 (cm)	T2 (cm)	T3 (cm)
1	0	8	7	10
2	0	8,5	7,5	11,5
3	0	0	3	6
4	0	6	2,5	11
5	0	4	7	6
6	3	0	0	9
7	5,5	8,5	5,5	7
8	2,5	6,5	5	5,5
9	4	6	5,5	5
10	2,5	6	5,7	0

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017



Fotografía 10-3. Tratamiento 3 repetición 9 con tres hojas a los 45 días (*P. tunguraguae*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

A los 45 días de siembra, se registraron el diámetro y la cantidad de bulbillos producidos por explante, en donde se encontró 6 bulbillos en el Tratamiento 0 con un diámetro promedio de 0,170 cm, siendo este el de menor diámetro desarrollado en la investigación. Los Tratamientos 2 y 3 produjeron los bulbillos de mayor diámetro promedio con valores de 0,394 cm y 0,456 cm respectivamente.



Fotografía 11-3. Tratamiento 2 repetición 10 con diámetro de 0,5 (*P. tunguraguae*)
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

La Tabla 8-3 corresponde a los datos medidos de los diámetros de los bulbillos que no fueron contaminados por microorganismos exógenos.

Tabla 8-3: Diámetro de los bulbillos asépticos producidos a los 45 días de evaluación de *P. tunguraguae*

Tratamiento	Total de bulbillos obtenidos	Promedio (cm)
0	6	0,170
1	10	0,213
2	14	0,394
3	17	0,456

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

3.1.3 Análisis Estadístico

Mediante el Diseño de Componentes Principales, se realizó un análisis multivariado con los siguientes factores: brotes, longitud de hoja, diámetro de los bulbillos y tratamientos estudiados.

Además, a través de los valores de la Prueba de Bartlett y KMO, método de varianza total y comunalidades se comprueba el uso del Diseño de los Componentes Principales.

3.1.3.1 Ensayo I: *Phaedranassa schizantha*

➤ Análisis de diseño de componentes principales a los 45 días de cultivo

Tabla 9-3: Prueba de Bartlett y medida de adecuación muestral de KMO (*P. schizantha*)

KMO y prueba de Bartlett		
Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin.		,664
Prueba de esfericidad de Bartlett	Chi-cuadrado aproximado	188,225
	G1	10
	Sig	,000

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

La medida de adecuación muestral de KMO es de 0,664; misma que indica que la adecuación muestral es correcta, debido a que su valor es mayor a 0,5. La prueba de Bartlett, por otro lado al ser igual a cero permite el desarrollo del Diseño de Componentes Principales (DCP).

Tabla 10-3: Varianza total explicada (*P. schizantha*)

Varianza total explicada									
Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción			Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	2,926	58,526	58,526	2,926	58,526	58,526	2,293	45,869	45,869
2	1,237	24,743	83,269	1,237	24,743	83,269	1,870	37,400	83,269
3	,567	11,347	94,616						
4	,161	3,227	97,843						
5	,108	2,157	100,000						

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

La Tabla 10-3, muestra 2 componentes que caracterizan el comportamiento de la planta, logrando una variación acumulada mayor a 60%.

Tabla 11-3: Comunalidades (*P. schizantha*)

Comunalidades		
	Inicial	Extracción
Factor	1,000	,770
Brotes	1,000	,649
Longitud	1,000	,903
Diámetro	1,000	,919
Contaminación	1,000	,923

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

La Tabla 11-3, arroja valores sobre los 0,4; indicando que las variables se pueden combinar y formar componentes.

Tabla 12-3: Matriz de componentes rotados (*P. schizantha*)

	Componente	
	1	2
Contaminación	,942	-,188
Diámetro	,823	,491
Longitud	,806	,504
Factor		,877
Brotes	,278	,756

La Tabla 12-3, presenta dos componentes siendo el primero contaminación, diámetro y longitud, que se interpreta como: afectación al crecimiento. El segundo componente combina factor y brotes que se interpreta como: desarrollo de brotes. Por lo tanto, en el componente 1 que corresponde a la afectación al crecimiento, indica que la contaminación afecta al diámetro de los bulbillos y a la longitud de las hojas; mientras que en el componente 2 que corresponde al desarrollo de brotes, el factor (tratamientos) influye o afectan al número de brotes.

➤ **Modelo lineal general**

Se realizó un análisis factorial, para saber cómo diversos factores afectan a una variable respuesta (brotes).

Tabla 13-3: Pruebas de los efectos inter-sujetos (*P. schizantha*)

Variable dependiente: brotes					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	25,317 ^a	38	,666	5,996	,000
Intersección	61,691	1	61,691	555,215	,000
Factor	,167	3	,056	,502	,685
Longitud	6,783	14	,485	4,361	,001
Diámetro	1,814	7	,259	2,332	,063
Contaminación	3,803	1	3,803	34,225	,000
Factor * Longitud	,000	0	.	.	.
Factor * Diámetro	,000	0	.	.	.
Factor * Contaminación	,214	2	,107	,964	,398
Longitud * Diámetro	,250	1	,250	2,250	,148
Longitud * Contaminación	,000	0	.	.	.
Diámetro * Contaminación	,000	0	.	.	.
Factor * Longitud * Diámetro	,000	0	.	.	.
Factor * Longitud * Contaminación	,000	0	.	.	.
Factor * Diámetro * Contaminación	,000	0	.	.	.
Longitud * Diámetro * Contaminación	,000	0	.	.	.
Factor * Longitud * Diámetro * Contaminación	,000	0	.	.	.
Error	2,333	21	,111		
Total	107,000	60			
Total corregida	27,650	59			
a. R cuadrado = ,916 (R cuadrado corregida = ,763)					

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

Variable independiente: contaminación

Ho: No existen diferencias en el brote por efecto de la contaminación, $p \geq 0,05$.

Hi: Existen diferencias en el brote por efecto de la contaminación $p < 0,05$

Decisión

Como p es menor a $0,05$ se desecha H_0 por tanto existen diferencias en el brote por efecto de la contaminación.

Variable independiente: Longitud

Ho: No existen diferencias en el brote por efecto de la longitud $p \geq 0,05$.

Hi: Existen diferencias en el brote por efecto de la longitud $p < 0,05$

Decisión

Como p es menor a $0,05$ se desecha H_0 por tanto existen diferencias en el brote por efecto de la longitud.

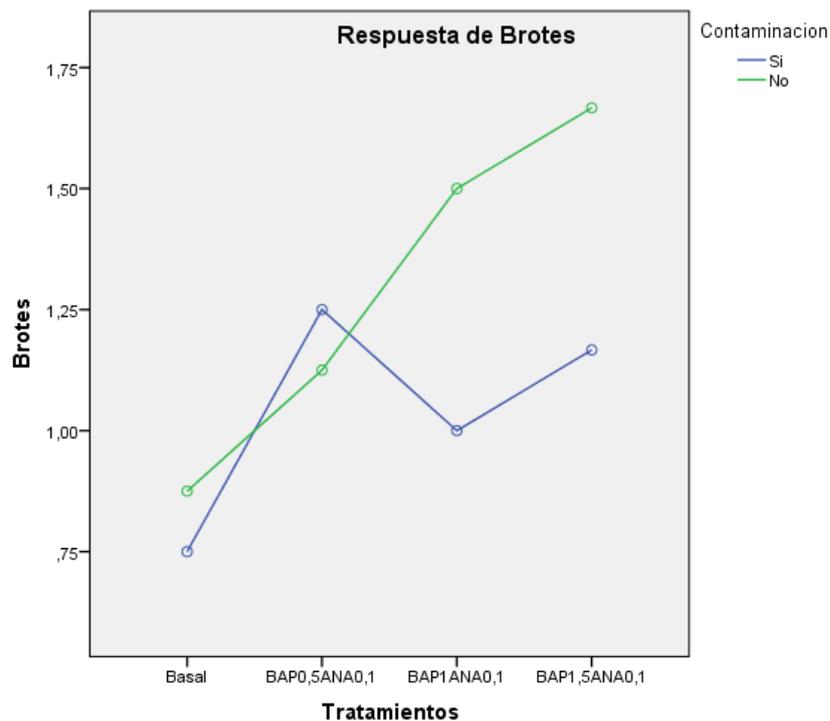


Gráfico 3-3: Respuesta de brotes de *P. schizantha*
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

La línea azul del Grafico 3-3 indica que sí existe contaminación en los tratamientos, esta afecta sobre el número de brotes. Por ende, a menor contaminación, mayor número de brotes. Además, el grafico indica que, en el eje de las x, el tratamiento 3 es el que presenta mayor probabilidad de obtener mayor número de explantes sin presentar contaminación. Este corresponde al tratamiento BAP 1,5 y ANA 0,1.

3.1.3.2 Ensayo II: *Phaedranassa tunguraguae*

➤ Análisis de diseño de componentes principales a los 45 días de cultivo

Tabla 14-3: Prueba de Bartlett y medida de adecuación muestral de KMO (*P. tunguraguae*)

KMO y prueba de Bartlett		
Medida de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin		,691
Prueba de esfericidad de Bartlett	Chi-cuadrado aproximado	110,924
	gl	10
	Sig.	,000

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

La Tabla 14-3, presenta un valor muestral de KMO de 0,691 mayor a 0,5; demostrando que es correcta la adecuación muestral, además la prueba de Bartlett muestra un valor de 0,00 menor a 0,05 resultando adecuado realizar el Diseño de Componentes Principales.

Tabla 15-3: Varianza total explicada (*P. tunguraguae*)

Varianza total explicada						
Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,198	63,964	63,964	3,198	63,964	63,964
2	,918	18,358	82,323			
3	,499	9,986	92,309			
4	,258	5,158	97,467			
5	,127	2,533	100,000			

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Mediante los resultados estadísticos de la varianza total explicada, indica un solo componente que engloba todas las variables en estudio, con un valor de 63,964 mayor a 60%, logrando así una variación acumulada.

Tabla 16-3: Comunalidades (*P. tunguraguae*)

Comunalidades		
	Inicial	Extracción
Factor	1,000	,573
Brotes	1,000	,515
Longitud	1,000	,773
Diámetro	1,000	,852
Contaminación	1,000	,485

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

Según los datos de extracción de la Tabla 16-3, que muestran valores superiores a 0.4, existe potencia de variables para combinar y formar un componente.

Tabla 17-3: Matriz de componentes (*P. tunguraguae*)

	Componente
	1
Factor	,757
Brotes	,718
Longitud	,879
Diámetro	,923
Contaminación	,696
a. 1 componentes extraídos	

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017.

La Tabla 17-3, muestra un solo componente, combinando así el factor (tratamientos), brotes, longitud, diámetro y contaminación, que se interpreta como afectación al crecimiento. En otras palabras, el factor (tratamientos), influye al número de brotes, longitud de las hojas y diámetro de los bulbillos y la contaminación.

A la razón de que solo se ha extraído un solo componente, la solución no puede ser rotada.

➤ Modelo lineal general

Se realizó un análisis factorial, para saber cómo diversos factores afectan a una variable respuesta (brotes).

Tabla 18-3: Pruebas de los efectos inter-sujetos (*P. tunguraguae*)

Variable dependiente: brotes					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	14,100 ^a	33	,427	2,564	,120

Intersección	57,014	1	57,014	342,086	,000
Factor	,250	3	,083	,500	,696
Longitud	4,500	13	,346	2,077	,189
Diámetro	1,167	5	,233	1,400	,343
Contaminación	1,200	1	1,200	7,200	,036
Factor * Longitud	,000	0	.	.	.
Factor * Diámetro	,000	0	.	.	.
Factor * Contaminación	,000	0	.	.	.
Longitud * Diámetro	,000	0	.	.	.
Longitud * Contaminación	,000	0	.	.	.
Diámetro * Contaminación	,000	0	.	.	.
Factor * Longitud * Diámetro	,000	0	.	.	.
Factor * Longitud * Contaminación	,000	0	.	.	.
Factor * Diámetro * Contaminación	,000	0	.	.	.
Longitud * Diámetro * Contaminación	,000	0	.	.	.
Factor * Longitud * Diámetro * Contaminación	,000	0	.	.	.
Error	1,000	6	,167		
Total	88,000	40			
Total corregida	15,100	39			
a. R cuadrado = ,934 (R cuadrado corregida = ,570)					

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

PLANTEAMIENTO DE LA HIPÒTESIS

Variable independiente: contaminación

Ho: No existen diferencias en el brote por efecto de la contaminación, con, con $p \geq 0,05$.

Hi: Existen diferencias en el brote por efecto de la contaminación $p < a 0,05$

Decisión

Como p es menor a 0,05 se desecha Ho por tanto existen diferencias en el brote por efecto de la contaminación.

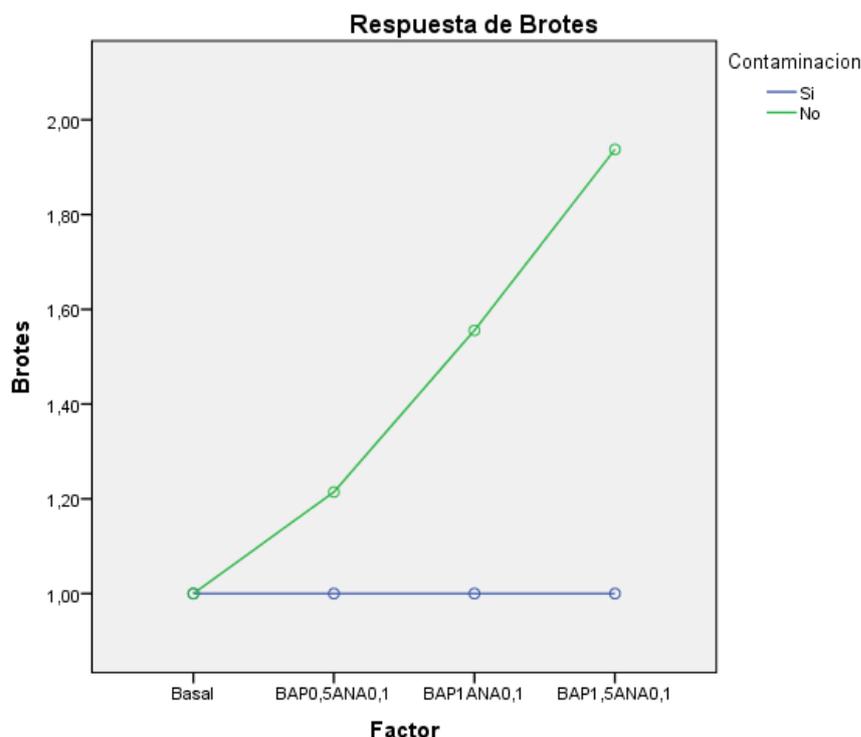


Gráfico 4-3: Respuesta de brotes *P. tunguraguae*

Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y. 2017

El Gráfico 4-3 indica que la contaminación influye directamente sobre los brotes en las unidades experimentales, mencionando que el BAP 1,5 Y ANA 0,1 respondería de mejor manera si no existiese contaminación. Además, que el tratamiento 0 (Control) es el menos apto para el desarrollo de los brotes de *P. tunguraguae*.

3.2 Discusión

3.2.1 Desinfección del material vegetal

De acuerdo a la Tabla 2-3 del Ensayo I, se observa que en el tratamiento 0 y 1 del primer ensayo tienen el 26 % de contaminación en cada uno de ellos, 33 % y 40 % en los tratamientos 2 y 3 respectivamente, siendo bajos los niveles de contaminación en los dos primeros y altos en los dos últimos; sin embargo, como se observa en las fotografías (Fotografía 1-3) la contaminación presente es producto de una mala práctica y una mala destreza en el momento de la siembra de las twin-scale y no exactamente en el proceso de desinfección de los bulbos madres y sus explantes. Esto se puede corroborar con las Tablas 5-3 y 6-3 del Ensayo II en donde se puede observar que se tuvo 2 unidades experimentales contaminadas en los tratamientos 3 y 4. El proceso de desinfección que se utilizó en el Ensayo I (*P. schizantha*) fue el mismo que se utilizó en el Ensayo II (*P. tunguraguae*), demostrando que la desinfección del material vegetal que se utilizó de acuerdo a lo descrito, fue efectivo en estas dos especies con concentraciones

establecidas de soluciones de jabón líquido, Benomyl®, etanol y NaClO + tween® 20, con sus respectivos tiempos de inmersión.

3.2.2 Número de explantes que respondieron

De acuerdo a los datos de la Tabla 12-3 se puede indicar que el factor (tratamientos) influye sobre el número de brotes y que la contaminación afecta sobre la longitud de las hojas y el diámetro de los bulbillos. Demostrando cuantitativamente (Gráfico 3-3) que el tratamiento 3 (BAP 1,5 y ANA 0,1) presenta la mejor combinación aplicable para la introducción en cultivo *in vitro* de la especie *P. schizantha* debido a su mayor número de brotes siempre y cuando no exista contaminación.

De la misma manera en el Ensayo II, se verificó mediante la Tabla 17-3, que el factor (tratamientos) influye en los brotes, longitud de las hojas, diámetro de los bulbillos y contaminación. La contaminación presente según el Gráfico 4-3 retarda el crecimiento de brotes en los tratamientos, y en caso de no existir resulta más efectivo el tratamiento 3 (BAP 1,5 ppm y ANA 0,1 ppm).

3.2.3 Caracterización morfológica

En esta sección se analizan la longitud de la hoja y el diámetro de los bulbillos producidos. Las hojas que presentaron mayor longitud en el Ensayo I y Ensayo II fueron las del tratamiento 3. Obteniendo hojas de hasta 12,5 cm (Tabla 3-3) y 11,5 cm (Tabla 7-3) para ambos ensayos. Los citados tratamientos presentaban las más altas concentraciones de BAP 1,5 ppm y 0,1 ppm ANA, demostrando de esta manera que las auxinas y citoquininas son hormonas que ayudan al crecimiento óptimo de las especies vegetales y a estas concentraciones son más efectivas en estas especies.

El tratamiento control (T0) es el que denota menor longitud de hojas con tamaños de 1 y 3 cm a los 45 días de evaluación, tiempo necesario para la verificación de la eficiencia del tratamiento en la etapa I para su posterior multiplicación y masificación *in vitro*.

Se debe indicar que el tamaño de las hojas está relacionado directamente con el diámetro de los bulbillos, por esta razón, en los valores del diámetro promedio en los Ensayos I y II fueron de 0,467 cm y 0,456 cm respectivamente, siendo los más altos valores en los estudios.

CONCLUSIONES

- Se identificaron 9 y 7 puntos accesibles de *P. schizantha* y *P. tunguraguae* respectivamente, en el cantón Riobamba y cantón Baños. Muestreando una cantidad de dos especies vegetales para nuestro estudio, de las cuales, *P. tunguraguae* es la que se encuentra en peores condiciones debido al pastoreo y destrucción de su hábitat. De acuerdo al número de plantas por puntos, se determina que *P. schizantha* posee mayor número de densidad de individuos (5-6) por puntos en comparación de *P. tunguraguae* que exhibe de 1 a 2 plantas por punto.
- El tratamiento de desinfección empleado, para la obtención de explantes libres de contaminantes exógenos, resulta efectivo para los tratamientos empleados en las dos especies, obteniendo un nivel bajo de contaminación exógena en los explantes, con el siguiente tratamiento: jabón líquido (10%-5 minutos), Benomy1® (1 g/L-20 minutos), Etanol (70%-1 minuto) y NaClO (3%-60 minutos) + 4 gotas de tween® 20.
- La respuesta óptima de los explantes de las especies *P. schizantha* y *P. tunguraguae* se determinó por el número de brotes, la contaminación, la longitud de hojas y diámetro de los bulbillos. Cuantitativamente, las concentraciones de hormonas vegetales de los tratamientos influyen sobre el desarrollo del explante. Sin embargo, a través de un análisis factorial se concluye que hay diferencias en el brote por efecto de la contaminación, siendo un indicador de que a menor contaminación mayor número de brotes en los tratamientos. El tratamiento que mejor respuesta exhibe corresponde al que consta de 1,5 ppm BAP y 0,1 ppm ANA (tratamiento 3) para las dos especies estudiadas. Sin embargo el tratamiento 2 responde también de manera positiva. El tratamiento 0 y 1 no es recomendable puesto que no presentan un porcentaje significativo en el crecimiento y desarrollo de bulbillos y hojas en las unidades experimentales.

RECOMENDACIONES

- Si al momento de aplicar esta metodología se utiliza plástico para sellar los medios de cultivo, se recomienda colocar más de dos capas de plástico y envolver desde la parte superior hasta la mitad del frasco. O si se usa otro material, como parafilm/tapas, esterilizar con luz UV 1 hora antes del sellado.

- Implementar un laboratorio de biotecnología vegetal que preste las condiciones y equipamiento adecuado para este tipo de investigaciones en la Facultad de Ciencias, en el que conste tres cuartos destinados de la siguiente manera: 1) Cuarto para el almacenamiento/cambio de ropa adecuada; 2) Cuarto para la preparación, limpieza y almacenamiento de medios de cultivo. 3) Cuarto de siembra, que conste una cámara de flujo laminar; y 4) Cuarto para la disposición de los medios sembrados con sus respectivas repisas que contengan lámparas fluorescentes con condiciones controladas de: Temperatura ($\pm 26^\circ \text{C}$), Humedad ($\pm 60\%$), Fotoperiodo de (16/8 horas luz-oscuridad) o idealmente cámaras climáticas.

- Para la obtención de explantes más inocuos dentro del proceso de desinfección se puede usar otros tiempos de inmersión de las soluciones utilizadas. Además, que para el proceso de multiplicación y masificación utilizar otras concentraciones de ANA o el ácido indolacético (AIA), puesto que son los reguladores de crecimiento que más se usan para el enraizamiento.

- Se recomienda continuar con la investigación, es decir con la siguiente etapa que es la Micropropagación, para evitar así, la extinción completa de las especies endémicas en estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- AUGE, R; et al.** *Cultio in vitro*. 1. México D.F. – México: Editorial Científica, S.A. de C.V, 1986, pp 4-88.
- BACH, Ana; & SOCHAKI, Dariusz.** *Propagation of Ornamental Geophytes: Physiology and Management Systems* [en línea]. New York – USA: CRC Press, 2012. [Consulta: 03 febrero 2017]. Disponible en: <http://www.crcnetbase.com/doi/pdfplus/10.1201/b12881-11>
- BHOJWANI, Sant; & DANTU, Prem.** *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* [en línea]. Springer. India – Agra. [Consulta: 07 febrero 2017]. Disponible en: <http://www.springer.com/us/book/9788132210252>
- CASTELLANOS, M.** “Extinción. Causas y efectos sobre la diversidad biológica”. *Revista Luna Azul* [en línea], 2006, (Colombia) 23, pp. 33-37. [Consulta: 12 Marzo 2017]. ISSN 1909-2474. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/3217/321727225007.pdf>
- CHERUVATHUR, Meena K; JYOTHI Abraham, T Dennis.** “In vitro micropropagation and flowering in *Ipomoea sepiaria* Roxb. An important ethanomedicinal plant”. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, [en línea], 2015, (India) 4(1), pp. 49-53. [Consulta: 20 octubre 2016]. ISSN 2305-0500. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2305050014600580>.
- COSSIO, Leandro.** *Reguladores de crecimiento* [en línea]. Lugar: Corriente – Argentina. [Consulta: 05 de febrero 2017]. Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Reguladores%20de%20Crecimiento%20en%20las%20plantas.pdf>
- ESTRELLA, Rodrigo.** *Biología & Ecología*. 2ª Ed. Quito-Ecuador: Radmaní, 2003, pp. 67-68.
- La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).** *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. [en línea]. Soil and Water Conservation in Latin America and the Caribbean. [Consulta: 31 octubre 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/americas/perspectivas/suelo-agua/en/>

- The International Union for Conservation of Nature (IUCN).** [en línea]. Red List of Threatened Species. [Consulta: 23 octubre 2016]. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/>.
- JORDAN, Miguel; & CASARETTO, José.** *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas* [en línea]. La Serena – Chile: F.A. Squeo & L. Cardemil, 2006. [Consulta: 03 febrero 2017]. Disponible en: www.biouls.cl/librofv/web/pdf_word/Capitulo%2015.pdf
- LOBERANT Beth; ALTMAN Arie.** *Micropropagation of plants*. [en línea]. Israel: Michael C. Flickinger, 2010. [Consulta: 21 octubre 2016]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470054581>
- MOK, David; & MOK, Machteld.** “Cytokinin Metabolism and Action”. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* [en línea], 2001, Estados Unidos, pp. 89 – 108. [Consulta: 05 febrero 2017]. Disponible en: http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/07_Mok_2001%20cytokinins.pdf
- NAIR, J.; VAN STADEN, J.** “Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae”. *ELSEVIER* [en línea], 2013, 62(01), pp. 262-275. [Consulta: 12 Febrero 2017]. ISSN 0278-6915. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513005887>
- OLEAS, N.** “Actualización del Estado de Conservación de la Ashpa Cebolla (*Phaedranassa schizantha*), una Especie Endémica de la Sierra Central del Ecuador”. *Cienciamerica* [en línea], 2012, (Ecuador) 1(03), pp. 18-25. [Consulta: 20 Enero 2017]. ISSN 1390-9592. Disponible en: <http://www.uti.edu.ec/documents/investigacion/volumen1/03Oleas.pdf>
- OLEAS, N., MEEROW, A.W. y FRANCISCO-ORTEGA, J.,** 2016. “Genetic structure of the threatened *Phaedranassa schizantha* (Amaryllidaceae)”. *Botanical Journal of the Linnean Society* [en línea], 2016, 182(01), pp. 169-179. [Consulta: 21 Marzo 2017]. ISSN 00244074. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/boj.12444/full>
- OLEAS, N., MEEROW, A.W. y FRANCISCO-ORTEGA, J.,** 2012. “Population Dynamics of the Endangered Plant, *Phaedranassa tunguraguae*, from the Tropical Andean Hotspot”. *Journal of Heredity* [en línea], 2012, 103(04), pp. 557-569. [Consulta: 22 Marzo 2017].

ISSN 00221503. Disponible en:
<https://academic.oup.com/jhered/article/103/4/557/1026264/Population-Dynamics-of-the-Endangered-Plant>

OLMOS, Sofía; et al. *Métodos de propagación y conservación de germoplasma* [en línea]. Argentina. [Consulta: 07 febrero 2017]. Disponible en:
http://www.argenbio.org/adc/uploads/Libro_INTA_II/Parte_IV.pdf

PACIFIC BULB SOCIETY. *Phaedranassa* [en línea]. Spring: 2016. [Consulta: 1 noviembre 2016]. Disponible en: <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/Phaedranassa>

ROCA, William; & MROGINSKI, Luis. Cultivo de Tejidos en la Agricultura [en línea]. Cali – Colombia: CIAT, 1991. [Consulta: 03 febrero 2017]. Disponible en:
<https://books.google.com.ec/books?isbn=9589183158>

ROJAS, Salvador; et al. *Propagación Asexual de Plantas* [en línea]. Colombia – Caqueta, 2004. [Consulta: 08 febrero 2017]. Disponible en:
<http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/handle/11348/4167>

SEGRETIN, María. *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II* [en línea]. ArgenBio. [Consulta: 20 octubre 2016]. Disponible en:
<http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>

SECRETARÍA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO. (SENPLADES). [en línea]. Plan Nacional Vivir 2013-2017. Ecuador: 2017. [Consulta: 2 noviembre 2016]. Disponible en: <http://www.buenvivir.gob.ec/objetivos-nacionales-para-el-buen-vivir>

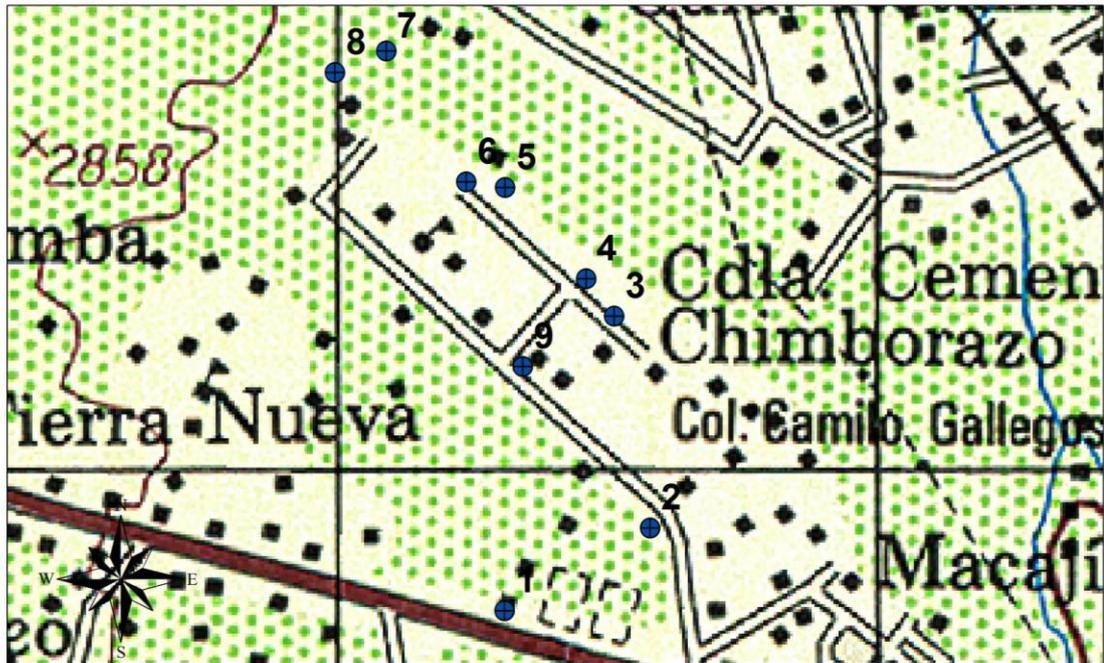
SMITH, Roberta. “Plant Tissue Culture Techniques and Experiments”. *Elsevier* [en línea], 2012, Estados Unidos, pp. 1-187. [Consulta: 07 febrero 2017]. Disponible en:
<https://biot202.files.wordpress.com/2015/09/plant-tissue-culture-third-edition-techniques-and-experiments-by-roberta-h-smith.pdf>

VALENCIA, R., PITMAN, N., LEÓN-YÁNEZ, S. & JØRGENSEN, P.M. *Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador 2000*. Quito-Ecuador: Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 200, pp. 5-6; 15-16.

ANEXOS

ANEXO A: UBICACIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

Localización de las poblaciones de la especie *Phaedranassa schizantha*



Legend

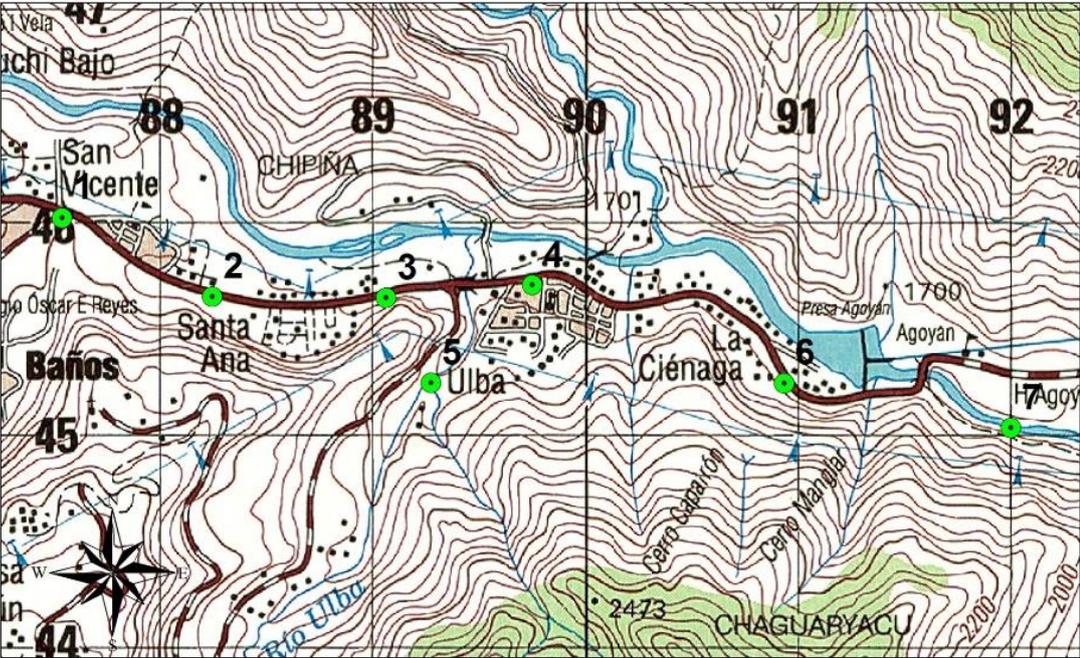
● *Phaedranassa schizantha*



Fuente: Cartografía Base IGM
Coordenadas: UTM WGS 1984 Zona 17S
Escala: 1:3000
Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y.
Fecha de Realización: 28-03-2017

Gráfico 1A: Ubicación de la especie vegetal *Phaedranassa schizantha*

Localización de las poblaciones de la especie *Phaedranassa tunguraguae*



Legend
 ● *Phaedranassa tunguraguae*



Fuente: Cartografía Base IGM
 Coordenadas: UTM WGS 1984 Zona 17S
 Escala: 1:3000
 Realizado por: Paola J, Soto P; Paúl R, Yuquilema Y.
 Fecha de Realización: 28-03-2017

Gráfico 2A: Ubicación de la especie vegetal *Phaedranassa tunguraguae*

ANEXO B: PROCEDIMIENTO GENERAL



Fotografía 1B: Hábitat de la especie *P. schizantha*



Fotografía 2B: *Phaedranassa schizantha*



Fotografía 3B: *Phaedranassa tunguraguae*



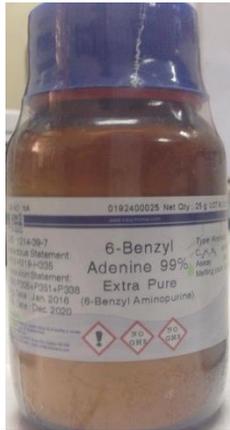
Fotografía 4B: Hábitat de la especie *P. tunguraguae*



Fotografía 5B: Toma de la muestra



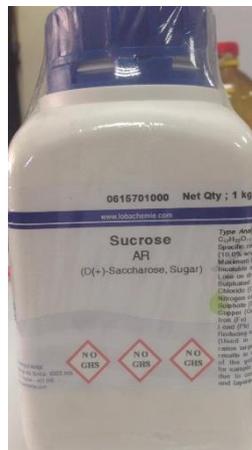
Fotografía 6B: Lavado de la muestra vegetal a utilizarse (*P. schizantha* y *P. tunguraguae*)



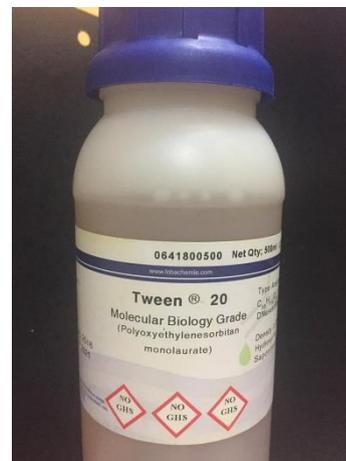
Fotografía 7B: BAP Y ANA MARCA LOBACHEMIE



Fotografía 8B: Fúngicida - Benomyl® 50 PM (g/kg)



Fotografía 9B: Medio Murashige & Skoog y Sacarosa MARCA PHYTO TECH



Fotografía 10B: Tween® 20 MARCA LOBACHEMIE



Fotografía 11B: Área de pesaje para preparación de medios de cultivo



Fotografía 12B: Corte del bulbo previa desinfección



Fotografía 13B: Cortes de explantes mediante la técnica twin-scale



Fotografía 14B: Unidades experimentales sembradas



Fotografía 15B: Unidades experimentales en el cuarto de incubación (*P. schizantha*)



Fotografía 16B: Unidades experimentales en el cuarto de incubación (*P. tunguraguae*)



Fotografía 17B: Tratamiento 0 repetición a los 30 días de siembra de *P. tunguraguae*



Fotografía 18B: Tratamiento 3 repetición 5 a los 45 días de siembra de *P. tunguraguae*

	
<p>Fotografía 19B: Tratamiento dos con bulbillo y hojas brotadas de <i>P. tunguraguae</i></p>	<p>Fotografía 20B: Tratamiento 1 con hoja formada de <i>P. tunguraguae</i></p>
	
<p>Fotografía 21B: Tratamiento 0 repetición a los 45 días de siembra de <i>P. schizantha</i></p>	<p>Fotografía 22B: Tratamiento 1 repetición a los 45 días de siembra de <i>P. schizantha</i></p>
	
<p>Fotografía 23B: Bulbillo y hojas brotadas en el Tratamiento 2 de la especie <i>P. schizantha</i></p>	<p>Fotografía 24B: Hoja con mayor longitud en el Tratamiento 3 de la especies <i>P. schizantha</i></p>



Fotografía 25B: Siembras a los 45 días de siembra de *P. schizantha* y *P. tunguraguae*



Fotografía 26B: Bulbillos brotados



Fotografía 27B: Siembras contaminadas



Fotografía 28B: Invasión de contaminación en el explante

ANEXO C: PERMISOS OTORGADOS POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE



AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTIFICA

Nro. 009 IC-DPACH-MAE-2016
Riobamba, 25 de octubre del 2016

FLORA SILVESTRE X

FAUNA

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a: Paúl Rolando Yuquilema Yupangui de nacionalidad ecuatoriana, CC: 0603867292 para llevar a cabo la investigación "Establecimiento de un protocolo para la introducción en cultivo *in vitro* de la especie endémica *Phaedranassa schizanta* en peligro de extinción".

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

6. Solicitud de Paúl Rolando Yuquilema Yupangui, con respaldo del Dr. Ángel Silva, Director de la Escuela de Ciencias Químicas de la ESPOCH
7. Valoración Técnica del Proyecto: Mvz. María Dolores Astudillo Vallejo
8. Contraparte de la Dirección Provincial del Ambiente de Chimborazo, Mvz. María Dolores Astudillo Vallejo
9. Se autoriza la colección de especímenes de flora silvestre según lo indicado en el proyecto: 2 muestras de material vegetal que serán destinadas de la siguiente manera:
1 muestra para almacenamiento en el herbario de la ESPOCH
1 muestra de 1kg para la investigación, en el Laboratorio de tejidos del centro Bioforestal de la ESPOCH.
10. Vigencia de esta Autorización: 25/10/2016/ al 25/04/2017

Obligaciones del investigador:

1. Entregar dos copias en formato impreso y digital (formato PDF) de los resultados finales de la investigación en español.
2. La autorización es válida para el sitio especificado en el proyecto cuyas coordenadas indicadas y citadas son X:757790 Y:9817297
3. Entregar el acta original del material colectado y de entrega al Herbario de la ESPOCH, Número de patente: 001-2016, indicado en el proyecto aprobado, debidamente suscrita por el administrador del mismo; en el que conste en detalle el listado de material entregado.
4. El Investigador se compromete entregar al Ministerio del Ambiente el registro de las especies objeto de su investigación, en formato digital, incluyendo la localización exacta de los especímenes observados o colectados, con las coordenadas UTM WGS 1984, y otra información según formato de la base de datos del Ministerio del Ambiente.
5. Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el numeral anterior se responsabiliza a: Paúl Rolando Yuquilema Yupangui CC: 0603867292
6. Cumplir con los plazos de entrega de informes finales hasta el 25 de abril de 2017


Ing. Marcelo Pino Cáceres

DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO (E)



Gráfico 1C: Permiso de investigación otorgado por el MAE para la especie *P. schizantha*

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE TUNGURAHUA



AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTÍFICA

Nº 05 – 2016- IC- FLO-DPAT-VS

FLORA X

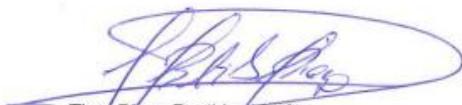
FAUNA

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere La Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a: **Srta. Paola Jakeline Soto Páramo**, con cédula de identidad No 0605183094, nacionalidad Ecuatoriana para que lleve a cabo la investigación sobre "ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO ÓPTIMO PARA LA INTRODUCCIÓN EN CULTIVO IN VITRO DE LA ESPECIE ENDEÉMICA (*Phaedranassa tunguraguae*), EN PELIGRO DE EXTINCIÓN".

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de: Srta. Paola Jakeline Soto Páramo.
2. Valoración técnica del proyecto: Lcdo. Edwin Lozada – Encargado de Vida Silvestre de la Unidad de Patrimonio Natural de Tungurahua.
3. Auspicio de Institución Científica Extranjera: Ninguna
4. Auspicio de Institución Científica Nacional: Ninguna
5. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Lcdo. Edwin Lozada, Encargado de Vida Silvestre Tungurahua y el Ing. Willian Quinatoa, Coordinador de Patrimonio Natural Tungurahua.
6. Complementos Autorizados de la Investigación: Identificación, Colección Especímenes de flora silvestre para cultivo invitro.
7. Duración: desde el 01 de noviembre del 2016 al 31 de marzo del 2017.
8. Obligaciones del Investigador (S):
ENTREGAR 2 (DOS) COPIAS DEL INFORME FINAL: 1 (UNA) COPIA A LA DIRECCIÓN NACIONAL DE BIODIVERSIDAD, 1 (UNA) COPIA A CADA UNA LAS DIRECCIONES PROVINCIALES DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN, EN ESPAÑOL, IMPRESO Y DIGITAL EN FORMATO PDF; ENTREGAR LA LOCALIZACIÓN EXACTA DE LOS ESPECÍMENES COLECTADOS U OBSERVADOS EN BASE AL FORMATO ESTABLECIDO POR EL MAE, UNA COPIA DE LAS FOTOGRAFÍAS QUE FORMEN PARTE DE LA INVESTIGACIÓN EN FORMATO DIGITAL AL MINISTERIO DEL AMBIENTE Y CUMPLIR CON TODOS LOS REQUERIMIENTOS ESTABLECIDOS SEGÚN NUMERALES EN LA PARTE POSTERIOR DE ESTA AUTORIZACIÓN.
9. **EL PLAZO DE ENTREGA DEL INFORME FINAL AL MINISTERIO DEL AMBIENTE VENCE: 31 de marzo del 2017.**
10. **DEL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES DISPUESTAS EN EL PÁRRAFO ANTERIOR SE RESPONSABILIZA A:** Dr. Ángel Silva D. en calidad de Director de la Escuela de Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a la Señorita Srta. Paola Jakeline Soto Páramo.

Ambato, 31 de octubre del 2016


Tlgo. Diego Bastidas Yazán
COORDINADOR GENERAL ZONAL-ZONA 3
(TUNGURAHUA, PASTAZA, COTOPAXI Y CHIMBORAZO)-
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE TUNGURAHUA

cc: Coordinador de Patrimonio Natural Tungurahua

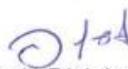

Lcdo. Edwin Lozada
UNIDAD DE PATRIMONIO NATURAL-VIDA SILVESTRE
TUNGURAHUA



Gráfico 2C: Permiso de investigación otorgado por el MAE para la especie *P. tunguraguae*

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE TUNGURAHUA

UNIDAD DE PATRIMONIO NATURAL- VIDA SILVESTRE

ACTA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE VIDA SILVESTRE No. 06-2017-DPAT-V.S

En la ciudad de Ambato, a los 05 ... días del mes de ...abril... de 2017, el Señor Alex Aguirre VIDA SILVESTRE- UNIDAD DE PATRIMONIO NATURAL EN TUNGURAHUA, autoriza al Señor (a) : Paola Jakeline Soto Páramo para que realice la movilización de los elementos de vida silvestre, de acuerdo al siguiente detalle:

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	NÚMERO	SEXO	OBSERVACIONES
Muestras botánicas de la familia Amaryllidaceae	<i>Phaedranassa tunguraguae</i>	2	-	Las muestras botánicas del género <i>Phaedranassa tunguraguae</i> movilizadas como parte de la autorización de investigación científica N° 05-2016-IC-FLO-DPAT-V.S., denominado "ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO ÓPTIMO PARA LA INTRODUCCIÓN EN CULTIVO IN VITRO DE LA ESPECIE ENDÉMICA (<i>Phaedranassa tunguraguae</i>), EN PELIGRO DE EXTINCIÓN".
TOTAL		2		

Los especímenes de fauna silvestre se moviliza en calidad de:

Custodia temporal () Trabajo investigativo (X)
 Comercio ()
 Taxidermia ()

Se moviliza desde...Cantón Baños, Provincia de Tungurahua

Hasta.....Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, provincia de Chimborazo

Fecha de movilización.....Miércoles 05 de abril de 2017.....

Vehículo, Marca : Bus de Transporte público Cooperativa de Transportes Riobamba placas

Portador : Paola Jakeline Soto Páramo Cédula: 0605183094 de Nacionalidad Ecuatoriana


 Alex Aguirre
 VIDA SILVESTRE TUNGURAHUA




 Paola Jakeline Soto Páramo,
 RECIBO CONFORME

Gráfico 3C: Acta de movilización de la especie *P. tunguraguae*

ANEXO D: CÁLCULOS DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO

ENSAYO I: *Phaedranassa schizantha*

ENSAYO II: *Phaedranassa tunguraguae*

BAP

Tratamiento 1

$$\begin{aligned} 1000 \text{ mL} &\rightarrow 0.5 \text{ mg} \\ 625 \text{ mL} &\rightarrow x = \mathbf{0.31 \text{ mg}} / 625 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 50 / 100 \\ 50 \text{ mg} &\rightarrow 100 \text{ mL} \\ 0.31 \text{ mg} &\rightarrow x = \mathbf{0.62 \text{ mL}} \text{ (volumen a retirar)} \end{aligned}$$

Tratamiento 2

$$\begin{aligned} 1000 \text{ mL} &\rightarrow 1 \text{ mg} \\ 625 \text{ mL} &\rightarrow x = \mathbf{0.62 \text{ mg}} / 625 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 50 / 100 \\ 50 \text{ mg} &\rightarrow 100 \text{ mL} \\ 0.62 \text{ mg} &\rightarrow x = \mathbf{1.24 \text{ mL}} \text{ (volumen a retirar)} \end{aligned}$$

Tratamiento 3

$$\begin{aligned} 1000 \text{ mL} &\rightarrow 1.5 \text{ mg} \\ 625 \text{ mL} &\rightarrow x = \mathbf{0.93 \text{ mg}} / 625 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 50 / 100 \\ 50 \text{ mg} &\rightarrow 100 \text{ mL} \\ 0.93 \text{ mg} &\rightarrow x = \mathbf{1.86 \text{ mL}} \text{ (volumen a retirar)} \end{aligned}$$

-ANA

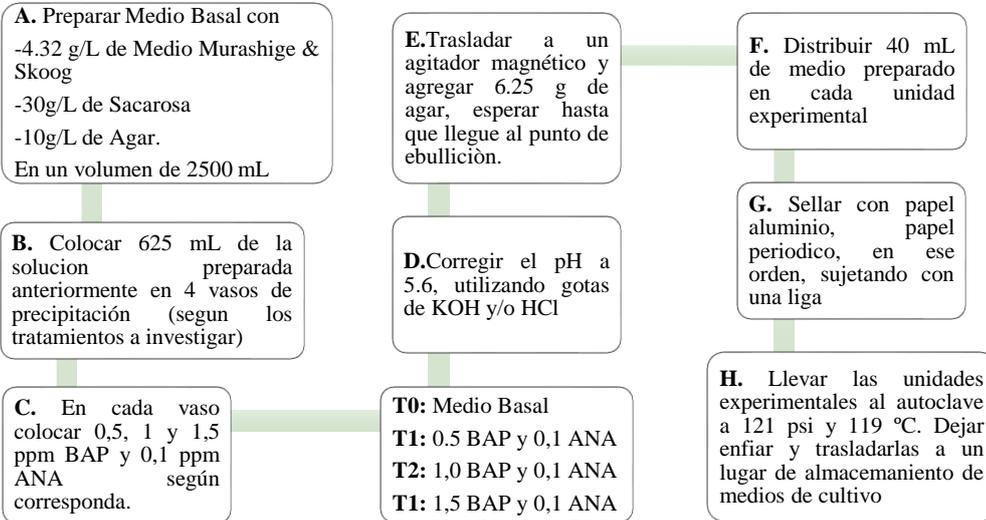
Tratamiento 1, 2 y 3

$$\begin{aligned} 1000 \text{ mL} &\rightarrow 0.1 \text{ mg} \\ 625 \text{ mL} &\rightarrow x = \mathbf{0.06 \text{ mg}} / 625 \text{ mL} \end{aligned}$$

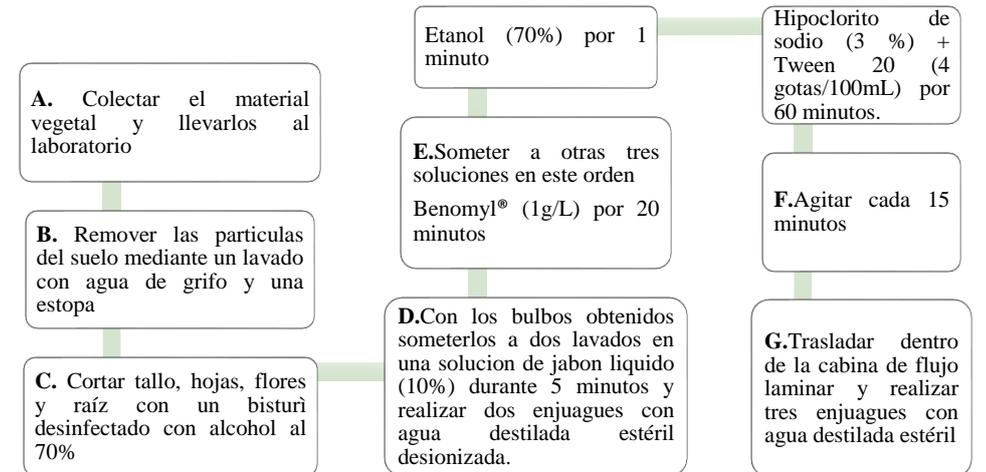
$$\begin{aligned} 50 / 100 \\ 50 \text{ mg} &\rightarrow 100 \text{ mL} \\ 0.06 \text{ mg} &\rightarrow x = \mathbf{0.12 \text{ mL}} \text{ (volumen a retirar)} \end{aligned}$$

ANEXO E: PROTOCOLO ÓPTIMO PARA LA INTRODUCCIÓN EN CULTIVO IN VITRO DE LAS ESPECIES ENDEMICAS: *Phaedranassa schizantha* y *Phaedranassa tunguraguae*, EN PELIGRO DE EXTINCIÓN”

➤ **Preparación de medios**



➤ **Desinfección**



➤ **Siembra**

