



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DESINFECCIÓN Y CONTROL DE LA
FENOLIZACIÓN EN SEMILLAS DE ARRAYÁN (*Myrcianthes rhopaloides*) PARA LA
GERMINACIÓN “IN VITRO” EN IBARRA, ECUADOR.

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA:

Daniela Estefanía Limaico Torres

DIRECTOR:

Ing. Marcelo Albuja, M.Sc.

Ibarra – Ecuador

2018

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DESINFECCIÓN Y CONTROL DE LA FENOLIZACIÓN EN SEMILLAS DE ARRAYÁN (*Myrcianthes rhopaloides*) PARA LA GERMINACIÓN “IN VITRO” EN IBARRA, ECUADOR.

Tesis revisada por el comité asesor, por lo cual se autoriza su presentación como requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADA:

Ing. Marcelo Albuja, M.Sc.

DIRECTOR

Ing. Pedro Barba, M.Sc.

ASESOR

Dr. Mario Añezco, M.Sc.

ASESOR

Ing. Santiago Salazar, M.Sc.

ASESOR



Pedro Barba



Ibarra – Ecuador

2018



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN

A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO 1	
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1003273156
APELLIDOS Y NOMBRES:	DANIELA ESTEFANÍA LIMAICO TORRES
DIRECCIÓN:	Rafael Torres y Atahualpa 1-168
EMAIL:	daniela0093@hotmail.com
TELÉFONO MÓVIL:	0991870367

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DESINFECCIÓN Y CONTROL DE LA FENOLIZACIÓN EN SEMILLAS DE ARRAYÁN (<i>Myrcianthes rhopaloides</i>) PARA LA GERMINACIÓN “IN VITRO” EN IBARRA, ECUADOR.
AUTORA:	Limaico Torres Daniela Estefanía
FECHA:	
PROGRAMA:	PREGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Biotecnología
DIRECTOR:	M.Sc. Marcelo Albuja, Ing.

2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

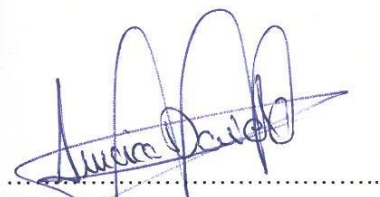
Yo, Limaico Torres Daniela Estefanía, con cedula de identidad Nro. 100327315-6, en calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la SENESCYT y a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad, con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

3. CONSTANCIAS

La autora manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y soy la titular de los derechos patrimoniales, por lo que asumo la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldré en defensa de la SENESCYT y de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 18 días del mes de Enero de 2018

LA AUTORA:



Limaico Torres Daniela Estefanía

100327315-6



CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Limaico Torres Daniela Estefanía, con cédula de ciudadanía Nro. 100327315-6 bajo mi supervisión.

Yo, Limaico Torres Daniela Estefanía, con cédula de ciudadanía Nro. 100327315-6, manifiesto que el presente trabajo fue desarrollado por mí en la ciudad de Quito, Ecuador, el día 15 de mayo del 2023, en el marco del curso de maestría denominado "ANÁLISIS Y DISEÑO DE SISTEMAS DE INFORMACIÓN PARA LA EMPRESA", impartido por la Universidad Técnica Particular de Loja, en la modalidad de educación a distancia, y que he ejercido y ejerzo la docencia en esta institución de educación superior, por lo que certifico que el presente trabajo es original y que no ha sido plagado por otro autor, y que he ejercido la supervisión de este trabajo.

Ing. Marcelo Albuja, M.Sc.
DIRECTOR DE TESIS

Limaico Torres Daniela Estefanía
100327315-6



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A FAVOR DE LA SENESCYT Y DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

Yo, Limaico Torres Daniela Estefanía, con cedula de ciudadanía Nro. 100327315-6, manifiesto mi voluntad de ceder a la SENESCYT y a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, articulo 4,5 y 6, en calidad de autora de la obra o trabajo de grado denominado: **EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DESINFECCIÓN Y CONTROL DE LA FENOLIZACIÓN EN SEMILLAS DE ARRAYÁN (*Myrcianthes rhopaloides*) PARA LA GERMINACIÓN “IN VITRO” EN IBARRA, ECUADOR**, que ha sido desarrollado para optar por el título de: **INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA** en la Universidad Técnica del Norte , quedando la SENESCYT y la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

Ibarra, a los 18 días del mes de Enero de 2018

.....
Limaico Torres Daniela Estefanía

100327315-6

AGRADECIMIENTO

A ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado, gracias por permitirme vivir una etapa en mi vida llena de alegrías, tristezas, derrotas y muchos éxitos. Gracias por tu infinita bondad.

A mi amada madre, la mujer que supo construir en mí los valores más fuertes que puedan existir, motivo los mejores sueños de superación, ella es mi mayor inspiración ya que sus virtudes y su inmenso corazón me guía a admirarle y amarla cada día más.

A mis hermanos, Rober y Toñito, gracias por apoyarme de forma incondicional y animarme en los momentos más difíciles, siempre serán mis enanos, les quiero con todo mi corazón.

A mi director de tesis, M.Sc. Marcelo Albuja. Ing por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación ha logrado de mí hacer una gran profesional.

A mis asesores, Pedro Barba, Santiago Salazar y Mario Añazco por su colaboración en la presente investigación, por sus consejos, su apoyo y por formar un gran equipo de trabajo.

A Miquel Blasco, un gran profesional y sobre todo una gran persona, gracias por tu apoyo incondicional. Eternamente agradecida contigo.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal y a su personal por abrirme las puertas para realizar mi investigación. Ing. Miguel Echeverría gracias por su constante apoyo.

A Rosita Soria y Alberto Roura por compartir sus consejos, experiencias y grandes conocimientos que contribuyeron con mi formación personal y profesional.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones

DEDICATORIA

A mi Mami
Graciela

A mis Abuelitos
Carmelita y Manuel

A mis hermanos
Rober y Toño

A mis enanos hermosos
Dianita y Santi

A mis tíos
Jimena, Lucia y Roberto

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO

RESUMEN.....	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
1.2 HIPÓTESIS	4
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Fundamentación legal.....	5
2.2 Fundamentación teórica	5
2.2.1 Características principales de las semillas	5
2.2.2 Cultivo de tejidos	7
2.2.3 Cultivo “ <i>in vitro</i> ” de especies forestales	8
2.3 Arrayán (<i>Myrcianthes rhopaloides</i>).....	9
2.3.1 Origen.....	9
2.3.2. Clasificación taxonómica	9
2.3.3 Distribución geográfica.....	10
2.3.4 Morfología	10
2.3.5 Importancia	10
2.3.6 Usos.....	10
2.4 Cultivo “ <i>in vitro</i> ” de plantas	11
2.5 Etapas de la micropropagación	12
2.5.1 Etapa 0. Selección de la planta madre y preparación.....	12

2.5.2 Etapa I. Inicio del cultivo	13
2.5.3 Etapa II. Multiplicación	13
2.5.4 Etapa III. Elongación y enraizamiento.....	14
2.5.5 Etapa IV. Aclimatación.....	14
2.6 Medio de Cultivo	15
2.6.1 Esterilización de los medios de cultivo.....	17
2.7 Condiciones ambientales para la incubación	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Materiales y equipos	19
3.2 Caracterización del sitio experimental.....	20
3.2.1 Ubicación	20
3.2.2 Características del área de muestreo	20
3.3 Metodología de campo.....	21
3.3.1 Fenología del Arrayán.....	21
3.3.2 Selección de frutos a partir de árboles élite	22
3.3.3 Caracterización fenotípica de frutos y semillas	23
3.3.4 Almacenamiento de semillas.....	23
3.3.5 Análisis de calidad de semillas	24
3.3.6 Germinación en campo de arrayán.....	25
3.4 Metodología para la germinación “ <i>in vitro</i> ” de arrayán	26
3.4.1 Tratamiento de lavado a las semillas almacenadas	27
3.4.2 Tratamientos de desinfección de las semillas	29
3.4 Metodología de siembra “ <i>in vitro</i> ”	30
3.5 Tratamientos de agentes antioxidantes.....	31

3.6	Aclimatación de las vitroplantas	31
3.7	Análisis estadístico	32
4.	RESULTADOS.....	33
4.1	Caracterización fenotípica de frutos.....	33
4.2	Caracterización fenotípica de semillas	35
4.3	Análisis de calidad de las semillas (Normas ISTA 1993)	36
4.3.1	Origen y autenticidad	36
4.3.2	Pureza de la semilla de arrayán	37
4.3.3	Ensayo de germinación en campo.....	37
4.3.4	Numero de semillas viables/ Kg	38
4.4	Identificación del mejor tratamiento de desinfección	38
4.5	Identificación del mejor tratamiento de agente antioxidante	42
4.6	Germinación “in vitro” de arrayán	46
4.7	Aclimatación de las vitroplantas	46
5.	DISCUSIÓN	47
6.	CONCLUSIÓN.....	51
7.	BIBLIOGRAFÍA	54
	ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	<i>Composicion de medios de cultivo para celulas vegetales</i>	16
Tabla 2.	<i>Materiales - equipos de campo y laboratorio</i>	19
Tabla 3.	<i>Calendario de recolección de semillas de arrayán</i>	21

Tabla 4. <i>Tratamientos de desinfección aplicados a las semillas de arrayán</i>	27
Tabla 5. <i>Tratamientos con agentes antioxidantes</i>	31
Tabla 6. <i>Resultados de la caracterización fenotípica del fruto de arrayán</i>	33
Tabla 7. <i>Resultados de la caracterización fenotípica de las semillas de arrayán</i>	35
Tabla 8. <i>Resumen del Modelo de Durbin Watson para explantes no contaminados</i> ..	40
Tabla 9. <i>Prueba de efectos intersujetos para explantes no contaminados</i>	41
Tabla 10. <i>Comparación múltiple HSD Tukey entre tratamientos de explantes no contaminados</i>	41
Tabla 11. <i>Resumen modelo Durbin Watson para embriones no fenolizados</i>	44
Tabla 12. <i>Pruebas de efectos inter sujetos para embriones no fenolizados</i>	44
Tabla 13. <i>Comparaciones múltiples HSD tukey entre tratamientos mejor agente antioxidante</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Mapa “Bosque de los Arrayanes”	21
<i>Figura 2.</i> Bosque de los Arrayanes.....	22
<i>Figura 3.</i> Despulpado manual del fruto	23
<i>Figura 4.</i> Semillas seleccionadas para el tratamiento de desinfección.....	28
<i>Figura 5.</i> Semillas sumergidas en detergente (6 g/L) + tween 20 (6 gotas).....	28
<i>Figura 6.</i> Lavado de las semillas con agua destilada estéril	28
<i>Figura 7.</i> Diversidad de tamaños en frutos de arrayán	34
<i>Figura 8.</i> Fruto de arrayán despulpado	34
<i>Figura 9.</i> Diversidad de tamaño en semillas de arrayán.....	35
<i>Figura 10.</i> Árboles elite seleccionados del Bosque de los Arrayanes	36
<i>Figura 11.</i> Determinación de pureza en semillas de arrayán.....	37
<i>Figura 12.</i> Ensayo de germinación de arrayán	38
<i>Figura 13.</i> Tratamientos de desinfección en embriones	39

<i>Figura 14.</i> Gráfica de puntos para la independencia de los residuos en explantes no contaminados. Software SPSS	40
<i>Figura 15.</i> Tratamientos con agentes antioxidantes	43
<i>Figura 16.</i> Gráfica de puntos para la independencia de los residuos. Explantes no fenolizados. Software SPSS	43
<i>Figura 17.</i> Plantas “in vitro” de arrayán	46
<i>Figura 18.</i> Vitroplantas de arrayán aclimatadas	46

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Floración y fructificación, maduración de frutos y recolección.	57
ANEXO 2. Medición de tamaños de fruto.....	57
ANEXO 3. Caracterización fenotípica de frutos.....	58
ANEXO 4. Caracterización fenotípica de semillas.....	59
ANEXO 5. Despulpado manual del fruto y almacenamiento de la semilla.....	61
ANEXO 6. Análisis fenotípico de las semillas (origen, autenticidad y pureza).....	61
ANEXO 7. Ensayo de germinación en campo de semillas de arrayán	62
ANEXO 8. Semillas despulpadas, fungicida y semillas de arrayán con VITAVAX ® 400.....	62
ANEXO 9. Sustrato franco arenoso, desinfección del sustrato	62
ANEXO 10. Siembra y cubrimiento de las semillas con sustrato arenoso	63
ANEXO 11. Plántulas obtenidas de la germinación en campo de arrayán.....	63
ANEXO 12. Plantas madre de arrayán	63
ANEXO 13. Semillas de arrayán, dentro de la CFL – Semillas de arrayán sumergidas en etanol al 70%	64
ANEXO 14. Semillas de arrayan en T1 (1% c.a NaClO) y T2 (5% c.a NaClO).....	65
ANEXO 15. Semillas de arrayán en Benlate (1,5g/L) durante 24 horas (T3 – T4)....	65
ANEXO 16. Semillas de arrayán en HgCl ₂ , (T3 (1g/L) – T4 (2g/L)	66
ANEXO 17. Aislamiento de embriones de arrayán.....	66

ANEXO 18. Composición del medio de cultivo casa comercial Ducheffa Biochemie	66
ANEXO 19. Siembra de embriones en el medio de cultivo	67
ANEXO 20. Almacenamiento de embriones en la oscuridad e indicios de germinación.....	67
ANEXO 21. Medio de cultivo con carbón activado vs medio de cultivo con cisteína	68
ANEXO 22. Aclimatación de las vitroplantas de arrayán	68

RESUMEN

El arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*) es un árbol nativo de América del Sur, posee una única época de fructificación anual, lo que resulta una limitante muy importante frente a la gran demanda que existe en el mercado. Esta demanda se da ya que es considerada una de las especies forestales y maderables más valiosas del mundo. Esto explica el alto índice de tala del arrayán con porcentajes superiores al 60 %, haciendo indispensable su propagación mediante cultivos “*in vitro*”. El presente estudio tuvo como objetivo establecer un protocolo para la desinfección y control de la fenolización en semillas de arrayán, como primeras e imprescindibles fases del ciclo completo de propagación “*in vitro*”, con el fin de suplir la demanda de esta especie forestal. Se caracterizó fenotípicamente a los frutos y semillas con el objetivo de establecer características morfológicas. Posteriormente, se evaluaron diferentes tratamientos de desinfección en semillas de arrayán con dos agentes desinfectantes: NaClO y HgCl₂; obteniéndose que el T3 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 1g/L) y T4 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 2g/L) presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a los T1 (Etanol 70% + NaClO 1% c.a) y T2 (Etanol 70% + NaClO 5% c.a), pero no entre ellos (T3 y T4). Estos resultados demuestran que en la etapa de desinfección los mejores tratamientos son el T3 y T4 ya que poseen la misma efectividad. En cuanto a la fenolización, se evaluó la eficiencia de dos agentes antioxidantes: cisteína y carbón activado, obteniéndose que en la etapa de control de oxidación T3 (cisteína 25 mg/L + Ac. Asc 100mg/L) y T4 (cisteína 50 mg/L + Ac. Asc, 100mg/L) presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a T1 (Carbón activado 1g/L + Ac. Asc, 100mg/L) y T2 (Carbón activado 2g/L + Ac. Asc, 100mg/L), pero no entre ellos (T3 y T4), por lo que ambos poseen la misma efectividad de acuerdo a los datos estadísticos. Los tratamientos fueron evaluados en un medio MS ½ con vitaminas (Duchefa Biochemie) suplementado con Pythagel (2,5 g/L), sacarosa (20g/L), ANA (1 ml /L), Kinetina (1ppm) y AG3 (2mg/L).

Palabras clave: agente antioxidante, arrayán, fenolización, germinación “*in vitro*”.

ABSTRACT

The myrtle (*Myrcianthes rhopaloides*) is a tree from south America, it has a unique annual fruiting season, which is a very important limitation against the great demand that exists in the market. This demand results because it is considered as one of the most timber and valuable forest specie in the world. This explains why myrtle has a rate higher than 60% on felling of trees rates, making indispensable to search propagation “*in vitro*” techniques to supply the demand of this forest specie. The objective of this study was establish a protocol to disinfection and control of phenolization in myrtle seeds, which ones are the first and essential phases of the complete “*in vitro*” propagation cycles. The fruits and seeds were characterized phenotypically with the aim of establishing morphological characteristics. Subsequently; different disinfection treatments were evaluated in array seeds with two disinfectants: NaOCl and HgCl₂, obtaining as result that T3 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 1g/L) and T4 ((Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 2g/L) present statistical significant differences respect to T1 (Etanol 70% + NaOCl 1% c.a) and T2 (Etanol 70% + NaOCl 5% c.a), but not between them (T3 and T4). These results show that the best treatments to disinfection stage were T3 and T4 due to they have the same effectiveness according to the statistical data. Withing phenolization assays, two antioxidant agents (cysteine and activated carbon) were evaluated, showing that in phenolization stage, T3 (cysteine 25 mg/L + Ac. Ascorbic 100mg/L) and T4 (cysteine 50 mg/L + Ac. Ascorbic 100mg/L) present statistically significant differences with T1 (Activated Carbon 1g/L + Ac. Ascorbic 100mg/L) and T2 (Activated Carbon 2g/L + Ac. Ascorbic 100mg/L), but no between themselves (T3 and T4), because both have the same effectiveness. The treatments were evaluated in an ½ MS medium with vitamins (Duchefa Biochemie) supplemented with Phytigel (2,5 g/L), sucrose (20 g/L), ANA (1ml/L), kinetin (1ppm) and AG3 (2mg/).

Keywords: myrtle, “*in vitro*” germination, phenolization, antioxidant agent.

1. INTRODUCCIÓN

Imbabura es la décimo cuarta provincia más poblada del país (INEC, 2010), en la cual se desarrollan actividades productivas, industriales y agropecuarias que basadas en el uso intensivo de recursos naturales ejercen una presión enorme sobre los diferentes ecosistemas, generando graves problemas como consecuencia de la industrialización, siendo los principales: la deforestación, sobreexplotación, desertificación, erosión, contaminación, avance de la frontera agrícola, entre otros. (GPI, 2013).

El arrayán es considerado como una de las especies maderables más valiosas del mundo y posee uno de los mayores índices de tala con un porcentaje mayor al 60% (Grogan, Barreto , & Verrissimo, 2002). Sus poblaciones muestran indicios de declive y fragmentación en la mayor parte de su área de distribución, provocando una disminución acelerada, además se encuentra incluida en la lista de especies en peligro vulnerable por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre. (CITES, 1994).

La destrucción y fragmentación de hábitats naturales del arrayán están entre las principales causas de pérdida de biodiversidad de la especie. En la Zona 1 del Ecuador (Carchi, Esmeraldas, Imbabura y Sucumbíos) existen únicamente dos áreas naturales concentradas con este árbol, una es el Bosque de los Arrayanes ubicado en Santa Marta de Cuba con una extensión de 4 ha aproximadamente y la otra en San Gabriel con 16 ha de extensión, ambas en la provincia del Carchi. En el caso de plantas leñosas, la probabilidad de supervivencia de la gran mayoría de estas especies, depende de cómo la fragmentación afecta a procesos tan importantes como

la polinización, la dispersión de semillas o la supervivencia post-dispersiva, llevados a cabo por organismos con los que interactúan a lo largo de su ciclo reproductivo, por tal motivo determinar en futuros trabajos como la fragmentación afecta a este tipo de interacciones es de vital importancia para contribuir con la supervivencia de diversas especies. (Jaramillo, 2013).

De acuerdo a (Naciones Unidas sobre Medio Ambiente, 1992) existen estrategias clave para la conservación vegetal, una de ellas es la conservación *ex situ*, dirigida a la preservación de la diversidad genética existente en cada especie fuera de su hábitat natural. Este método de conservación surge a partir de las complicaciones y deficiencias que derivan de la aplicación de medidas de conservación de especies en sus hábitats naturales y principalmente del hecho de reconocer que las medidas de conservación *in situ* no resultan suficientes para afrontar la galopante reducción de la diversidad biológica. En este contexto, las herramientas de la biotecnología moderna, particularmente las derivadas de la tecnología del cultivo de tejidos y células vegetales “*in vitro*”, tienen, sin duda un papel preponderante en el apoyo a los programas de conservación vegetal (Rojas, García, & Alarcón, 2005).

Una de las técnicas que se engloba en el cultivo “*in vitro*” de tejidos vegetales, consiste en cultivar asépticamente una porción de células somáticas de la planta madre bajo condiciones de ambiente controladas, para que las células expresen su potencial intrínseco. Existe gran demanda de semillas y plantas en el mercado, pero pocas fuentes semilleras, por lo que el cultivo “*in vitro*” permite multiplicar masivamente a esta importante especie a través de herramientas biotecnológicas, sin tener que esperar a su única época de fructificación, que es una limitante muy importante. (Jaramillo, 2013)

Uno de los grandes desafíos que afronta la técnica de cultivo “*in vitro*” es la propagación vegetativa de especies forestales, esto se debe a que la genética propia de la especie involucra largos ciclos de vida, por tal motivo el estudio completo que

requiere el arrayán es de tiempo largo, sin embargo, de conseguirse los beneficios serian incalculables para la parte científica vegetal.

Además, existen ciertas limitantes como el elevado índice de contaminación tanto endógena como exógena, ocasionada por diversos microorganismos propios del hábitat natural del arrayán, dificultando su establecimiento “*in vitro*” a partir de segmentos nodales; y el alto índice fenolítico producido principalmente por la presencia de polifenoles y radicales libres, que dan lugar al necrosamiento del explante, y como consecuencia a su muerte.

Debido al alto índice de fenolización del arrayán, unido al problema del largo ciclo genético que involucra a esta especie y su vulnerabilidad a una posible contaminación con diversos tipos de microorganismos (bacterias, hongos, virus), se propuso centrarse en el establecimiento de un protocolo para la desinfección y control de la fenolización, como primera e imprescindible etapa del ciclo completo que involucra a la propagación vegetativa. Conseguir estos protocolos mejorados, abrirá las puertas a futuras líneas de investigación sobre la propagación completa de arrayán, nunca antes abordada, que serían de gran valor para la comunidad científica y, para los planes de reforestación del Ministerio del Ambiente - Ecuador.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Establecer una metodología en la fase de desinfección de semillas para la germinación “*in vitro*” de arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*).

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípicamente los frutos y semillas procedentes de árboles élite de arrayán.

- Evaluar tratamientos de desinfección de semillas para la germinación “*in vitro*” de arrayán a diferentes concentraciones de solución desinfectante y tiempo de exposición.
- Valorar la efectividad de sustancias antioxidantes (carbón activado y cisteína) en la etapa de iniciación del cultivo.

1.2 HIPÓTESIS

La evaluación de tratamientos de desinfección de semillas para la germinación “*in vitro*” de arrayán, así como el control de la fenolización, es una alternativa viable para la obtención de material vegetal sano y aséptico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Fundamentación legal

De acuerdo a lo estipulado en la (Constitución del Ecuador, 2008) capítulo II, artículo 6 todas las ecuatorianas y los ecuatorianos son ciudadanos y gozarán de los derechos establecidos en la Constitución. La Constitución es la carta magna por la que se rigen todas las leyes, normas y derechos que un ciudadano debe adoptar como tal, en este caso se debe hacer especial énfasis en el derecho que tiene todo ciudadano a que el estado garantice los derechos de la naturaleza, promoviendo la sostenibilidad ambiental territorial y global como se menciona en el objetivo 7 del Plan Nacional del Buen Vivir, refiriéndose específicamente a que el estado debe consolidar la gestión sostenible de los bosques; enmarcada en el modelo de gobernanza forestal, política 7.3; promoviendo la investigación de alternativas viables para identificar y cuantificar el patrimonio forestal como base para la toma de decisiones respecto a su conservación y manejo, apartado f, del lineamiento estratégico, de acuerdo a como se encuentra estipulado en las leyes establecidas en el Plan Nacional del Buen Vivir (2013 – 2017).

2.2 Fundamentación teórica

2.2.1 Características principales de las semillas

El principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores terrestres y acuáticas es la semilla, la cual desempeña una función primordial en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas, la regeneración de bosques y por ende la sucesión ecológica. (CATIE, 2000)

En la naturaleza la semilla es una fuente de alimento básico para muchos animales. También, mediante la producción agrícola, la semilla es esencial para el ser humano, cuyo alimento principal está constituido por semillas, directa o indirectamente, que a la vez sirven también de alimento para varios animales domésticos. (FAO, 2006)

La semilla es uno de los principales recursos para el manejo agrícola y silvícola de las poblaciones de plantas, para la reforestación, para la conservación del germoplasma vegetal y para la recuperación de especies valiosas sobreexplotadas. Las semillas pueden almacenarse vivas por largos periodos, asegurándose así la preservación de especies y variedades de plantas valiosas. (Doria, 2010)

La ciencia de las semillas se ha desarrollado a lo largo de muchos años, acumulándose hasta la fecha un importante volumen de conocimientos acerca de muchos aspectos de su biología y manejo. Existen numerosas publicaciones científicas y técnicas en este campo y se conocen con detalle varias características de la biología de las semillas de las plantas cultivadas más importantes, y de algunos árboles de valor forestal; sin embargo, las semillas de las plantas tropicales y subtropicales no han corrido con igual suerte y su estudio se ha quedado muy rezagado. (FAO, 2006)

Como parte del estudio de las plantas es necesario intensificar la investigación de las semillas, sus características fisiológicas, sus mecanismos de latencia y germinación, su longevidad (ecológica y potencial) y su posible uso para la propagación y conservación de las plantas.

Para manipular correctamente las semillas es esencial tener algunos conocimientos sobre su biología. La utilización de semillas con fines de regeneración artificial posibilita un considerable grado de control sobre las condiciones en que se recolectan, procesan, almacenan y tratan, pero las características intrínsecas de la

semilla son producto de miles de años de adaptación a la regeneración natural bajo condiciones locales. El conocimiento de la fenología de la floración permite al recolector determinar cuáles son el momento y los métodos más adecuados para recolectar la semilla de una determinada especie.

Las semillas, tanto de las angiospermas (las auténticas plantas con flores) como las gimnospermas (que comprenden las coníferas) presentan óvulos. En las angiospermas los óvulos están totalmente encerrados dentro del ovario, mientras que en las gimnospermas los óvulos son “desnudos”, y típicamente aparecen en pares en la superficie superior y cerca de la base de cada escama de los conos femeninos. Como las escamas del cono están siempre firmemente cerradas salvo en el momento de la polinización y, después, cuando caen las semillas, la “desnudez” es sólo relativa. (Doria, 2010)

El desarrollo de la semilla se inicia con la fecundación, es decir, la unión de un núcleo masculino haploide procedente del grano de polen con un núcleo femenino haploide dentro del óvulo para formar un nuevo organismo, que es diploide. La fecundación ha de estar precedida por la polinización, la llegada de un grano de polen al estigma de la flor femenina en las angiospermas o cerca del micrópilo del óvulo en las gimnospermas. Es importante distinguir estos dos procesos de polinización y fecundación (CATIE, 2000) . En la mayoría de las angiospermas el alargamiento del tubo polínico es rápido, y entre la polinización y la fecundación transcurren sólo unos días, o incluso unas horas.

2.2.2 Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos vegetales “*in vitro*” consiste en cultivar pequeños segmentos de planta, sobre medios sintéticos y en condiciones controladas con el propósito de regenerar plantas enteras. Se menciona que cualquier segmento de la planta puede ser un explante, y se clasifican en explantes organizados que hacen referencia a meristemas, ápices caulinares, yemas, embrión, ovulo, antera etc., y en explantes no

organizados que se refiere a segmentos del órgano que lo conforman. (Abdelnour & Muñoz, 2005)

El cuarto de cultivo en el que se trabaja debe ser climatizado, además de presentar control sobre todos los parámetros físicos que este posea como la temperatura, la luz y la humedad. Las condiciones de asepsia deben mantenerse a lo largo de todas las etapas del proceso del cultivo “*in vitro*”. (Doria, 2010)

2.2.3 Cultivo “*in vitro*” de especies forestales

A nivel de investigación, Ecuador es un país que está en pleno auge en algunas ramas científicas específicas. Sin embargo, la propagación “*in vitro*” es una herramienta que se lleva desarrollando en el país durante muchos años, existiendo diversas instituciones tanto públicas como privadas dedicadas a la micropropagación de plantas a nivel comercial y de investigación.

Para la economía mundial la madera es de vital importancia. La superficie mundial ocupada por los recursos forestales se estima entre 2500 a 2800 millones de hectáreas, lo que equivale a una cuarta parte de la superficie terrestre. De acuerdo al informe emitido por la FAO en el Congreso Forestal realizado en Sudáfrica 2015, la tasa de deforestación neta mundial se ha reducido en más de la mitad, sin embargo la sobreexplotación de los bosques en años anteriores dejan daños indiscutibles hacia el medio ambiente. (FAO, 2016)

En Ecuador la deforestación es una problemática que demanda acciones concretas y sostenibles por parte de las autoridades competentes. Revisando el histórico de la deforestación se encuentra que para el periodo 1990 – 2000 la deforestación promedio fue de 89.944 ha/año para una tasa de deforestación de -0.71 %, mientras que para el período 2000 - 2008 la deforestación promedio fue de 77.647 ha/año para una tasa de -0.66%. Por otro lado, durante el período 2008-2012 la deforestación fue de 65.880 ha/año para una tasa de -0,54%. Se estimó que para el periodo 2013-2018

existió una tendencia hacia una disminución en la tasa de deforestación. La tendencia a la disminución de la deforestación establece un nivel de 55,000 ha de deforestación, la cual se considera la base para la reforestación mínima que debe seguir el MAE en el programa de Restauración Forestal. (MAE, 2014)

La propagación vegetativa ha tenido un papel importante en la multiplicación de árboles elite (Abdelnour & Muñoz, 2005) sin embargo, se ha observado que las estacas pierden la capacidad para enraizar a medida que el árbol de origen es más viejo. Las técnicas de micropropagación han demostrado ser una importante alternativa viable para la solución de algunos de los problemas anteriormente mencionados.

2.3 Arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*)

2.3.1 Origen

El arrayán negro es descrito como árbol nativo de la serranía del Ecuador. Es una especie propia de bosques húmedos en las laderas altas de las montañas, que crece principalmente por encima de 2500 metros sobre el nivel del mar.

2.3.2. Clasificación taxonómica

Según (Gaibor, 2000) taxonómicamente el arrayán se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División Fanerógama; Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Género: *Myrcianthes*

Especie: *Myrcianthes rhopaloides*

2.3.3 Distribución geográfica

Esta especie se encuentra reportada en montañas de Costa Rica, y Panamá, Andes de Venezuela, Ecuador y Bolivia. En Ecuador se localiza a lo largo de la región andina, desde los 2500 hasta los 3500 msnm. (Gaibor, 2000)

2.3.4 Morfología

El arrayán negro es un árbol de tamaño grande, de 20 m de altura aproximadamente, con un diámetro de 50 a 70 cm, su corteza presenta parches rojizos de color claro, que se desprende en láminas. Hojas simples, opuestas, ovadas y coriáceas, con haz verde, oscuro brillante y envés más claro y se caracteriza por ser una especie perenne. Posee flores con pétalos blancos y manchas rosadas en los botones; la corola tiene de 4 a 5 pétalos con numerosos estambres cremosos, con un ovario ínfero de 5 lóculos con 1 a 3 semillas en cada lóculo, sus semillas son sin endosperma o este es escaso y fino. El fruto es una drupa negra-violeta de 1 cm de diámetro; cuando madura, es comestible para el hombre y los animales, tiene un sabor dulce agradable y fructifica por los meses de enero hasta marzo. (Palacios, 2011)

2.3.5 Importancia

El arrayán negro es una especie propia de bosques bien conservados y tiene un crecimiento muy lento. Es una especie que requiere de suelos fértiles y un ambiente húmedo a su alrededor. Por tal razón son ideales para ser sembrados a orillas de quebradas y otros cursos de agua, sin embargo, su crecimiento es muy lento, por lo que se le debe proporcionar las condiciones óptimas para un buen desarrollo. (Jaramillo, 2013).

2.3.6 Usos

(Palacios, 2011), describe las siguientes propiedades físicas y mecánicas del arrayán en el Ecuador:

- Posee una alta densidad y resistencia al cizallamiento y una mediana resistencia a la compresión.
- Es una especie recomendada para elementos estructurales de construcción civil como puertas, ventanas, muebles, chapas decorativas y parquet.
- Se lo utiliza para elaborar carbón de excelente calidad.
- Tiene frutos comestibles para el ser humano y animales.

2.4 Cultivo “*in vitro*” de plantas

El cultivo “*in vitro*” de plantas, también conocido como micropropagación, es una herramienta útil aplicada en la obtención de material vegetativo, ya que tiene el potencial de producir plantas enteras de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Patiño, 2011). Presentando ciertas ventajas como la multiplicación masiva de plantas, rescate de especies en vías de extinción, producción de plantas libres de enfermedades, generación de variabilidad genética, reducción en el tiempo de multiplicación y en el espacio requerido para el fin, conservación de germoplasma, producción de metabolitos secundarios entre otros. Con esta herramienta de carácter científico se contribuye de manera sustancial con la fomentación de la provincia y del país hacia un desarrollo sustentable. (Araya, 2006)

Esta técnica es posible de realizarse gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban. (Olmos & Luciani, 2010)

La micropropagación puede abordarse cuando los métodos convencionales no son factibles debido a conflictos técnicos, tiempo de multiplicación muy largo y/o el coste de producción elevado. En la industria de la micropropagación el coste efectivo del

proceso y la fidelidad genómica del resultado de los micropropágulos son dos hechos muy importantes que deben ser tomados en cuenta. (Qureshi & Saxena, 1992)

2.5 Etapas de la micropropagación

Durante el proceso de micropropagación de cualquier especie vegetal se establecen 5 fases o etapas, en cada una de ellas se puede aportar o simplificar acciones de acuerdo a la característica de la planta en cuestión. A continuación, se detallarán en términos generales cada una:

- Etapa 0: Selección de la planta madre y preparación
- Etapa I: Inicio del cultivo
- Etapa II: Multiplicación
- Etapa III: Elongación y enraizamiento
- Etapa IV: Aclimatación

2.5.1 Etapa 0. Selección de la planta madre y preparación

La etapa presente fue propuesta por Maene & Debergh en la que se incluyen varias estrategias a tomar en cuenta previas a la etapa I, como son los problemas de contaminación al introducir material de campo o la elección adecuada del explante. En cualquier proceso de propagación “*in vitro*” se recomienda una selección minuciosa del material de partida, es decir, que sea procedente de una planta sana. Es imprescindible que las plantas sean identificadas correctamente, además de recolectar el material suficiente que garantice la máxima representación de diversidad genética de la especie. (George, Hall, & De klerk, 2008)

A la hora de seleccionar a la planta madre se deben tener en cuenta varios criterios como el genotipo y estado físico, el tipo de explante a utilizar, la edad fisiológica del explante, la época de recolección y el tamaño del mismo. Estas variables son muy

importantes pues de ellas dependerá la respuesta del explante durante las siguientes etapas de micropropagación. (Cano, 2013)

2.5.2 Etapa I. Inicio del cultivo

Por definición el cultivo “*in vitro*” debe ser un cultivo axénico, es decir libre de microorganismos que acompañan de manera natural a la planta y por ende suponen una fuente de contaminación. Una vez se haya elegido la planta madre, se procede a eliminar agentes infecciosos exógenos y endógenos con la ayuda de diversos tipos de compuestos esterilizantes, posteriormente es imprescindible lavar bien el material vegetal con agua destilada estéril para eliminar residuos del compuesto esterilizante de manera completa. (Sorasán., *et al*, 2006)

Otro problema que subyace además de la esterilización del material vegetal, es la aparición de zonas pardas en el explante como consecuencia de la liberación de fenoles, taninos y productos de la peroxidación de lípidos. Para prevenir esta dificultad, se recurre al empleo de agentes antioxidantes como carbón activado, ácido cítrico, cisteína o ácido ascórbico. (Cano, 2013)

Una vez realizada la correcta desinfección del explante se procede al cultivo del mismo, gracias a los avances tecnológicos y científicos existen una amplia gama de medios de cultivo a emplearse en función de los requerimientos de la especie.

2.5.3 Etapa II. Multiplicación

La presente etapa tiene como objetivo principal incrementar el número de propágulos por explante. Existen diversas rutas para la multiplicación de plantas, sin embargo, cuando la finalidad es la obtención de plantas leñosas a gran escala es casi obligado recurrir a organogénesis directa a partir de segmentos nodales, ya que con este tipo de explante es altamente probable que se mantenga la fidelidad genética de la especie en cuestión, a lo largo de todo el proceso de micropropagación. (Cano, 2013)

Se debe tener en cuenta que durante los dos periodos de la fase de multiplicación es necesario establecer diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, para lograr el objetivo de la etapa, además de tomar en cuenta la composición del medio basal. Durante el periodo de inducción es necesario el empleo de concentraciones elevadas de auxinas más que citoquininas para favorecer la desdiferenciación, y en el segundo periodo de multiplicación se requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular. En este caso, el sistema es más dependiente de citoquininas. (Olmos & Luciani, 2010)

2.5.4 Etapa III. Elongación y enraizamiento

La fase de multiplicación supone un ciclo cerrado que permite generar de forma potencial un nuevo número de brotes. Es evidente que un cierto número de propágulos deben ser extraídos de dicho ciclo para completar su regeneración mediante la inducción de raíces. El proceso de enraizamiento es una etapa morfológicamente compleja cuya inducción es dependiente de una determinada longitud del explante. Por tal razón es que la etapa III se divide en una primera fase de elongación y una posterior de inducción a la rizogénesis. La elongación supone la formación de raíces y una manipulación más sencilla del explante. (Sorasan., *et al*,2006)

El uso de citoquininas en la etapa de multiplicación inhibe con frecuencia la formación de raíces, lo que hace necesario buscar alternativas viables para la inducción a la rizogénesis como transferir los explantes del medio del cultivo que inicialmente tenían citoquininas a un medio basal con auxinas. (Cano, 2013)

2.5.5 Etapa IV. Aclimatación

Esta etapa es fundamental en el proceso de propagación “*in vitro*”, ya que de la manera en la que se transfieren las plantas desde el ambiente “*in vitro*” a condiciones “*ex vitro*” condiciona enormemente el éxito del proceso completo de

micropropagación. Existen dos razones básicas por las que esta etapa debe ser realizada de forma minuciosa, la primera es el riesgo de estrés hídrico, ya que la planta se ha desarrollado en un ambiente en que la humedad relativa es prácticamente del 100%, sus estomas suelen ser atípicos y su cierre es incompleto bajo condiciones de humedad relativa, de esta manera las plantas pierden agua de forma rápida cuando son transferidas a condiciones “ex vitro”. Y la segunda es la adaptación nutricional y fotosintética de la plántula, ya que las plantas micropropagadas no depende por completo de su propia fotosíntesis, debido a que se les ha suministrado una fuente de carbono y han sido mantenidas en condiciones de baja intensidad lumínica, lo que las hace muy sensibles a daños fotooxidativos. Por los factores anteriormente mencionados se deben buscar alternativas viables que permitan obtener el máximo porcentaje de plantas aclimatadas, es decir de condiciones heterótrofas a autótrofas. (Olmos & Luciani, 2010)

2.6 Medio de Cultivo

El crecimiento y desarrollo “*in vitro*” de una planta está determinado por una serie de factores complejos como el estado fitosanitario y constitución genética de la planta y el medio de cultivo empleado para su crecimiento. Este, consiste en una mezcla de sales inorgánicas, fuente de carbono, aminoácidos, vitaminas, agua y un agente gelificante que le dará consistencia.

Existen varias formulaciones en el mercado, dependiendo del objeto de estudio que se tenga, entre los medios de cultivo universales se tiene al medio Knudson(1946) ideal para orquídeas; Murashige & Skoog (1962) apto para la mayoría de las especies, caracterizado por poseer una alta concentración salina; Woody Plant Medium (1980) utilizado en plantas leñosas y arbustivas; cada uno de ellos está elaborado a partir de diferentes compuestos minerales a diferentes concentraciones. (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2010). Al medio de cultivo se le puede añadir fitohormonas u otras sustancias como agentes antixodiantes en función de la situación morfogénica por la que atraviesen las plántulas en crecimiento.

A continuacion se detallan los componentes de un medio de cultivo. (Tabla 1)

Tabla 1

Composicion de medios de cultivo para celulas vegetales

Componente	Caracteristica	Ejemplo
Agua	Es de vital importancia la calidad del agua empleada para realizar los medios de cultivo la cual debe ser destilada y tener la mayor calidad posible (desionizada)	Agua destilada
Carbohidratos	La nutrición que se desarrolla en condiciones “ <i>in vitro</i> ” en los diferentes órganos y tejidos son heterótrofos, con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica, por lo cual resulta indispensable añadir azúcares a los medios de cultivo como fuente de energía y reguladores osmóticos	Sacarosa Glucosa Maltosa Rafinosa
Vitaminas	Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo, favoreciendo el crecimiento celular y son requeridas en pequeñas cantidades.	Tiamina Acido Nicotínico Piridoxina Mioinositol
Nutrientes minerales	Se utilizan en soluciones madre concentradas, para la preparacion de los medios nutritivos. Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro y micronutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras	NH ₄ NO ₃ K NO ₃ Mg SO ₄ .7H ₂ O KH ₂ PO ₄ Na ₂ EDTA.2H ₂ O Otros...
Fitohormonas	Comúnmente llamadas reguladores de crecimiento, son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo, se encuentran muy activas y presentes en pequeñas cantidades. Auxinas promueven la elongación celular, la formación de callos y de raíces adventicias; inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, la embriogénesis en suspensiones celulares Citoquininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el	AUXINAS -AIA: Ac. indol 3 – acético -ANA: Ac. naftalenacético -AIB: Ac indol 3-butírico CITOQUININAS -BAP: 6 - bencilaminopurina -KIN: Kinetina -ZEA: Zeatina GIBERELINAS -GA3: Ac. Giberélico

desarrollo de los tejidos vegetales

Componente	Característica	Ejemplo
Etileno	Hidrocarburo gaseoso, considerado como un producto de degradación metabólica que ha sido implicado en la maduración, abscisión, dormancia, floración y otras respuestas	Etileno
Compuestos Antioxidantes	En cultivos “ <i>in vitro</i> ”, especialmente en plantas leñosas y algunas monocotiledóneas, la presencia de compuestos fenólicos dentro del medio emitido por los explantes, puede oxidarlos causando en ennegrecimiento del medio y la muerte de los mismos	Ácido cítrico Ácido ascórbico Carbón activado Cisteína
Agente gelificante	La efectividad del medio de cultivo depende tanto de los ingredientes básicos como del agente gelatinizador.	Agar: polisacárido con una elevada masa molecular Gelrite: polisacárido compuesto de ácido glucorónico, ramnosa, glucosa y residuos O-acetil Phytigel: producido a partir de la fermentación bacteriana compuesto de ácido glucorónico, ramnosa y glucosa
pH del medio	La influencia del pH del medio nutritivo en el cultivo “ <i>in vitro</i> ” es muy importante, pues de este dependen muchos factores. El pH varía con el autoclavado, sufriendo generalmente un descenso de 0.3 a 0.5 unidades	pH en el rango 5.5 a 5.8 es apto para el crecimiento

Fuente: (Sorasan, y otros, 2006)

2.6.1 Esterilización de los medios de cultivo

La esterilización generalmente tiene lugar en autoclave, deben ser esterilizados los medios de cultivo, cristalería y cualquier otro material a utilizarse en el proceso de

micropropagación, con la finalidad de garantizar la esterilidad del cultivo (Patiño, 2011). El tiempo de autoclavado es de 15 minutos a 121 °C y 103.5 Pa.

2.7 Condiciones ambientales para la incubación

El crecimiento y desarrollo de plántulas “*in vitro*” se puede mejorar al controlar algunos factores físicos, que permite reducir los costos de producción significativamente debido a que se logran disminuir algunas anomalías morfofisiológicas, promoviendo un desarrollo más vigoroso de la especie con la que se está trabajando, estos factores principales a controlar son:

Temperatura

El rango de temperatura óptimo de crecimiento del explante varía entre 25 – 28°C.

Fotoperiodo

El tiempo de exposición de los explantes influye sobre la diferenciación de los órganos, además de jugar un papel importante en la acción de los reguladores de crecimiento, (Villalobos, Leung, & Thorpe, 1984). El ciclo de luz/oscuridad es de 16/8 horas.

Humedad

La humedad atmosférica debe ser elevada del 80 a 90 %. (Marcucci, Gallo, Zelener, Torales, & Sharry, 2010).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el capítulo presente, se describe la metodología de desinfección de semillas para la germinación “*in vitro*” de arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*).

3.1 Materiales y equipos

Para la ejecución de la presente investigación se requirió de materiales y equipos de campo, y laboratorio, los que se encuentran detallados a continuación (Tabla 2).

Tabla 2

Materiales - equipos de campo y laboratorio

Material Vegetativo	
Frutos de arrayán	Semillas de arrayán
Implementos de campo	
Red de semillas	Tierra negra
Frascos de vidrio	Humus
Etiquetas	Tierra de paramo
Guantes de caucho	Regadera
Terraclor ® 75%	Vitavax ® 400
Tachigaren ® 36 LS	Cabrio ® Top
Cigaral ® 35 SC	Sustrato Franco Arenoso
Equipos de Laboratorio	
Balanza de precisión	Agitador magnético
Cámara fotográfica	Estereomicroscopio
Cámara de flujo laminar	Autoclave
Estufa	Agitador Magnético
pH-metro	Esterilizador de pinzas eléctrico
Cooler	Termómetro
Destilador de agua	Estereomicroscopio
Cocineta eléctrica	
Reactivos de Laboratorio	

Medio Basal MS (Ducheffa Biochemie)	Ácido Giberélico(AG3)
Etano 70%	Ácido naftalenacetico (ANA), (C12H10O2)
Agua destilada esteril	Benzil amino purina (BAP), (C12H11N5).
Sacarosa	Kinetina, (C10H9N5O)
Cisteína	Cloro comercial, (NaClO)
Regulador de pH	Hidróxido de sodio, (NaOH)
Detergente comercial	Tween 20, (C58H114O26)
Phytigel	Benomyl, (C14H18N4O3)
Carbón activado	Bicloruro de mercurio, (HgCl2)

Material de Laboratorio

Tubos de ensayo	Vasos de precipitación.
Pipetas	Frascos
Mecheros	Pinzas
Probetas	Bisturí
Algodón	Matraz
Tapones de goma	Gasas
Papel filtro estéril	Jeringas
Filtros desechables	Papel empaque

Fuente: La autora

3.2 Caracterización del sitio experimental

3.2.1 Ubicación

El estudio experimental se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, perteneciente a la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte, en la ciudad de Ibarra, Ecuador.

3.2.2 Características del área de muestreo

La recolección de los frutos se realizó a partir de árboles sanos, fuertes y vigorosos ubicados en el “Bosque de los Arrayanes” situado a 2.830 msnm en la comunidad de Monteverde, perteneciente a la parroquia urbana San José, a 11 km de San Gabriel. (Fig. 1)

El área natural cuenta con una extensión aproximada de 16ha, posee un clima templado frío, con una temperatura promedio anual de 12.5 ° C, y una precipitación promedio de 945 mm. Sus suelos son de formación temprana y se los clasifica dentro del orden de los inceptisoles o suelos negros con abundante humedad (GPC, 2013).

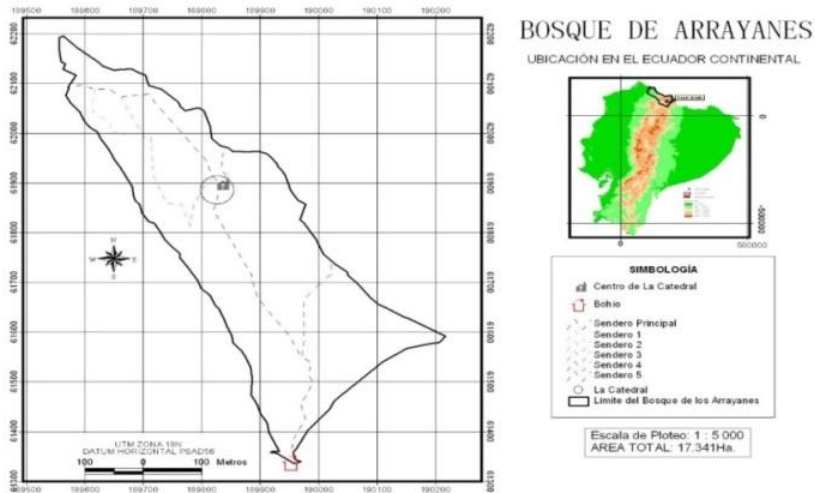


Figura 1. Mapa “Bosque de los Arrayanes”

3.3 Metodología de campo

3.3.1 Fenología del Arrayán

Para la selección de los árboles élite se tomó en cuenta como un parámetro importante las características bioclimáticas de la zona y estableciéndose un calendario fenológico del arrayán, en el cual se determinó con exactitud su época de floración y fructificación, que resultó de trascendental importancia a la hora de establecer y planificar la época de cosecha de los frutos. (Tabla. 3). Este paso es muy importante ya que en el queda establecido con precisión la época de disponibilidad de frutos.

Tabla 3
Calendario de recolección de semillas de arrayán

Especie:	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Arrayán (<i>Myrcianthes rhopaloides</i>)												
Floración y fructificación												
Recolección												

Fuente: La autora

En el mes de diciembre del 2015 se realizó una evaluación fenotípica en el “Bosque de los Arrayanes” (Fig. 2) a fin de obtener árboles élite, es decir, árboles sobresalientes en una o varias características, con el objetivo de emplearlos como progenitores en las poblaciones de producción.

3.3.2 Selección de frutos a partir de árboles élite

Los frutos de arrayán fueron recolectados de 10 árboles de edad de mediana, con una altura que oscila entre los 15 y 20 metros. Los árboles fueron seleccionados en base a sus características fenotípicas: rectos y cilíndricos; por su estado fitosanitario: libre de plagas y enfermedades; y con una copa grande-densa, con el propósito de maximizar la dispersión y producción de semillas. Debido a la altitud de los árboles seleccionados, se esperó a que los frutos maduraran de forma natural y cayeran al suelo para proceder a su recolección. La preservación de la diversidad genética de la especie fue certificada, mediante la recolección de frutos de diferentes fuentes semilleras.



Figura 2. Bosque de los Arrayanes

La recolección de los frutos se llevó a cabo durante el mes de marzo del 2016. Debido a la altura de la especie se esperó a que los frutos maduraran y cayeran de forma natural al suelo, para proceder a su recolección (ANEXO 1).

3.3.3 Caracterización fenotípica de frutos y semillas

Una vez obtenidos los frutos negros – violáceos se realizó la caracterización fenotípica de los mismos, analizando variables como diámetro, longitud, peso, grosor de la pulpa, sabor, color y textura (ANEXO 2). Debido a la existencia encontrada en la diversidad de tamaños del fruto, se clasificó en cuatro grupos; grandes, medianos, pequeños y muy pequeños de acuerdo al diámetro (cm) que poseían. (ANEXO 3)

Posteriormente, se retiró la pulpa del fruto de forma manual para eliminar el mesocarpio carnoso y el mucílago existente; el cual puede contener diversidad de agentes contaminantes, obteniendo así, una semilla totalmente limpia y carente de los restos del fruto (Fig. 3).



Figura 3. Despulpado manual del fruto

3.3.4 Almacenamiento de semillas

Después de retirar manualmente la pulpa de todos los frutos, y caracterizar fenotípicamente las semillas (ANEXO 4), se procedió a lavar las semillas con agua a fin de eliminar completamente el mucílago existente. Posteriormente se dejó secar bajo sombra para eliminar el exceso de agua. Finalmente, se añadió una cucharada de VITAVAX® 400 (6g) como agente protectante, y se almacenó en la nevera en frascos de vidrio a una temperatura de 4 °C (ANEXO 5).

3.3.5 Análisis de calidad de semillas

De acuerdo a las normas internacionales (ISTA, 1993) se estableció cuatro parámetros a ser analizados, mediante los cuales se pudo verificar la calidad de las semillas empleadas en la presente investigación, los cuales se encuentran detallados a continuación:

Origen y autenticidad

El origen de las semillas fue comprobado con la recolección *in situ* y con la certificación de que provienen de árboles parentales élite, no muy jóvenes ni sobremaduros. Los individuos muy jóvenes, así como individuos viejos, pueden producir semillas estériles.

La autenticidad se aseguró mediante un examen general de las características externas de las semillas como tamaño, peso, color, brillo, etc.; es decir, mediante una caracterización fenotípica a las semillas. (ANEXO 6)

Pureza de la semilla

La pureza de la semilla se determinó mediante la relación entre el peso de la semilla pura sin otras especies y materia inerte y el peso total. (ISTA, 1993)

$$P = \frac{\text{Peso de la semilla pura}}{\text{Peso total de la muestra}} \times 100$$

Ensayo de germinación en campo

Los ensayos de germinación se hicieron con semillas puras, escogidas del ensayo de pureza.

Se utilizaron 400 semillas, las mismas que fueron separadas al azar y se subdividieron en 4 lotes de 100 semillas cada uno (ANEXO 7).

Numero de semillas viables

Se obtuvo al calcular el número de semillas/kg y el porcentaje de germinación, mediante la siguiente fórmula (ISTA, 1993):

$$X = NxG$$

Donde;

X= Numero de semillas viables/Kg

N= número de semillas /Kg

G= Porcentaje de germinación

3.3.6 Germinación en campo de arrayán

Para la germinación en campo, tras la obtención de semillas viables, estas fueron secadas durante 3 horas con el objetivo de eliminar el exceso de humedad, ya que se trata de una especie extremadamente sensible a la sequedad. Una vez secas, se añadió 4 gramos en polvo de VITAVAX® 400 en 1kg de semillas de arrayán como método de acción sistemática y protectante (ANEXO 8). Este fungicida controla de forma efectiva los hongos presentes en las primeras etapas del cultivo de las semillas. (Inga, 2012)

Se preparó un sustrato franco arenoso 3:2:1 (suelo del lugar: suelo negro de páramo: abono orgánico) en el cual se realizó la siembra de las semillas. Se formó surcos de siembra en la platabanda, tomando en cuenta que la profundidad de los mismos no sea superior al doble del tamaño de la semilla, para que el tiempo de germinación sea menor. En la desinfección del sustrato se utilizó el fungicida TERRACLOR® 75%, en una concentración de $10\text{cm}^3 / 20\text{l}^{-1}$. Con la ayuda de una regadera se humedeció el sustrato a una profundidad de unos 8 cm aproximadamente (ANEXO 9).

La siembra de las semillas se realizó el día 26 de marzo del 2016. Las semillas se ubicaron a una distancia de 2 cm aproximadamente, tomando en cuenta la posición de

la radícula. Se tapó las semillas con un sustrato arenoso que constó de humus, cascarilla de arroz quemado y suelo franco arenoso que facilitó la emergencia de la plántula, debido a su ligereza. (Inga, 2012) (ANEXO 10).

Una vez sembradas las semillas, se realizó un riego abundante ($10\text{l}^{-1}/\text{m}^2$) pasando un día. Con el paso del tiempo se observó el inicio de la germinación dando origen a las nuevas plántulas.

Las plántulas obtenidas de la germinación de semillas de arrayán fueron fumigadas cuando alcanzaron una altura superior a los 2 cm, según se estimó conveniente, con una mezcla de un fungicida (TACHIGAREN® 36 LS), bactericida (CABRIO® TOP) e insecticida (CIGARAL ® 35 SC), tomando en cuenta los requerimientos de la planta. (Inga, 2012) (ANEXO 11).

Una vez obtenidas las plantas madre de 10 meses de edad (ANEXO 12) , se realizó una evaluación fenotípica de las mismas, en un total de 20 plantas seleccionadas al azar, con la ayuda de papel milimetrado, regla y cinta métrica tomando en cuenta variables como: altura total de la planta (cm), número de yemas axilares, número de hojas en el tallo principal, distancia entre nudos (cm), tamaño de las hojas (cm), color de las hojas, tamaño de yemas (cm), número de hojas en cada yema y el tamaño de la yema terminal (cm).

3.4 Metodología para la germinación “*in vitro*” de arrayán

Después de la recolección de semillas de arrayán, éstas fueron trasladadas hasta el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, en el cual se retiró manualmente la pulpa del fruto para obtener las semillas y suministrarles un adecuado almacenamiento, las mismas que posteriormente fueron sometidas a varios tratamientos con soluciones desinfectantes a varias concentraciones. (Tabla 4)

Tabla 4

Tratamientos de desinfección aplicados a las semillas de arrayán

TIPO DE EXPLANTE	TRATAMIENTOS DE EXPLANTES					
	DESINFECCIÓN FUERA DE LA CFL ^(*)		DESINFECCIÓN DENTRO DE LA CFL ^(*)			
	Producto	Tiempo	Tratamiento	Producto	Concentración	Tiempo
SEMILLAS	Detergente (6g/L) + 6 gotas de tween 20	20 min	1	Alcohol	70 %	1 min
				Cloro comercial	1% (c.a)	15 min
			2	Alcohol	70%	1 min
				Cloro comercial	5 % (c.a)	15 min
			3	Benlate	1,5g	24 H
				HgCl ₂	1g	16 H
			4	Benlate	1,5g	24 H
				HgCl ₂	2g	16 H

*CFL: Camara de flujo laminar

Fuente: (Eliécer, 2014), modif., & Limaico, (2017)

Todos los tratamientos descritos en la tabla anterior se realizaron sobre una muestra de 50 embriones cada uno, el objetivo principal de estos fue lograr un tratamiento con un amplio espectro de desinfección que permitió establecer un protocolo de germinación “*in vitro*” de arrayán, mediante el aislamiento de embriones. A continuación se detalla cada uno de los tratamientos realizados durante la presente investigación.

3.4.1 Tratamiento de lavado a las semillas almacenadas

Para todos los tratamientos de desinfección empleados durante la presente investigación se aplicó la misma metodología de lavado a las semillas seleccionadas.

Se tomó aproximadamente 70 semillas para cada tratamiento que se encontraban almacenadas en la nevera a 4°C, estas se las lavó con agua de la llave, a fin de eliminar cualquier impureza existente (Fig. 4).



Figura 4. Semillas seleccionadas para el tratamiento de desinfección

Se procedió a lavar las semillas en una mezcla que constó de agua destilada + detergente (6g/L) + 6 gotas de tween 20, durante 20 minutos con agitación constante (Fig. 5)

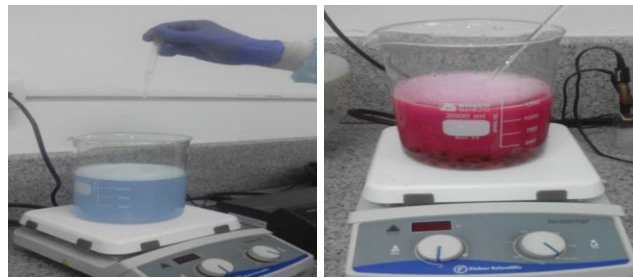


Figura 5. Semillas sumergidas en detergente (6 g/L) + tween 20 (6 gotas)

A continuación, transcurrido el tiempo establecido de lavado se procedió a lavar las semillas con agua destilada estéril por tres veces (Fig. 6)



Figura 6. Lavado de las semillas con agua destilada estéril

3.4.2 Tratamientos de desinfección de las semillas

A partir de esta etapa todos los tratamientos de desinfección variaron tanto en agente desinfectante como en la concentración de los mismos, sin embargo, el tiempo de exposición no vario de un tratamiento a otro, tomando en cuenta el mismo agente desinfectante (NaClO ó HgCl₂).

Esto se realizó con la finalidad de evaluar y analizar el mejor tratamiento de desinfección, es decir, aquel que abarcó un mayor espectro de semillas sanas. Cabe recalcar que todos los procedimientos posteriores se realizaron siempre dentro de la CFL (Cámara de Flujo Laminar) con el propósito de precautelar al máximo la asepsia de los tratamientos empleados.

3.4.2.1 Tratamiento de desinfección con cloro comercial (NaClO) al 1% y 5%

- Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a sumergir 70 semillas por tratamiento (T1 y T2) en una mezcla de etanol al 70 % durante 1 minuto (ANEXO 13).
- Se enjuagó con agua destilada estéril por tres veces.
- Nuevamente se sumergió a cada grupo de semillas en una mezcla de NaClO al 1% (T1) y al 5% (T2), respectivamente, durante 15 minutos (ANEXO 14).
- Se enjuagó con agua destilada estéril por tres veces, con la finalidad de eliminar cualquier residuo del agente desinfectante empleado (NaClO).

3.4.2.2 Tratamiento de desinfección con HgCl₂ al 1g/L y 2 g/L

- En la cámara de flujo laminar se sumergieron 70 semillas por tratamiento (T3 y T4) en una mezcla de Benlate (1,5g/L) durante 24 horas (ANEXO 15).
- Se enjuagó con agua destilada estéril por tres veces.
- Nuevamente se sumergió a cada grupo de semillas en una mezcla de HgCl₂ al 1 g/L (T3) y 2g/L (T4) durante 16 horas (ANEXO 16).

- Se enjuagó con agua destilada estéril por tres veces, con la finalidad de eliminar cualquier residuo del agente desinfectante HgCl₂.

3.4 Metodología de siembra “*in vitro*”

El material vegetal obtenido fue colocado en papel absorbente estéril con la finalidad de eliminar el exceso de agua, posteriormente se procedió a aislar los embriones tomando en cuenta todas las normas de bioseguridad y manejo aséptico de material tanto instrumental como vegetal. El aislamiento de los embriones se lo realizó de forma cautelosa para evitar un posible daño fisiológico al embrión (ANEXO 17).

Los embriones aislados fueron sembrados en tubos de ensayo o frascos de vidrio que contenían 30 ml de medio de cultivo MS ½ con vitaminas de la casa comercial Duchefa Biochemie (ANEXO 18).

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con Pythagel (2,5 g/L) como agente gelificante, sacarosa (20 g/L) como fuente de carbono, ácido ascórbico (100 mg/L) + cisteína (25 ó 50 mg/L) o carbón activado (1 ó 2 g/L) como agentes antioxidantes y como reguladores de crecimiento se utilizó ANA (1 ml /L), Kinetina (1ppm) y AG3 (2 mg/L), el medio de cultivo mencionado anteriormente se utilizó independientemente del tratamiento de desinfección que se aplicó a las semillas de arrayán en la presente investigación (ANEXO 19).

Una vez sembrados los embriones en el medio de cultivo, fueron almacenados en la oscuridad con el fin de evitar problemas de fenolización u oxidación del explante, a una temperatura que oscila entre los 16 – 18°C, la cual fue controlada de forma permanente. Cuando se observaron principios de germinación es decir emergencia de la plúmula, los embriones o explantes fueron trasladadas al cuarto de crecimiento (ciclo de luz/oscuridad 16/8 horas) (ANEXO 20).

3.5 Tratamientos de agentes antioxidantes

Una vez establecido el mejor tratamiento de desinfección, es decir aquel tratamiento que abarco un mayor espectro de explantes sanos (T3 y T4), se procedió a valorar la efectividad de agentes antioxidantes para evitar la fenolización de los embriones y como consecuencia su necrosamiento y muerte. Los tratamientos empleados para la presente investigación se describen a continuación (Tabla 5).

Tabla 5

Tratamientos con agentes antioxidantes

Tratamiento	Agente antioxidante	Concentración	Medio de cultivo
T1	Carbón activado	1 g	MS ½ con vitamina de la casa comercial Duchefa Biochemie Pythagel (2,5 g/L) Sacarosa (20g/L) ANA (1 ml /L), Kinetina (1ppm) AG3 (2mg/L),
T2	Carbón activado	2 g	
T3	Cisteína	25 mg /L	
T4	Cisteína	50 mg/L	

Fuente: La autora

La siembra de los embriones se realizó como se describió inicialmente, con la única diferencia de que en este caso todos los medios de cultivo estarán suplementados con dos agentes antioxidantes: Carbón activado (1 y 2 g/L) y cisteína (25 y 50 mg/L) además de las sustancias anteriormente mencionadas (ANEXO 21).

3.6 Aclimatación de las vitroplantas

Una vez superados los problemas de contaminación y fenolización de los embriones, se obtuvieron las vitroplantas, las cuales se sometieron a un proceso de aclimatación, es decir, se transfirieron las plantas desde el ambiente “*in vitro*” a condiciones “*ex vitro*”. Este proceso se realizó de forma minuciosa puesto que es una etapa en la cual se condiciona enormemente el éxito del proceso de germinación “*in vitro*”. Primeramente las vitroplantas fueron lavadas con agua destilada estéril a fin de eliminar cualquier residuo del medio de cultivo.

Adicionalmente las plantas obtenidas de la germinación “*in vitro*” se sumergieron (solo sus raíces) durante 5 minutos en una mezcla de VITAVAX® 400 (1g/L) como agente protectante; las vitroplantas fueron sembradas en un sustrato franco arenoso 3:2:1 (suelo del lugar: suelo negro de páramo: abono orgánico), el mismo sustrato que se utilizó para valorar la germinación en campo del arrayán, y fueron regadas por goteo de acuerdo a los requerimientos de la planta (ANEXO 22).

3.7 Análisis estadístico

En la presente investigación se realizó dos tipos de análisis. El primero corresponde a una estadística descriptiva para la caracterización fenotípica de frutos y semillas; y el segundo, a un análisis estadístico. Se utilizó el Software SPSS, versión 23, el cual permitió realizar diferentes pruebas, como: análisis de distribución de los datos, ajuste del modelo estadístico, estudio de normalidad de los residuos, pruebas de homogeneidad e independencia de residuos; y además, se realizó una regresión lineal para calcular el estadístico de Durbin Watson. Todos estos análisis permiten realizar el análisis de varianza para lograr comprobar la hipótesis del trabajo.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización fenotípica de frutos

Tras la caracterización fenotípica realizada a los frutos se obtuvo una estadística descriptiva de los mismos; en los cuales se analizaron variables como el peso inicial (g), longitud (cm), diámetro (cm), grosor de la pulpa (mm), color del fruto y textura.

Las características fenotípicas medibles del fruto se las obtuvo mediante la media de las medidas obtenidas en un total de 10 frutos por tamaño, es decir, fueron separados en tamaño grande, mediano, pequeño y muy pequeño obteniendo una media de los parámetros anteriormente mencionados, los mismos que se encuentran detallados a continuación (Tabla 6).

Tabla 6
Resultados de la caracterización fenotípica del fruto de arrayán

Fruto	Grande	Mediana	Pequeña	Muy Pequeña
Peso inicial (g)	1,15	0,92	0,739	0,676
Longitud (cm)	2,34	1,81	1,6	1,34
Diámetro (cm)	7,71	6,63	4,61	4,5
Grosor de la pulpa (mm)	<1	<1	<1	<1

Fuente: La autora

Se puede describir a los frutos de tamaño grande como una drupa comestible de color negro violáceo de forma ovoide no definida con un peso \bar{X} de 1,15g, una longitud \bar{X} de 2,34cm, un diámetro \bar{X} 7,71cm y un grosor de la pulpa < 1mm.

Los frutos de tamaño mediano se caracterizaron como una drupa comestible de color negro violáceo de forma ovoide no definida con un peso \bar{X} de 0,92g, una longitud \bar{X} de 1,81cm, un diámetro \bar{X} 6,63cm y un grosor de la pulpa < 1mm.

Por su parte los frutos de tamaño pequeño se identificaron como una drupa comestible de color negro violáceo de forma ovoide no definida con un peso \bar{X} de 0,739g, una longitud \bar{X} de 1,6cm, un diámetro \bar{X} 4,61cm y un grosor de la pulpa < 1mm.

Por último los frutos de tamaño muy pequeño se determinaron como una drupa comestible de color negro violáceo de forma ovoide no definida con un peso \bar{X} de 0,676g, una longitud \bar{X} de 1,34cm, un diámetro \bar{X} 4,5cm y un grosor de la pulpa < 1mm.



Figura 7. Diversidad de tamaños en frutos de arrayán

Así mismo, se estableció que todos los frutos independientemente del tamaño que posean, son de forma ovoide no definida, color negro violáceo, sabor dulce, tienen un mesocarpio carnoso y una textura lisa en su pericarpio.



Figura 8. Fruto de arrayán despulpado

4.2 Caracterización fenotípica de semillas

Las características fenotípicas evidenciadas del análisis realizado en las semillas se muestran en la tabla adjunta (tabla 7), en la cual se puede observar que se evaluó la longitud y diámetro de la semilla obteniendo una media por tamaño establecido.

Tabla 7

Resultados de la caracterización fenotípica de las semillas de arrayán

Semillas	Grande	Mediana	Pequeña	Muy pequeña
Longitud (cm)	1,32	1,18	1	0,89
Diámetro (cm)	3,41	3,2	3,07	2,34

Fuente: La autora

El análisis fenotípico de las semillas de arrayán estableció que son de tipo recalcitrante, de viabilidad corta, ya que no toleran la baja temperatura y no se puede reducir en ellas el contenido de humedad. Es difícil mantener por mucho tiempo su capacidad germinativa (Añazco, 2000). Las semillas de arrayán son de forma ovoide no definida, de color marrón oscuro, esmaltadas y lisas.

Las semillas de tamaño grande se caracterizaron por poseer una longitud \bar{X} de 1,32cm y un diámetro \bar{X} 3,41cm, las de tamaño mediano tienen una longitud \bar{X} de 1,18cm y un diámetro \bar{X} 3,2cm, las semillas pequeñas una longitud \bar{X} de 1,0cm y un diámetro \bar{X} 3,07cm; mientras que las muy pequeñas con una longitud \bar{X} de 0,94cm y un diámetro \bar{X} 2,52cm.

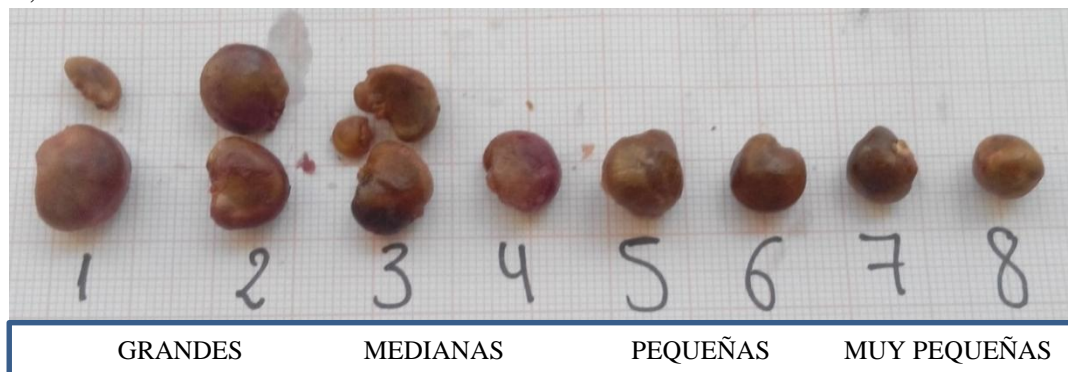


Figura 9. Diversidad de tamaño en semillas de arrayán

4.3 Análisis de calidad de las semillas (Normas ISTA 1993)

La principal finalidad del análisis de semillas fue determinar la calidad de un lote de semillas de arrayán y, consecuentemente, su valor para la siembra. El análisis fue caracterizado por un examen minucioso y crítico de una muestra determinada, con el objetivo de evaluar y avalar su calidad, de acuerdo a lo establecido por las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas (ISTA, 1993).

4.3.1 Origen y autenticidad

El origen y autenticidad de las semillas se verificó en cuanto a la elección de los árboles elite elegidos como fuente semillera, los cuales presentaron una edad media, ya que estos pueden producir semillas viables. En ellos se analizó características fenotípicas visuales que nos permitió seleccionar semillas de acuerdo a características externas, obteniendo como resultado semillas con un alto poder germinativo. Además, se debe recalcar que la edad de la semilla jugó un papel preponderante en el porcentaje de germinación (Fig. 10). La semilla de arrayán es de tipo recalcitrante, por tanto su poder germinativo es corto, razón por la cual los intervalos de tiempo entre la recolección de los frutos y la siembra “*in vitro*” fueron muy estrechos (máximo 1 semana).



Figura 10. Árboles elite seleccionados del Bosque de los Arrayanes

4.3.2 Pureza de la semilla de arrayán

El objetivo del análisis de pureza fue determinar la composición por peso de la muestra de análisis de arrayán. La muestra seleccionada contenía impurezas como malezas, estructuras desprendidas de la semilla, partículas de hojas y ramitas; el tipo y cantidad de impurezas ofrece información importante sobre la calidad de la semilla y su estado fitosanitario. La pureza influye en el número de semilla/Kg y por ende en el rendimiento de las plantas y la densidad apropiada de siembra.

Para cuantificar la cantidad de semillas puras de arrayán se utilizó el coeficiente de pureza, que fue determinado de acuerdo a normas internacionales, obteniendo como resultado que las semillas de arrayán poseen un nivel de pureza del 85,93% (Fig. 11).



Figura 11. Determinación de pureza en semillas de arrayán

4.3.3 Ensayo de germinación en campo

El objetivo principal de este ensayo de germinación fue establecer el número máximo de semillas que pueden germinar bajo condiciones óptimas de luz, humedad y temperatura. En el ensayo de germinación realizado en 4 lotes con 100 semillas cada uno, se obtuvo que el porcentaje de germinación del arrayán fuera del 82,5%.

Se debe recalcar que la prueba de germinación no indica la calidad de la semilla, puesto que en la prueba de germinación se determinó la capacidad germinativa de un

lote de semillas de arrayán bajo condiciones óptimas para la germinación, mostrando un buen desempeño. Sin embargo estas mismas semillas pudieron desarrollarse paupérrimamente en un ambiente de estrés, indicando que la calidad o vigor de la semilla es bajo, las pruebas de calidad tienden a dar una estimación más realista del desempeño en el campo (Fig. 12)

Por lo anteriormente mencionado, todas las semillas seleccionadas fueron analizadas bajo las normas (ISTA, 1993), lo que garantiza a nivel científico el trabajo experimental realizado en la presente investigación.

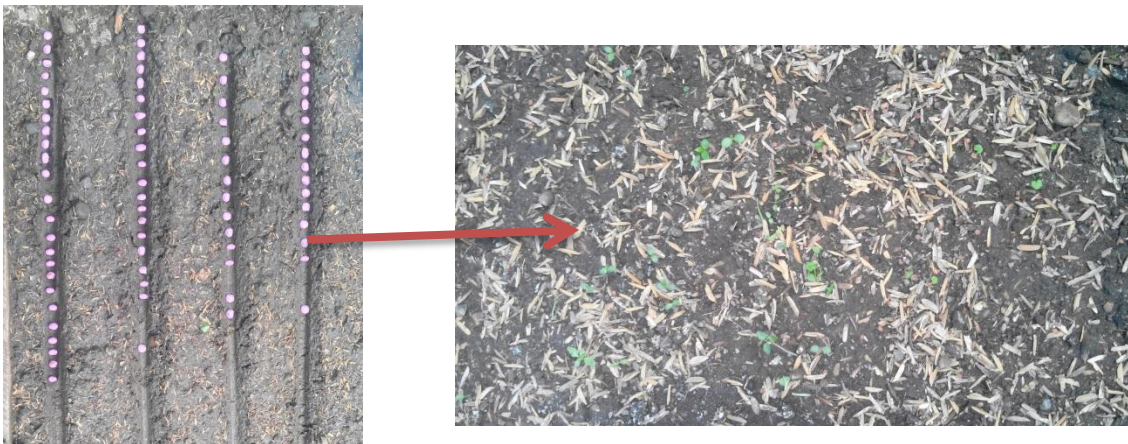


Figura 12. Ensayo de germinación de arrayán

4.3.4 Número de semillas viables/ Kg

Esta información fue útil para calcular el número de plántulas susceptibles de obtener en un kilogramo de semilla de arrayán, en la cual se observó que en el lote evaluado presentó una viabilidad de 5264 semillas/kg.

4.4 Identificación del mejor tratamiento de desinfección

En la presente investigación se realizaron 4 tratamientos de desinfección diferentes, sobre una muestra total de 50 embriones por tratamiento; en los cuales se evidenció que en T1 (Etanol 70% + NaClO 1% c.a) se obtuvo un total de 43 explantes contaminados y 7 explantes sanos; mientras que en T2 (Etanol 70% + NaClO 5% c.a)

se tuvieron 38 explantes contaminados y 12 explantes sanos. En T3 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 1g/L) se observó la contaminación de 7 explantes y 43 explantes sanos, y por último en T4 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 2g/L) 1 explante contaminado y 49 sanos (Fig. 13).

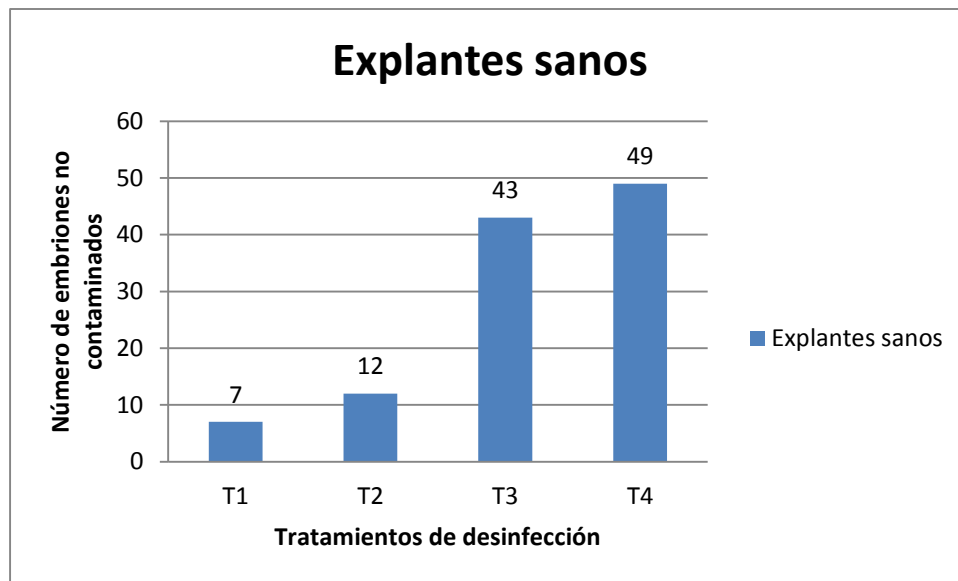


Figura 13. Tratamientos de desinfección en embriones

En el análisis estadístico realizado, se ajustó con el modelo factorial completo con intercepción, en el cual se calcularon los valores pronosticados y los residuos no estandarizados, con la finalidad de comprobar las hipótesis del ANOVA, obteniendo como resultado de la distribución de los datos que la variable dependiente registra una distribución normal.

Se calcularon los residuos y se obtuvo una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk con un nivel de significancia de 0,878; un estadístico de 0,976 con 20 grados de libertad, lo cual indica que se cumple la hipótesis nula de normalidad en la distribución de los residuos.

El resultado de la prueba de homogeneidad de Levene fueron ($f= 0,906$, $p= 0.132 > 0.05$), por lo tanto se cumple la hipótesis de homocedasticidad.

Se graficaron los residuos del modelo vs el valor pronosticado (Fig. 14) y se obtuvo como resultado un cierto patrón común, lo cual indica que hay una posible fuente de variabilidad que no ha sido considerada.

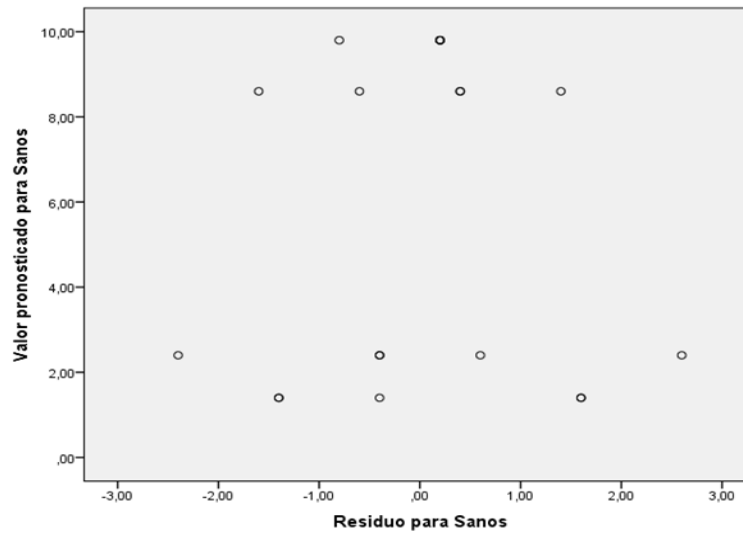


Figura 14. Gráfica de puntos para la independencia de los residuos en explantes no contaminados. Software SPSS

Aplicando una regresión lineal, en el estadístico de Durbin Watson se obtuvo un valor del estadístico de 1,441 (Tabla 8). Lo cual corrobora lo hallado en el punto anterior en relación a la independencia de residuos.

Tabla 8

Resumen del Modelo de Durbin Watson para explantes no contaminados

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	Durbin-Watson
1	,905 ^a	,819	,809	1,739	1,441

a. Predictores: (Constante), Tratamiento

b. Variable dependiente: Sanos

Fuente: La autora

En el análisis de varianza ANOVA, la prueba de efectos intersujetos muestra que el factor desinfección es significativo ($f= 347,070$; $p= 0$, $R= 0.906$) (Tabla 9). Se puede observar que se ha obtenido en el contraste un p valor inferior a 0,05 (nivel de

significación) por lo cual el tratamiento resulta un factor relevante. Se ha encontrado un coeficiente de ajuste $R = 0,888$

Tabla 9

Prueba de efectos intersujetos para explantes no contaminados

Variable dependiente: Sanos					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	272,550 ^a	3	90,850	51,183	,000
Interceptación	616,050	1	616,050	347,070	,000
Tratamiento	272,550	3	90,850	51,183	,000
Error	28,400	16	1,775		
Total	917,000	20			
Total corregido	300,950	19			

a. R al cuadrado = ,906 (R al cuadrado ajustada = ,888)

Fuente: La autora

En la prueba de comparaciones múltiples usando HSD Tukey para el factor explantes sanos, se encontró que el T3 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 1g/L) y T4 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 2g/L) presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a los T1 (Etanol 70% + NaClO 1% c.a) y T2 (Etanol 70% + NaClO 5% c.a) ($p < 0.05$) (Tabla 10).

Tabla 10

Comparación múltiple HSD Tukey entre tratamientos de explantes no contaminados

Variable dependiente: sanos					
(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior
1	2	1,40	,714	,243	-,64
	3	-5,60 [*]	,714	,000	-7,64
	4	-7,00 [*]	,714	,000	-9,04
2	1	-1,40	,714	,243	-3,44
	3	-7,00 [*]	,714	,000	-9,04

3	4	-8,40 [*]	,714	,000	-10,44
	1	5,60 [*]	,714	,000	3,56
	2	7,00 [*]	,714	,000	4,96
4	4	-1,40	,714	,243	-3,44
	1	7,00 [*]	,714	,000	4,96
	2	8,40 [*]	,714	,000	6,36
	3	1,40	,714	,243	-,64

Software SPSS

Fuente: La autora

Además; se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre el T3 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 1g/L) con el T1 (Etanol 70% + NaClO 1% c.a) y el T2 (Etanol 70% + NaClO 5% c.a), el tratamiento T4 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 2g/L) con el T1 (Etanol 70% + NaClO 1% c.a) y el T2 (Etanol 70% + NaClO 5% c.a), pero no entre el T3 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 1g/L) y el T4 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 2g/L). Por tal razón se deduce que se puede utilizar sea el T3 o T4 indistintamente ya que estadísticamente son significativamente iguales.

4.5 Identificación del mejor tratamiento de agente antioxidante

Una vez obtenidos embriones carentes de cualquier tipo de contaminante, se procedió a evaluar la efectividad de diferentes agentes antioxidantes, para lo cual se valoraron 4 tratamientos diferentes, sobre una muestra total de 50 embriones por grupo; en los cuales se evidenció que en T1 (Carbón activado 1g/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) se obtuvo un total de 35 explantes fenolizados y 15 explantes sanos; mientras que en T2 (Carbón activado 2g/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) se tuvieron 42 explantes fenolizados y 8 explantes sanos, en T3 (cisteína 25 mg/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) 7 explantes fenolizados y 43 explantes sanos y por último en T4 (cisteína 50 mg/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) 0 explantes fenolizados y 50 explantes sanos (Fig. 15). Al establecerse el mejor tratamiento de efectividad del agente antioxidante, se determinó el porcentaje de germinación en laboratorio, el cual corresponde al 71,25%, se refleja que el porcentaje de germinación “*in vitro*” (71,25%), es inferior frente al realizado

en el campo (82,5%), este resultado quizá difiera debido a la diferencia en cuanto al tratamiento pregerminativo empleado en cada caso.

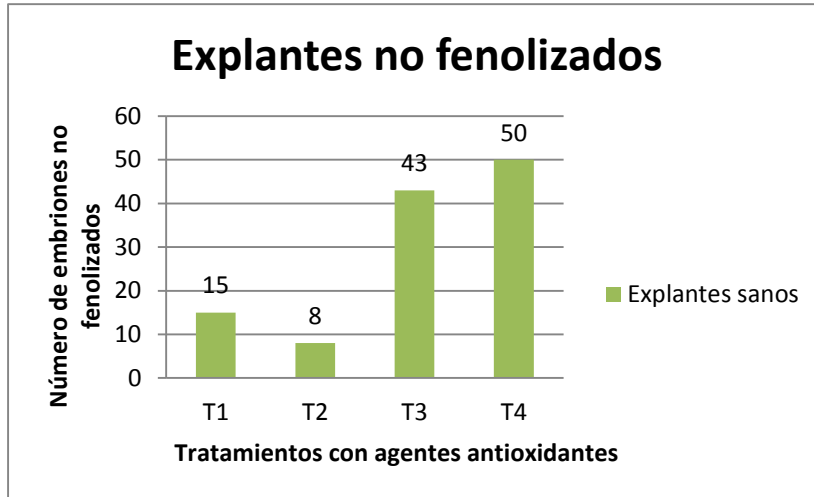


Figura 15. Tratamientos con agentes antioxidantes

El resultado de la prueba de homogeneidad de Levene fue ($f= 0,978$, $p= 0.086 < 0.05$). Se graficó los residuos del modelo vs el valor pronosticado (Figura 16) y se obtuvo como resultado un cierto patrón común, lo cual indica que hay una posible fuente de variabilidad que no ha sido considerada.

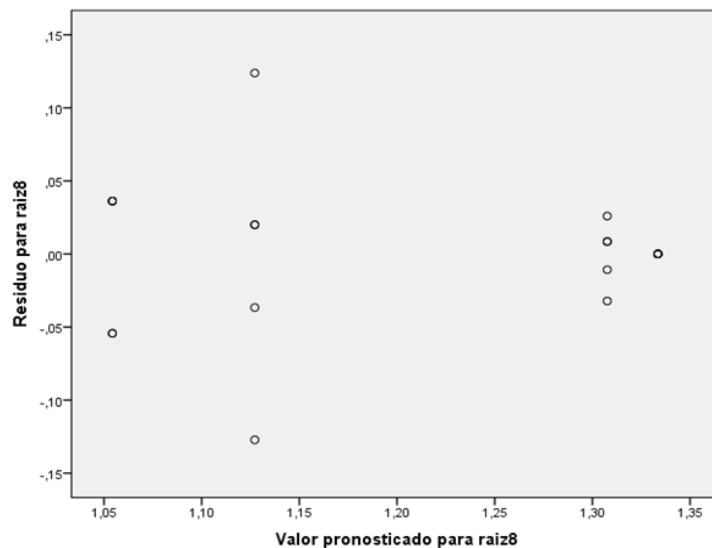


Figura 16. Gráfica de puntos para la independencia de los residuos. Explantes no fenolizados. Software SPSS

Aplicando una regresión lineal, en el estadístico de Durbin Watson se obtuvo un valor del estadístico de 1,072 (Tabla 11), lo cual indica que los residuos no son independientes.

Tabla 11
Resumen modelo Durbin Watson para embriones no fenolizados

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	Durbin-Watson
1	,844 ^a	,712	,696	2,098	1,072

a. Predictores: (Constante), Tratamiento
b. Variable dependiente: Sanos

Fuente: La autora

En el análisis de varianza ANOVA, la prueba de efectos intersujetos muestra que el factor tratamiento de explantes no fenolizados es significativo ($f= 181,882$; $p= 0$, $R= 0.973$) (Tabla 12).

Tabla 12
Pruebas de efectos inter sujetos para embriones no fenolizados

Variable dependiente: Sanos					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	927,600 ^a	4	231,900	181,882	,000
Tratamiento	927,600	4	231,900	181,882	,000
Error	20,400	16	1,275		
Total	948,000	20			

a. R al cuadrado = ,978 (R al cuadrado ajustada = ,973)

Fuente: La autora

En las comparaciones múltiples usando HSD Tukey para el factor explantes no fenolizados, se encontró que T3 (cisteína 25 mg/L + Ac. Asc 100mg/L) y T4 (cisteína 50 mg/L + Ac. Asc 100mg/L) presentan diferencias estadísticamente significativas

con respecto a los T 1 (Carbón activado 1g/L + Ac. Asc 100mg/L) y T2 (Carbón activado 2g/L + Ac. Asc 100mg/L) ($p < 0.05$) (Tabla 13).

Tabla 13.

Comparaciones múltiples HSD tukey entre tratamientos mejor agente antioxidante

Variable dependiente: Sanos					
HSD Tukey					
(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
Tratamiento	Tratamiento				Límite inferior
1	2	1,40	,714	,243	-,64
	3	-5,60*	,714	,000	-7,64
	4	-7,00*	,714	,000	-9,04
2	1	-1,40	,714	,243	-3,44
	3	-7,00*	,714	,000	-9,04
	4	-8,40*	,714	,000	-10,44
3	1	5,60*	,714	,000	3,56
	2	7,00*	,714	,000	4,96
	4	-1,40	,714	,243	-3,44
4	1	7,00*	,714	,000	4,96
	2	8,40*	,714	,000	6,36
	3	1,40	,714	,243	-,64

Fuente: La autora

Además; se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre el T3 (cisteína 25 mg/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) con el T1 (Carbón activado 1g/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) y el T2 (Carbón activado 2g/L + Ac. Ascórbico 100mg/L), el tratamiento T4 (cisteína 50 mg/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) con el T1 (Carbón activado 1g/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) y el T2 (Carbón activado 2g/L + Ac. Ascórbico 100mg/L), pero no entre el T3 (cisteína 25 mg/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) y el T4 (cisteína 50 mg/L + Ac. Ascórbico 100mg/L). Por tal razón se concluye que se puede utilizar el T3 o T4 indistintamente ya que estadísticamente son significativamente iguales.

4.6 Germinación “in vitro” de arrayán

En cuanto a la germinación “*in vitro*” de arrayán esta se hizo visible transcurridos los 95 días, con la aparición de la plúmula, con un porcentaje de germinación del 71,25%. Todas las vitroplantas de arrayán presentaron una buena condición física que fue apreciada visualmente, sus hojas fueron verdes, y su raíz se desarrolló con completa normalidad (Fig. 17).

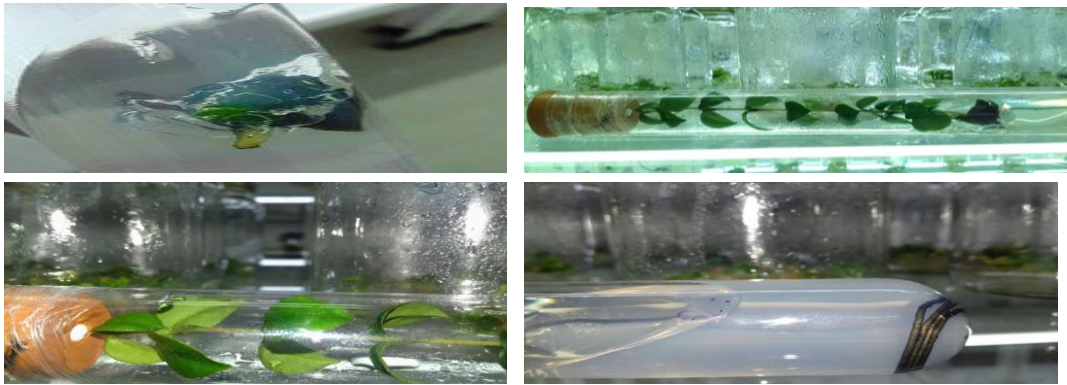


Figura 17. Plantas “in vitro” de arrayán

4.7 Aclimatación de las vitroplantas

Las vitroplantas de arrayán aclimatadas presentaron un alto índice de mortandad (superior al 50%). Numerosos autores mencionan que la etapa de aclimatación es un punto trascendental a la hora de transferirlas a condiciones “*ex vitro*”. Existen dos factores muy importantes que pueden haber influido, uno es el estrés hídrico al que fueron sometidas, ya que sus estomas son atípicos y el otro fue quizá su inhabilidad a adaptarse a condiciones nutricionales y fotosintéticas totalmente desconocidas para ellas.



Figura 18. Vitroplantas de arrayán aclimatadas

5. DISCUSIÓN

En la presente investigación se caracterizó fenotípicamente los frutos y semillas de arrayán obtenidos de árboles élite del “Bosque de los Arrayanes”, localizado en la provincia del Carchi, además se evaluaron diferentes tratamientos de desinfección y sustancias antioxidantes, para evitar la fenolización e inducir a la germinación “*in vitro*” del arrayán.

La caracterización fenotípica de los frutos de arrayán describen a la especie como una drupa comestible, de sabor dulce, carnosa, que posee diversidad de tamaños con una longitud que varía entre 1,34 cm y 2,34 cm, y un peso que oscila entre 0,67g y 1,15g. Posee una forma ovoide no definida, color negro violáceo, y textura lisa. Los datos anteriormente mencionados concuerdan con el estudio de Fuentes., *et al*, 2015; en el cual además se aporta con datos de interés sobre la especie, acerca de la importancia del poder antioxidante de sus frutos en la salud humana.

En cuanto a la caracterización fenotípica de semillas de arrayán se estableció que son de tipo recalcitrante, forma ovoide no definida, color caqui oscuro, esmaltada y textura lisa, datos que concuerdan nuevamente con la descripción realizada por Fuentes., *et al*, 2015. Sin embargo la presente investigación aporta con datos como el tamaño y peso de la semilla, los cuales no se encuentran presentes en otras investigaciones.

Las investigaciones basadas en la germinación “*in vitro*” del arrayán son escasas, por lo que es complicado contrastar los resultados obtenidos con los de otras investigaciones, sin embargo, estos resultados son comparables a los obtenidos con

(Jaramillo, 2013) que evaluó tratamientos de desinfección para la propagación “*in vitro*” de arrayán el cual toma como agente desinfectante al NaClO en concentraciones desde el 10% al 30% en yemas axilares como fuente de explante, obteniéndose buenos resultados, contradiciéndose al presente estudio en el cual en NaClO no presenta efectividad en cuanto a las diferencias estadísticamente significativas, por lo que se considera que el HgCl₂ es el tratamiento idóneo para desinfección de embriones de arrayán. (Véase figura 10).

Al obtener un elevado porcentaje de embriones asépticos, es decir, no contaminados aplicando tratamientos de Benlate (1,5g/L) + HgCl₂ (1 ó 2 g/L) se evidenció que son sustancias que poseen un amplio rango de desinfección, resultados similares a los obtenidos con (Montes, Burgos, & Atiaja, 2016) en café. Sin embargo no existen estudios sobre la toxicidad que pueda ocasionar a la vitroplanta a largo plazo. Se conoce que el HgCl₂ posee un alto grado de toxicidad, además de ser un excelente bioacumulante, por ende se presume que quizá en futuras etapas del crecimiento de las plantas estas puedan verse afectadas a nivel fisiológico o morfológico.

Por su parte (Panamá, 2017) en su estudio realizado en chanul (*Humiriastrum procerum*) menciona que los tratamientos de desinfección basados en HgCl₂ no resultan eficientes frente al grado de supervivencia, alude que se obtiene un 100% de desinfección, sin embargo transcurridas las 24 horas los meristemas empiezan a morir de manera exponencial, caso contrario que se registra en el presente estudio en el cual, es muy elevado la tasa de supervivencia de los embriones de arrayán (superior al 80%).

El estudio de algunas especies forestales (Rebolledo, 2006 y Uribe 2004) en cuanto a la propagación “*in vitro*” muestra que el NaClO es un agente desinfectante eficaz , esto se contradice completamente a lo evaluado en el presente estudio, pues el NaClO presenta un bajo rango de desinfección en embriones de arrayán, posiblemente esto se debe a la genética propia de las especies, el arrayán es una semilla con un alto

contenido de exudados, lo cual puede ser una limitante muy importante, y necesita un agente desinfectante más fuerte como el HgCl₂.

La germinación y propagación “*in vitro*” de especies forestales, es un temática, complicada de abordar, debido al largo ciclo de vida que involucra a la especie. Sin embargo se concuerda con (Suárez, Jarma, & Avila, 2006), en que desarrollar protocolos de micropropagación de especies leñosas supone un plus de investigación en cuanto a la supervivencia de especies forestales, más aun cuando estas se ven amenazadas, al representar un punto estratégico en la industria de la madera.

Fuentes., et al , 2015, en su estudio sobre la Caracterización del desarrollo del fruto de arrayán y sus posibles beneficios para la salud humana, alude que en etapas tempranas de maduración del fruto este posee un alto grado de poder antioxidante, dato que se contrasta con la presente investigación en los análisis de fenolización de los embriones; mientras más inmediata fue la siembra del embrión y el tiempo de recolección, los embriones fenolizados fueron disminuyendo, variable que quizá se encuentra relacionada íntimamente con el tiempo de desarrollo del fruto y que puede ser demostrada en futuros estudios que contemplen análisis bioquímicos.

La fenolización es un limitante muy importante en los cultivos forestales, esto se debe a que las mismas especies forestales en su genética intrínseca poseen una elevada cantidad de polifenoles y radicales libres, que necrosan al explante y como consecuencia conducen a la muerte del mismo. Existen alternativas viables para evitar la fenolización como es el uso de agentes antioxidantes (Radice, 2004), señala que el éxito del establecimiento “*in vitro*” de una determinada especie, depende del grado de fenolización que posea la misma y de las alternativas utilizadas para evitarlo.

En el presente estudio la cisteína presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al carbón activado, ambas son utilizadas como agentes antioxidantes y dan excelentes resultados para evitar la fenolización de explantes, todo depende de la

especie con la que se trabaje. En orquídeas el carbón activado presenta excelentes resultados, mientras que en el arrayán la cisteína fue la sustancia antioxidante idónea a ser empleada.

La disposición de los embriones a temperaturas bajas (16 – 18° C) y en condiciones de oscuridad indujeron la germinación “*in vitro*” del arrayán, además de simularse todas las características físicas posibles en cuanto a su hábitad natural. Caso contrario si los embriones antes de ser germinados encontraban disponibilidad de luz, los mismos empezaban a fenolizarse, se tomaron en cuenta las estrategias mencionadas por (Azofeifa, 2009); para evitar la fenolización, obteniendo excelentes resultados.

6. CONCLUSIÓN

Los frutos de arrayán fueron caracterizados como drupas de una forma ovoide no definida, color negro violáceo, sabor dulce, carnosos y además posee una textura lisa, sus semillas son recalcitrantes, de forma ovoide no definida, de color marrón oscuro, esmaltadas y lisas.

El amplio espectro de desinfección de embriones ha demostrado que los mejores tratamientos de desinfección fueron el T3 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 1g/L) y T4 (Benlate 1,5 g/L + HgCl₂ – 2g/L), por lo que se alude que se puede utilizar cualquiera de los dos indistintamente ya que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

En cuanto a la valoración de la efectividad de diferentes sustancias antioxidantes, en este caso carbón activado y cisteína, se determina que el T3 (cisteína 25 mg/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) y T4 (cisteína 50 mg/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a los T 1 (Carbón activado 1g/L + Ac. Ascórbico 100mg/L) y T2 (Carbón activado 2g/L + Ac. Ascórbico 100mg/L), pero no entre ellos, es decir, se puede utilizar cualquiera de los dos (T3 ó T4) indistintamente ya que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

La disposición de los embriones a temperaturas bajas (16 – 18° C) y en condiciones de oscuridad indujeron a la germinación “*in vitro*” del arrayán, obteniéndose de este modo las vitroplantas.

La aclimatación de las vitroplantas de arrayán tuvo una elevada tasa de mortandad (mayor al 50%), fue una etapa crucial en la que se tomaron en cuenta varios parámetros como humedad, luz, temperatura etc.

El medio de cultivo empleado, MS ½ con vitaminadas de la casa comercial Duchefa Biochemie suplementado con Pythagel (2,5 g/L) como agente gelificante, sacarosa (20g/L) como fuente de carbono, y como reguladores de crecimiento se utilizó ANA (1 ml /L), Kinetina (1ppm) y AG3 (2mg/L), dio excelentes resultados en la obtención de las vitroplantas.

RECOMENDACIONES

Se propone en futuras investigaciones evaluar la posible toxicidad a largo plazo de las vitroplantas por el uso del HgCl₂ (bicloruro de mercurio), como agente desinfectante.

Identificar y determinar las condiciones apropiadas para la aclimatización de las vitroplantas.

Se recomienda en futuras investigación emplear semillas de las primeras etapas de fructificación del Arrayán, las mismas que sean viables y se encuentren en un buen estado fitosanitario.

Se sugiere aislar el embrión de la semilla, con mucha delicadeza, con el objetivo de disminuir el tiempo de germinación del arrayán.

En futuros estudios de *Myrcianthes rhopaloides* se recomienda, utilizar diferentes agentes desinfectantes para evaluar la efectividad de los mismos, variando diferentes concentraciones y tiempos.

Ensayar el uso de otros reguladores y estimuladores de crecimiento (diferentes tipos de auxinas, citoquininas y giberelinas) en los medios de cultivo para inducir la germinación de la semilla y el desarrollo de la vitroplanta.

En futuras investigaciones de *Myrcianthes rhopaloides* se recomienda, emplear diferentes agentes antibióticos como tetraciclina, gentamicina, estreptomicina o penicilina en diferentes dosis en el medio de cultivo, para evitar la contaminación endógena de las semillas.

Establecer el protocolo completo de propagación “in vitro” del arrayán.

Se sugiere en futuras investigaciones realizar una caracterización fenotípica a través de características morfológicas y fisiológicas de diferentes poblaciones naturales del arrayán, lo que permitirá adquirir información valiosa de la especie para programas de mejoramiento genético. Es decir, se podrá reconocer y localizar las poblaciones con las mejores características fenotípicas lo que será de gran utilidad para la selección de germoplasma de arrayán en el Ecuador.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A., & Muñoz, A. (2005). *Micropropagacion de Teca (Tectona grandis L.f)*. Kuru: revista forestal, 2(5):11.
- Añazco, M. (2000). *Selección de especies y manejo de semillas*. Red Agroforestal Ecuatoriano (RAFE), Quito, Ecuador.
- Araya, J. (2006). *Establecimiento in vitro de cuatro variedades de caña de azucar a partir de explantes foliares y yemas axilares*. Zamorano, 26-30.
- Azofeifa, Á. (2009). *Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes*. Agronomía mesoamericana 20(1): 153-175, San José, Costa Rica.
- Cano, M. (2013). *Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación ex situ de especies vegetales de interés*. En I. I. biodiversidad). Alicante - España, Universidad de Alicante.
- CATIE. (2000). *Técnicas para la germinación de semillas forestales*. Centro Agronomico tropical de Investigacion y enseñanza, Costa Rica.
- CITES. (1994). *Proposal to include in Appendix II Neotropical populations of Myrcianthes Hallii*. Nimth Meeting of the conference of the parties. . Fort Lauderdale, Florida, USA.
- Consitución del Ecuador. (2008). Asamblea Nacional. Quito - Ecuador.
- Doria, J. (2010). *Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento*. Scielo, Reserva Científica del departamento de Fitotecnia, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, gaveta postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.
- Eliécer, J. (2014). *Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)), Biotecnología Agraria, Bogotá.
- FAO. (2006). *Sistema de Semillas de calidad declarada*. Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentacion, Roma, Italia.
- FAO. (2016). *Evaluación de los recursos forestales mundiales 2015*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia

- George, E., Hall, M., & De klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. En V. 1. ed.. The Netherlands: Springer, Dordrecht.
- GPI. (2013). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial*. Gobierno Provincial de Imbabura. Ibarra - Ecuador .
- Grogan, J., Barreto , A., & Verrissimo, P. (2002). *Mahogany in the brazilian amazon: Ecology and perspectives on management*. Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazonia, 79- 83.
- INEC. (2010). Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Obtenido de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/>
- Inga, M. (2012). *Siembra de semillas de especies forestales en el campo*. GPI (Gobierno Provincial de Imbabura - Dirección General de Ambiente).
- ISTA. (1993). *Normas Internacionales de Análisis de semillas*. Asociación Internacional de ensayo de semillas.
- Jaramillo, K. (2013). *Evaluación de métodos de cultivo para la micropropagación de Arryán (Myrcianthes hallii) (O. Berg) Mc Vaugh*. Universidad Central del Ecuador. Quito - Ecuador.
- Marcucci, S., Gallo, L., Zelener, N., Torales, S., & Sharry, S. (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Aplicación de la biotecnología en la mejora y conservación de especies forestales, Buenos Aires - Argentina.
- MAE. (2014). *Ministerio del Ambiente. Plan Nacional de Restauracion Forestal 2014 - 2017*. Quito - Ecuador.
- Montes, S., Burgos, S., & Atiaja, J. (2016). *Establecimiento de propagación in vitro de café*. Universidad Tecnica del Norte, Facultad de Ingenieria en Ciencias Agropecuarias y Ambientales.
- Mroginski, L., Sansberro, P., & Flaschland, E. (2010). *Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales*. La Plata - Argentina, 345- 348.
- Olmos, S., & Luciani, G. (2010). *Métodos de propagación y conservación de germoplasma*. Universidad de la Plata. Argentina.

- Palacios, W. (2011). *Familias y géneros arbóreos del Ecuador. Manual de identificación*. Ministerio del Ambiente de Ecuador. Quito - Ecuador, 89.
- Panamá, D. F. (2017). *Aplicación de técnicas de cultivo "in vitro" en la microporpagacion vegetativa de Humirastrum procerum (LITTLE) CUATR*. Universidad Técnica del Norte, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales.
- Patiño, M. (2011). *Evaluación de métodos de desinfección y medios de cultivo para la multiplicación in vitro de guarango (Caesalpinia spinosa Mol. O.Kuntz)*. ESPOCH (Escuela Superior Politecnica del Chimborazo).
- Qureshi , J., & Saxena, P. (1992). *Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with seedlings of several hybrid seed geranium (Pelargonium x hortorum Bailey) varieties*. Plant Cell Reports, 11(9): 443 - 448.
- Radice, C. (2004). *Morfogénesis in vitro: Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Buenos Aires - Argentina.
- Rojas, S., García, J., & Alarcón, M. (2005). *Propagación Asexual de Plantas*. En C. B. amazónicas. Bogotá - Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.
- Sorasan, V., Cripps, R., Ramsay, M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., y otros. (2006). *Conservation in vitro of threatened plants - progress in the past decade* . In vitro cellular and developmental Biology - Plant: 42:206-214.
- Suárez, I., Jarma, A., & Avila, M. (2006). *Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de Roble (Tabebuia rosea Bertol DC)*. Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural, 76 – 103. España.
- Villalobos, A., Leung, D., & Thorpe, T. (1984). *Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiate pine*. Mexico DF, 150-152

ANEXOS

ANEXO 1. Floración y fructificación, maduración de frutos y recolección.



ANEXO 2. Medición de tamaños de fruto



ANEXO 3. Caracterización fenotípica de frutos

GRANDES	N°	Peso inicial (g)	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Grosor de la Pulpa (mm)	Forma	Color
	1	1	2	7,1	1	OVOIDE	negro violáceo
	2	1,1	2,4	7,7	1	OVOIDE	negro violáceo
	3	1,35	2,7	8,2	1	OVOIDE	negro violáceo
	4	1	1,9	6,9	1	OVOIDE	negro violáceo
	5	1,3	2,5	7,9	1	OVOIDE	negro violáceo
	6	1	2,1	7,3	1	OVOIDE	negro violáceo
	7	1,1	2,2	7,4	1	OVOIDE	negro violáceo
	8	1	2	7	1	OVOIDE	negro violáceo
	9	1,2	2,7	8,5	1	OVOIDE	negro violáceo
10	1,5	2,9	9,1	1	OVOIDE	negro violáceo	
X=	1,155	2,34	7,71				

Fuente: La autora

MEDIANAS	N°	Peso inicial (g)	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Grosor de la Pulpa (mm)	Forma	Color
	1	0,95	1,8	6,5	1	OVOIDE	negro violáceo
	2	0,87	1,7	6,3	1	OVOIDE	negro violáceo
	3	0,97	1,9	6,7	1	OVOIDE	negro violáceo
	4	0,86	1,8	6,5	1	OVOIDE	negro violáceo
	5	0,98	1,9	6,8	1	OVOIDE	negro violáceo
	6	0,92	1,8	6,45	1	OVOIDE	negro violáceo
	7	0,92	1,8	6,5	1	OVOIDE	negro violáceo
	8	0,89	1,7	6,9	1	OVOIDE	negro violáceo
	9	0,93	1,9	6,9	1	OVOIDE	negro violáceo
10	0,92	1,9	6,8	1	OVOIDE	negro violáceo	
X=	0,921	1,82	6,635				

Fuente: La autora

PEQUEÑAS	N°	Peso inicial (g)	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Grosor de la Pulpa (mm)	Forma	Color
	1	0,72	1,5	4,5	1	OVOIDE	negro violáceo
	2	0,75	1,7	4,8	1	OVOIDE	negro violáceo
	3	0,76	1,7	4,8	1	OVOIDE	negro violáceo
	4	0,75	1,7	4,7	1	OVOIDE	negro violáceo
5	0,7	1,6	4,6	1	OVOIDE	negro violáceo	

6	0,7	1,5	4,5	1	OVOIDE	negro violáceo
7	0,73	1,6	4,6	1	OVOIDE	negro violáceo
8	0,73	1,5	4,5	1	OVOIDE	negro violáceo
9	0,75	1,5	4,4	1	OVOIDE	negro violáceo
10	0,8	1,7	4,7	1	OVOIDE	negro violáceo
X=	0,739	1,6	4,61			

Fuente: La autora

MUY PEQUEÑAS	N°	Peso inicial (g)	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Grosor de la Pulpa (mm)	Forma	Color
	1	0,65	1,3	4,4	1	OVOIDE	negro violáceo
	2	0,58	1,2	4,1	1	OVOIDE	negro violáceo
	3	0,67	1,4	4,7	1	OVOIDE	negro violáceo
	4	0,66	1,3	4,4	1	OVOIDE	negro violáceo
	5	0,69	1,4	4,7	1	OVOIDE	negro violáceo
	6	0,63	1,2	4	1	OVOIDE	negro violáceo
	7	0,71	1,4	4,6	1	OVOIDE	negro violáceo
	8	0,72	1,4	4,7	1	OVOIDE	negro violáceo
	9	0,68	1,3	4,5	1	OVOIDE	negro violáceo
10	0,77	1,5	4,9	1	OVOIDE	negro violáceo	
X=	0,676	1,34	4,5				

Fuente: La autora

ANEXO 4. Caracterización fenotípica de semillas

GRANDES	N°	Longitud semilla (cm)	Diámetro semilla (cm)	Forma	Color	Aspecto - Textura
	1	1,2	3,5	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	2	1,3	3	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	3	1,5	3,9	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	4	1,2	3,4	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	5	1,4	3,9	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	6	1,2	2,7	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	7	1,25	2,8	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	8	1,15	3,2	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	9	1,3	3,6	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
10	1,7	4,1	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas	
		1,32	3,41			

Fuente: La autora

MEDIANAS	N°	Longitud semilla (cm)	Diámetro semilla (cm)	Forma	Color	Aspecto - Textura
	1	1,1	3	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	2	1,3	3,4	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	3	1,2	3,4	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	4	1,1	3,1	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	5	1,35	3,5	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	6	1,1	3	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	7	1,1	2,9	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	8	1	2,8	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	9	1,3	3,5	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
10	1,3	3,4	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas	
		1,185	3,2			

Fuente: La autora

PEQUEÑAS	N°	Longitud semilla (cm)	Diámetro semilla (cm)	Forma	Color	Aspecto - Textura
	1	0,9	2,8	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	2	1,1	3,4	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	3	1	3	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	4	0,9	2,7	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	5	1,1	3,3	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	6	1	3,1	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	7	1	3	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	8	0,9	2,9	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	9	1	3,1	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
10	1,1	3,4	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas	
		1	3,07			

Fuente: La autora

MUY PEQUEÑAS	N°	Longitud semilla (cm)	Diámetro semilla (cm)	Forma	Color	Aspecto - Textura
	1	0,8	1,7	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	2	0,9	2,5	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
3	1	2,4	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas	

4	0,8	1,7	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
5	0,9	2,8	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
6	0,9	2,6	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
7	1	2,7	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
8	1	2,8	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
9	0,9	2,9	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
10	1,2	3,1	OVOIDE	Caqui oscuro	Esmaltadas y lisas
	0,94	2,52			

Fuente: La autora

ANEXO 5. Despulpado manual del fruto y almacenamiento de la semilla



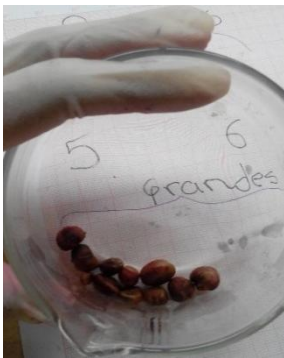
ANEXO 6. Análisis fenotípico de las semillas (origen, autenticidad y pureza)



ANEXO 7. Ensayo de germinación en campo de semillas de arrayán



ANEXO 8. Semillas despulpadas, fungicida y semillas de arrayán con VITAVAX® 400



ANEXO 9. Sustrato franco arenoso, desinfección del sustrato



ANEXO 10. Siembra y cubrimiento de las semillas con sustrato arenoso



ANEXO 11. Plántulas obtenidas de la germinación en campo de arrayán



ANEXO 12. Plantas madre de arrayán





ANEXO 13. Semillas de arrayán, dentro de la CFL – Semillas de arrayán sumergidas en etanol al 70%



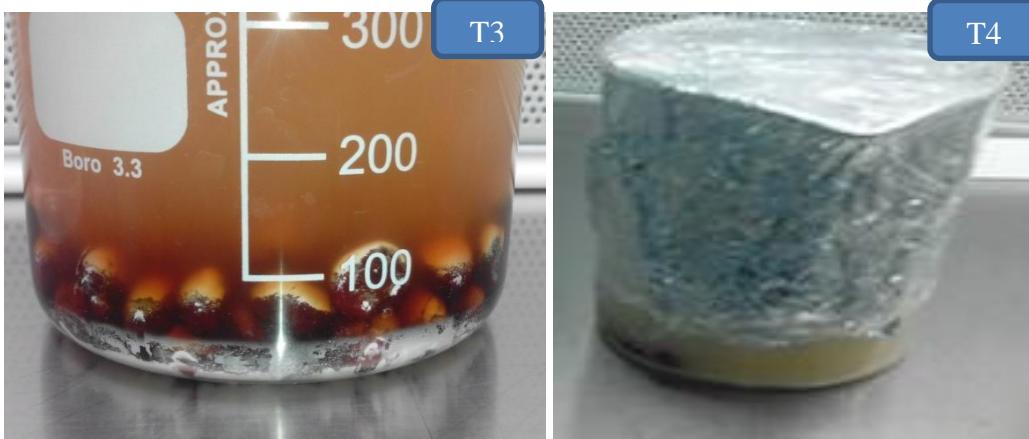
ANEXO 14. Semillas de arrayan en T1 (1% c.a NaClO) y T2 (5% c.a NaClO)



ANEXO 15. Semillas de arrayán en Benlate (1,5g/L) durante 24 horas (T3 – T4)



ANEXO 16. Semillas de arrayán en HgCl₂, (T3 (1g/L) – T4 (2g/L))



ANEXO 17. Aislamiento de embriones de arrayán



ANEXO 18. Composición del medio de cultivo casa comercial Ducheffa Biochemie

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM INCLUDING VITAMINS		
OLIGOELEMENTOS	mg/L	µM
CoCl₂.6H₂O	0.025	0.11
CuSO₄.5H₂O	0.025	0.10
FeNa EDTA	36.70	100.00
H₃BO₃	6.20	100.27
KI	0.83	5.00
MnSO₄.H₂O	16.90	100.00
Na₂MoO₄.2H₂O	0.25	1.03
ZnSO₄.7H₂O	8.60	29.91
MACROELEMENTOS	mg/L	µM
CaCl₂	332.02	2.99
KH₂PO₄	170.00	1.25

KNO₃	1900.00	18.79
MgSO₄	180.54	1.50
NH₄NO₃	1650.00	20.61
VITAMINAS	mg/L	μM
Glicina	2.00	26.64
Myo-inositol	100.00	554.94
Ácido Nicotínico	0.50	4.06
HCl Piridoxina	0.50	2.43
HCl Tiamina	0.10	0.30

Fuente: La autora

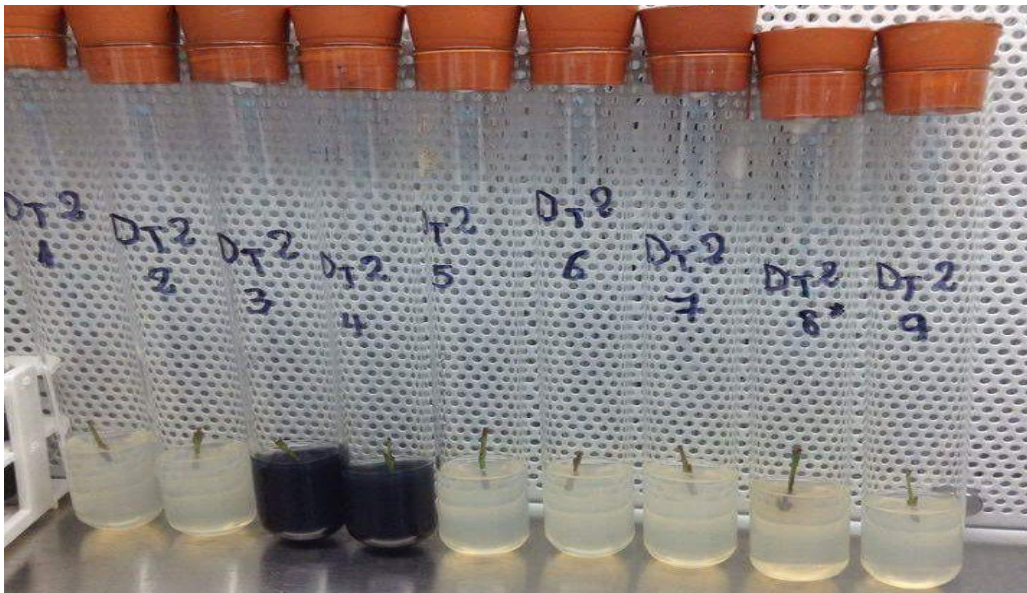
ANEXO 19. Siembra de embriones en el medio de cultivo



ANEXO 20. Almacenamiento de embriones en la oscuridad e indicios de germinación



ANEXO 21. Medio de cultivo con carbón activado vs medio de cultivo con cisteína



ANEXO 22. Acimatación de las vitroplantas de arrayán

