



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE.

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

“APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO “*in vitro*” EN LA MICRO-
PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE *Humiriastrum procerum* (LITTLE)
CUATR. (CHANUL)”



DIRECTOR: ING. WALTER PALACIOS

AUTOR: DIEGO PANAMÁ

INTRODUCCIÓN

Los bosques húmedos tropicales son zonas con la mayor biodiversidad del mundo.



OBJETIVOS

Objetivo general.

Establecer metodologías para la micropropagación de *Humiriastrum procerum* mediante el empleo de explantes.

Objetivos específicos.

- Determinar la mejor fuente de explante, formas de colecta y traslado.
- Definir métodos de desinfección adecuados.
- Identificar qué medio de cultivo (pre-germinativo) brinda los mejores resultados.
- Obtención de vitro plantas.

HIPÓTESIS

Ho: Es posible obtener resultados similares mediante la aplicación de cultivo "*in vitro*" con el empleo de diferente material vegetativo, además de medios de cultivos.

Hi: Es posible obtener resultados que difieran mediante la aplicación de cultivo "*in vitro*" con el empleo de diferente material vegetativo, además de medios de cultivos.



Explantos de yemas



Explantos de meristemas



Explantos de hojas

Descripción del sitio

El estudio se realizó en dos fases:

La primera fase se realizó en La parroquia de Timbiré que se encuentra al norte del país pertenece a la Provincia de Esmeraldas, Cantón Eloy Alfaro.



La segunda fase se lo realizó en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Técnica del Norte, ubicado en la ciudadela universitaria en la Avenida 17 de Julio y General José María Córdova en la cabecera cantonal de Ibarra.



A close-up photograph of a person in a laboratory setting. The person is wearing a white lab coat, a white surgical mask covering their nose and mouth, and a white hairnet. They are looking down intently at a pair of tweezers held in their right hand. The background is slightly blurred, showing laboratory equipment like a beaker and a bottle. The overall lighting is bright and clinical.

DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

METODOLOGÍA

UBICACIÓN DEL LUGAR DE PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETATIVO: PROVINCIA ESMERALDA, PARROQUIA DE TIMBIRÉ.



Traslado de Imbabura a Esmeraldas



Cruce en canoa al reconocimiento del lugar de recolección



Reconocimiento del área de recolección del material vegetativo.

SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETATIVO

La selección del material vegetativo: yemas, meristemas y hojas se colectó el mismo sin fenolización, rayones, manchas, suciedad.



Material vegetativo, con alto grado de fenolización.



Material vegetativo libre de manchas, rayones, en buenas condiciones, sin fenolización.



Material vegetativo en buenas condiciones, hojas sanas, vigorosas de color verde intenso.

TRASLADO DEL MATERIAL VEGETATIVO (TRL)

Para el traslado del material vegetativo yemas y meristemas se emplearon cuatro tratamientos:

TRL1=Envuelto con papel periódico.

TRL2=Envuelto con papel periódico más cisteína (25 mg/l^{-1}).

TRL3=Envuelto con papel periódico más cisteína (25 mg/l^{-1}) y dentro del contenedor cooler.

TRL4=Envuelto con papel periódico más Benomilo (2 g/l^{-1}) y dentro del contenedor cooler.



Preparación del material vegetativo



Aplicación de cisteína al material vegetativo



Material en paquetes listos para transportar

El material vegetativo fue lavado con agua de la llave para eliminar las suciedades, las ramas se seccionaron a un tamaño de 30 cm cada una de las muestras contenía de 10-15 yemas. Los paquetes se formaron con 25-30 ramas.

TRASLADO DEL MATERIAL VEGETATIVO DE HOJAS

El material vegetativo fue lavado con agua de la llave, posteriormente se adicionó cisteína (25 mg/l^{-1}) y se hicieron paquetes que se colocaron en el cooler listos para transportar.



Preparación del material vegetativo

Cada paquete contenía de 35 – 40 hojas, estas fueron cortadas con una sección de tallo.

MÉTODOS DE DESINFECCIÓN EN EL LABORATORIO

El material transportado del campo hacia el laboratorio: las yemas, meristemas y hojas, fueron lavadas tres veces con agua destilada, detergente común y 3 - 4 gotas de tween 20.



Lavado de las hojas



Lavado de las yemas – meristemas

DESINFECCIÓN DE YEMAS Y MERISTEMAS (TD)

- TD₁= NaClO al 20% 10 min
- TD₂= NaClO al 20% 20 min
- TD₃=Kasumin 2% 20 min
- TD₄=Benomilo 1% 20 min
- TD₅=Kasumin 2% + Benomilo 1% + 40 min al vacío
- TD₆=Kasumin 2% 40 min al vacío
- TD₇=Benomilo 1% 40 min al vacío
- TD₈₋₉₋₁₀=NaClO al 20% , 20 minutos + HgCl₂ (25 mg/l⁻¹) + 40 minutos al vacío (traslado con Benonilo y sin aplicación del mismo)



Desinfección con NaClO



Desinfección con Kasumin



Desinfección con Benomilo



Desinfección con HgCl₂,
Kasumin mas al vacío

DESINFECCIÓN DE HOJAS (TDH)

- TDH₁=NaClO al 20% , 20 min
- TDH₂=NaClO al 20% , 30 min
- TDH₃=Benomilo al 1% 20 min +NaClO 20% ,20 min
- TDH₄=NaClO al 20% , 30 min + alcohol al 70%, 1min



Desinfección con Benomilo



Desinfección con NaClO



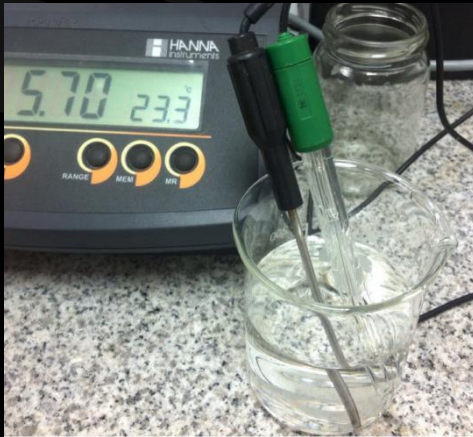
Desinfección con alcohol

MEDIO DE CULTIVO PARA YEMAS

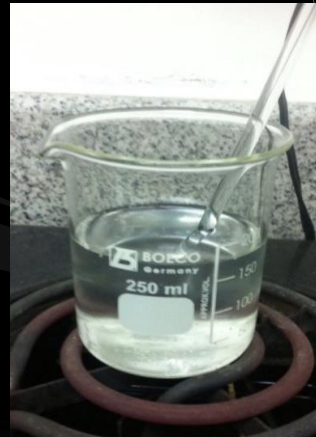
El medio que se utilizó para las yemas fue el Murashige Skoog (1962)



Soluciones madres para la preparación de los medios



Medición de pH del medio



Disolución del agar en el medio



Esterilización de los medios en el autoclave



Medios listos para la siembra

MEDIO DE CULTIVO PARA MERISTEMAS (MM)

El medio de cultivo que se utilizó fue el Murashige Skoog (1962) adicionado los siguientes reguladores de crecimiento ácido indolacético, kinetina, ácido giberélico en diferentes dosis.

AIA =1,5 mg/l⁻¹

Kin=0,5 mg/l⁻¹, **1,5** mg/l⁻¹

AG3=0,5 mg/l⁻¹, **1.0** mg/l⁻¹, **1,5** mg/l⁻¹

- MM1=**AIA** (1,5 mg/l⁻¹), **Kin** (0,5 mg/l⁻¹), **AG3** (0,5 mg/l⁻¹)
- MM2=**AIA** (1,5 mg/l⁻¹), **Kin** (0,5 mg/l⁻¹), **AG3** (1,0 mg/l⁻¹)
- MM3=**AIA** (1,5 mg/l⁻¹), **Kin** (0,5 mg/l⁻¹), **AG3** (1,5 mg/l⁻¹)
- MM4=**AIA** (1,5 mg/l⁻¹), **Kin** (1,5 mg/l⁻¹), **AG3** (0,5 mg/l⁻¹)
- MM5=**AIA** (1,5 mg/l⁻¹), **Kin** (1,5 mg/l⁻¹), **AG3** (1,0 mg/l⁻¹)
- MM6=**AIA** (1,5 mg/l⁻¹), **Kin** (1,5 mg/l⁻¹), **AG3** (1,5 mg/l⁻¹)



Medios de incubación



Medios de incubación

MEDIO DE CULTIVO PARA HOJAS (MHj)

Para cultivar las hojas se emplearon dos medios:

- Murashige Skoog (1962) al 50% medio para incubación.
- Murashige Skoog (1962) adicionado benciladenina y 2,4- ácido diclorofenoxiacético para el medio de callo.



Medio de incubación



Medio para callo

SIEMBRA DE YEMAS



Proceso de siembra de yemas



Yemas sembradas

Se realizó la desinfección en el autoclave de los materiales que se emplearon como pinzas, cajas petri, bisturí, gillet, algodón, agua destilada, frascos, papel aluminio.

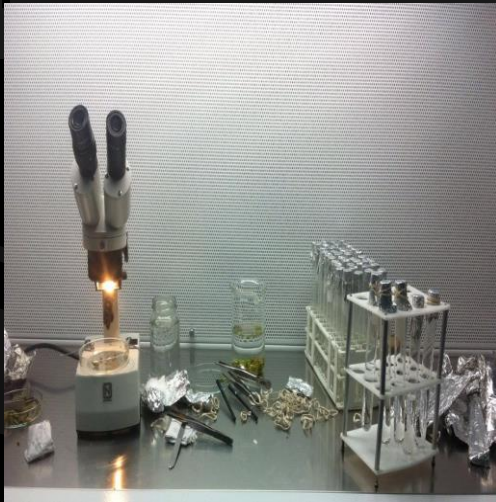
La cámara y todo el material a utilizar se atomizó con alcohol al 70% y sometió a los rayos UV durante 15 minutos.

Fue iniciado el trabajo con la siembra de las yemas: se cortó diagonalmente un explante de 1,5 cm que contenía una yema axilar o apical y se sembró un explante por frasco.



Fase de extracción de Yemas

SIEMBRA DE MERISTEMAS



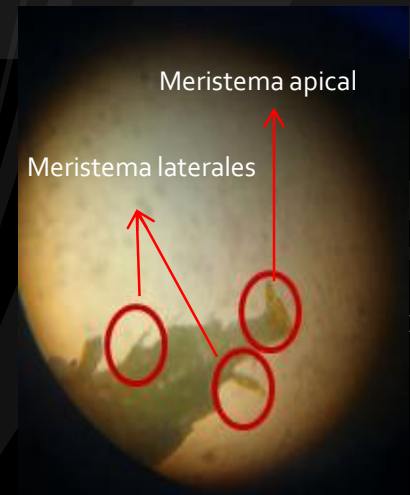
Proceso de siembra de meristemas



Extracción de los meristemas



Meristemas observados en el estereoscopio

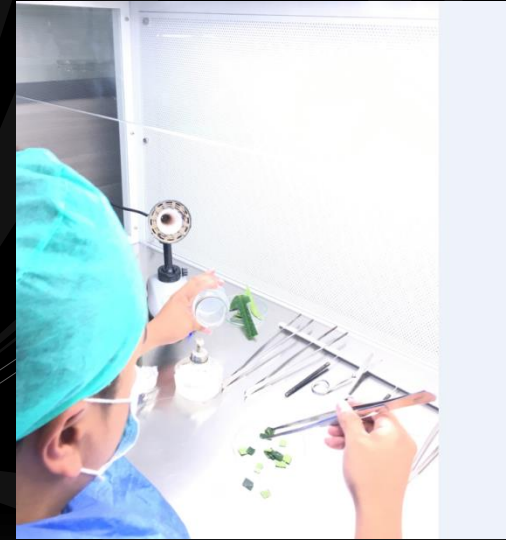


Meristemas extraídos

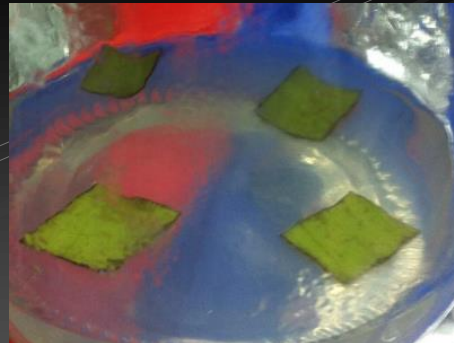
La siembra de los meristemas se utilizó un estereoscopio Olympus SZ51 con un aumento de 20 a 40X ya que a simple vista eran muy difícil observarlos su tamaño eran inferior a un milímetro. Se utilizó agujas de disección en la siembra. Se puede describir que en una yema se podían encontrar de 7 a 10 meristemas laterales y en el apical estaba formado de 5 a 7 meristemas.

SIEMBRA DE HOJAS

La siembra de las hojas se uso pinzas y tijeras, se eliminaron los bordes de la hoja y el ápice, luego se cortarón explantes de 5 X 5 mm y se sembró cuatro explantes por frasco, transcurrido un período de 48 - 72 horas se evaluaron los explantes y los sanos se subcultivaron al medio con reguladores de crecimiento, medio de callo 3 (MC3).



Proceso de siembra de las hojas



Siembra de las hojas

ÁREA DE INCUBACIÓN

Una vez sembrados los explantes de yemas, meristemas y hojas se trasladaron al área de incubación, ahí se registró fotoperíodo y la temperatura en la cual se encontraban los explantes.



Traslado al área de incubación



Yemas en incubación



Hojas en incubación



Hojas en incubación

En el caso de las hojas también se colocó a la oscuridad para controlar la oxidación del material vegetativo



Hojas en incubación a la oscuridad

La temperatura a la cual se encontraban en el área de incubación fue de 23°C aquellos que se encontraban a la luz, y los que se encontraban a la oscuridad la temperatura era de 26°C.

Diseño experimental

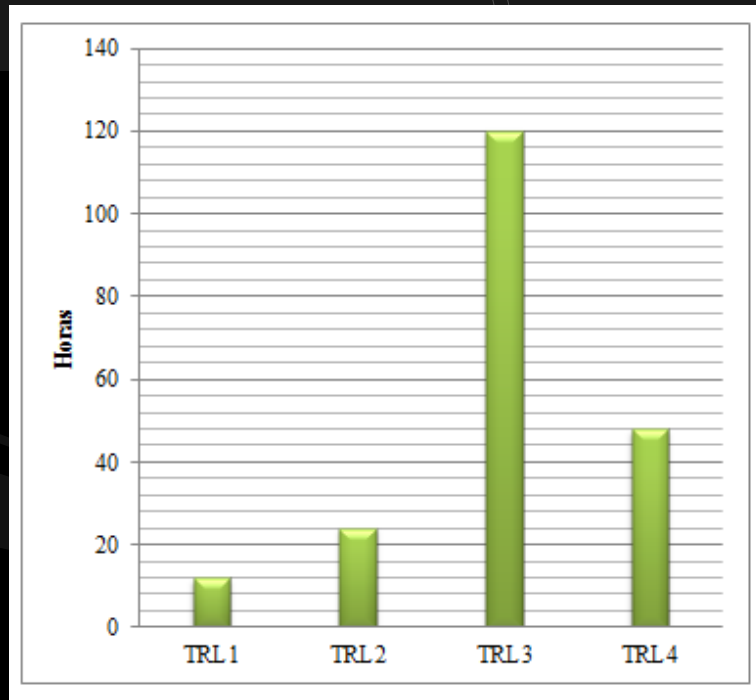
Se aplicó el diseño irrestricto al azar con arreglo factorial, 3 tipos de material vegetativo (yemas, meristemas y hojas), con sus respectivos métodos de transporte para cada tipo del material vegetativo al igual que sus respectivos tratamientos de desinfección y con diferentes tratamientos pregerminativos en cada tipo del material vegetativo, en la combinación de estos factores dio un total de 20 tratamientos.

ADEVA				
Fuentes de variación	SC	GL	CM	F
<i>Tratamientos</i>	$\sum Y_i^2 / n - Fc$	20-1=19	Sc_t / GL	CM_t / CM_E
<i>Factor A: Material vegetativo</i>	$\sum Y_j^2 / n(mv) - Fc$	3-1=2	Sc_{mv} / GL	CM_{mv} / CM_E
<i>Factor B: Medios de cultivo</i>	$\sum Y_i^2 / n(mc) - Fc$	9-1=8	Sc_{mc} / GL	CM_{mc} / CM_E
<i>Factor C: medios de desinfección</i>	$\sum Y_r^2 / n(md) - Fc$	13-1=12	Sc_{md} / GL	Sc_{md} / GL
<i>Factor A* Factor B*Factor C</i>	$Sc_t - Sc_{mv} - Sc_{mc} - Sc_{md}$	(3-1)*(9-1)*(13-1)=192	$Sc_{mv*mc*md} / GL$	$CM_{mv*mc*md} / CM_E$
<i>Error</i>	$\sum \sum Y_{ij}^2 - \sum Y_i^2 / n$	20*(0-1)=20	Sc_E / GL	
<i>Total</i>	$\sum \sum Y_{ij}^2 - Fc$	20*0-1=1		



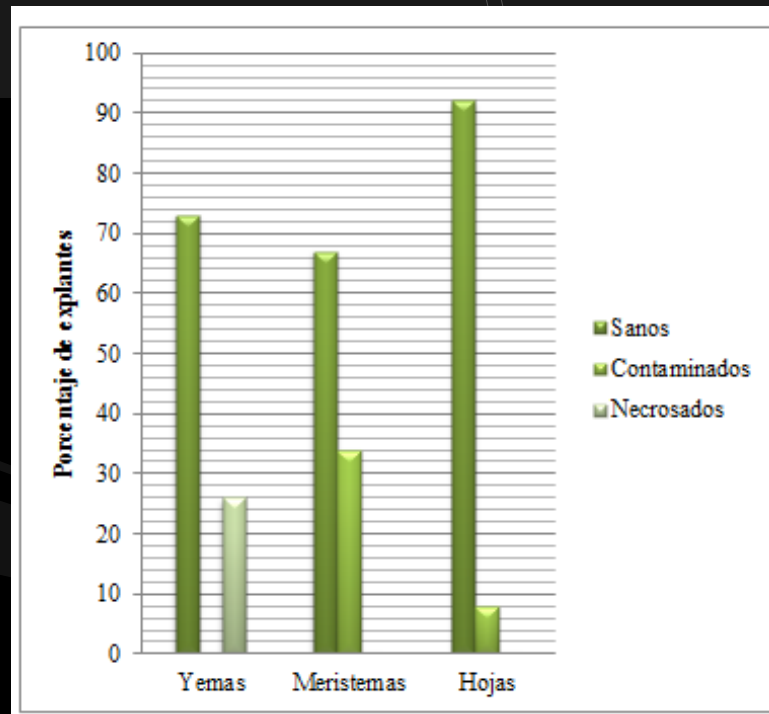
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FORMA DE TRASLADO DEL MATERIAL VEGETATIVO



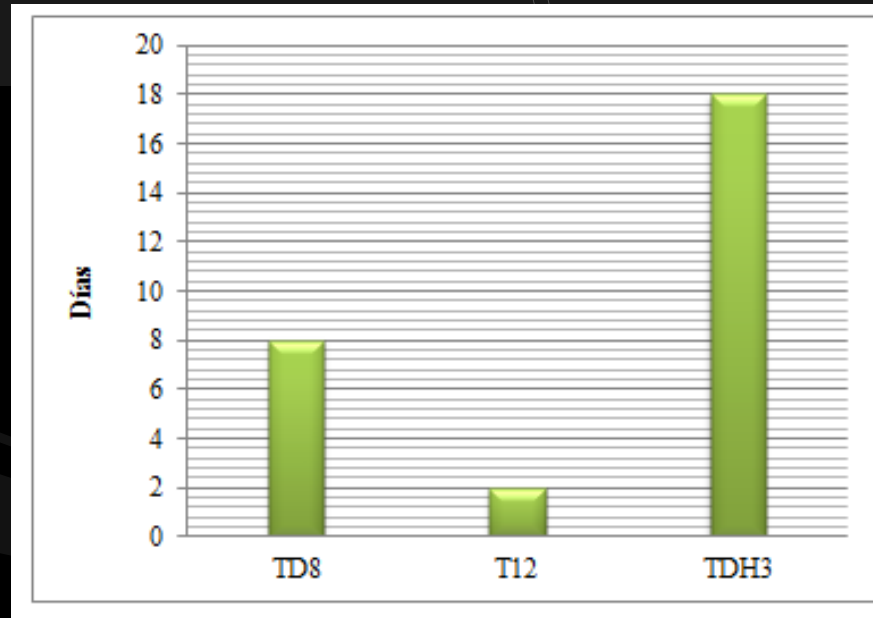
Preparación del material vegetativo

MEJOR EXPLANTE



Material vegetativo hojas

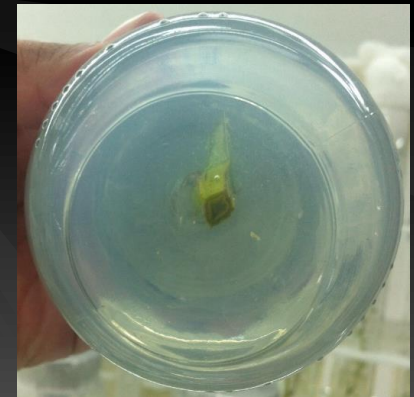
MEJOR MÉTODO DE DESINFECCIÓN EN EL LABORATORIO DE LAS YEMAS Y MERISTEMAS



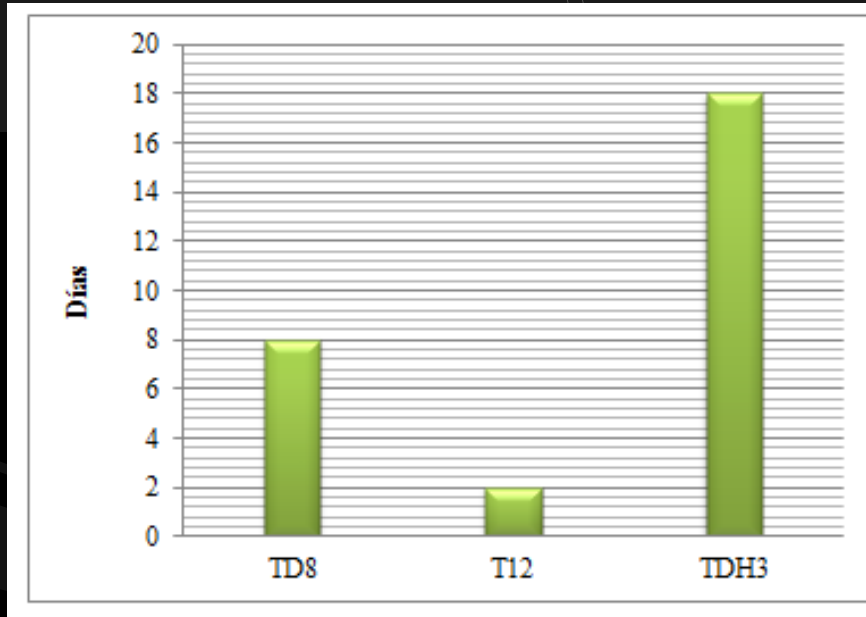
Desinfección en la bomba de vacío



Material vegetativo en incubación



MEJOR MÉTODO DE DESINFECCIÓN EN EL LABORATORIO DE LAS HOJAS

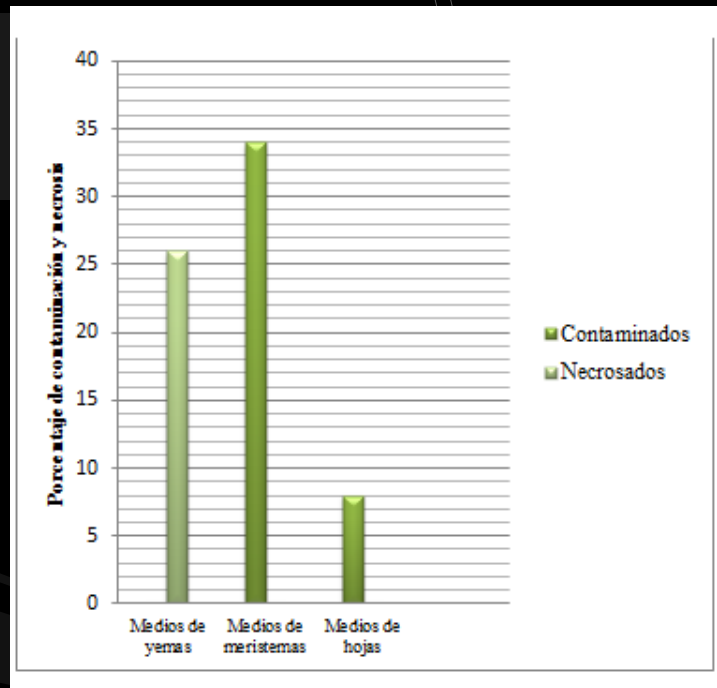


Mendoza, Tamayo y Pacheco, (2010).
Acosta, (2002).



Desinfección de hojas en Benomilo

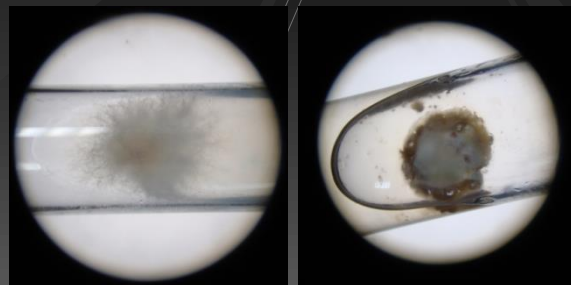
MEJOR MEDIO DE CULTIVO



Material vegetativo de hojas contaminado



Material vegetativo de yemas contaminado



Material vegetativo de meristemas contaminado

Gamboa y Abdelnour, (1999)
Troncoso et al., (s.f.).

OBTENCIÓN DE VITROPLANTAS



Material vegetativo de yemas necrosado



Material vegetativo de meristemas contaminado



Material vegetativo de hojas necrosado



Material vegetativo de yemas contaminado



Material vegetativo de meristemas contaminado



Material vegetativo de hojas contaminado

CONCLUSIONES

- El traslado más apropiado del material vegetativo fue el envuelto en papel periódico y humedecido con cisteína 25 mg/l^{-1} y dentro del cooler (TRL3).
- Los mejores explantes se consiguieron de hojas de rebrote más jóvenes que presentaban mejores características físicas, además fueron las que menos contaminación presentó.
- El mejor método de desinfección, para las yemas se obtuvo con la aplicación de hipoclorito de sodio al 20% durante 20 minutos + bicloruro de mercurio (25 ml/l^{-1}) más al vacío durante 40 minutos (TD9), para los meristemas fue en hipoclorito de sodio al 20% durante 40 minutos + bicloruro de mercurio (25 mg/l^{-1}) más al vacío durante 40 minutos (T12) y para las hojas fue en Benomilo al 1% durante 20 minutos + en hipoclorito de sodio al 20% durante 20 minutos (TDH3).
- No se pudo identificar qué medio de cultivo pre-germinativo brindan los mejores resultados debido a la contaminación endógena y microbiana además de la necrosis del material vegetativo.
- No se obtuvo vitroplantas debido a la contaminación y necrosis del material vegetativo.

RECOMENDACIONES

- Para próximas investigaciones se recomienda emplear plántulas de regeneración natural y adaptarlas a un vivero cerca del laboratorio para así, conseguir material sano.
- En investigaciones futuras en cultivo “*in vitro*” de *Humiriastrum procerum* se recomienda que se usen los explantes de las hojas ya que presentan un alto grado de respuesta en la fase de desinfección.
- En estudios futuros de *Humiriastrum procerum* se recomienda, usar agentes desinfectantes como Benomilo e hipoclorito de sodio y que se utilicen otros fungicidas. Que se estudien diferentes concentraciones y tiempos.
- Ensayar el uso de otros reguladores y estimuladores de crecimiento en los medios de cultivo para acelerar el desarrollo de los explantes de hojas.
- En futuras investigaciones de *Humiriastrum procerum* se recomienda, usar diferentes agentes antibióticos en diferentes dosis en el medio de cultivo, para evitar la contaminación endógena y microbiana.



GRACIAS!

