



UNIVERSIDAD UTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA E
INDUSTRIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y MANEJO DE
RIESGOS NATURALES**

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN
IN VITRO DE *Lupinus microphyllus* COMO APORTE A LA
RESTAURACIÓN DE SUELOS DEGRADADOS EN EL PÁRAMO
DEL ANTISANA**

**TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AMBIENTAL Y MANEJO DE RIESGOS NATURALES**

JOSELYN CAROLINA MERA PATIÑO

DIRECTOR: ROBERTO GRANDA

Quito, febrero 2020

© Universidad UTE. 2020

Reservados todos los derechos de reproducción

FORMULARIO DE REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

TRABAJO DE TITULACIÓN

DATOS DE CONTACTO	
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1724152119
APELLIDO Y NOMBRES:	Mera Josselyn Carolina
DIRECCIÓN:	Carcelén. Diego Daza y Gonzalo Gordillo
EMAIL:	jossycaro@hotmail.com
TELÉFONO FIJO:	0234427171
TELÉFONO MOVIL:	0983840192

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Desarrollo de un protocolo de micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Lupinus microphyllus</i> como aporte a la restauración de suelos degradados en el páramo del Antisana
AUTOR O AUTORES:	Josselyn Carolina Mera Patiño
FECHA DE ENTREGA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	17 de febrero, 2020
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Ing. Roberto Granda
PROGRAMA	PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO <input type="checkbox"/>
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera Ambiental y Manejo de Riesgos Naturales

RESUMEN:

El *Lupinus microphyllus* es una planta en forma de arbusto tendido cuya altura puede variar de entre 9 a 45 cm. Se encuentra distribuido en páramos de pajonal a lo largo de la cordillera de los Andes. Esta especie no requiere de un suelo muy fértil, lo que la hace capaz de crecer en suelos degradados donde otras especies no desarrollarían. Posee gran capacidad de fijación de nitrógeno por lo que es considerado un cultivo mejorador de suelos. En las faldas del Antisana la degradación del suelo ha provocado alteraciones en el nivel de fertilidad y en su capacidad de sostener cobertura vegetal lo que conlleva a la aceleración del proceso erosivo. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo de micropropagación *in vitro* de *Lupinus microphyllus*, como aporte a la restauración de suelos degradados en el páramo del Antisana. Como tratamiento pregerminativo se escarificó las semillas con lo que su porcentaje de germinación aumentó al 100%. La desinfección de semillas se logró al tratarlas con hipoclorito de sodio al 1,3% y tiempo de inmersión de 1 minuto. Estas fueron colocadas en medio MS al 50% e incubadas por 15 días. Con este tratamiento el 100% de los explantes resultaron libres de contaminación y oxidación. Para la fase de multiplicación se logró el mayor porcentaje de aparición y número de nuevos brotes al utilizar un medio MS al 50% suplementado con 1,0 mg/L de BAP y 0,3 mg/L de IAA. Estos resultados se evidenciaron al cabo de

	20 días de incubación. Finalmente se logró enraizar el 60% de explantes utilizados en medio MS al 50% junto con 0,5 mg/L de IAA y 0,5 g/L de carbón activado
}PALABRAS CLAVES:	reguladores de crecimiento, cultivo <i>in vitro</i> , propagación, cobertura vegetal
ABSTRACT:	<p><i>Lupinus microphyllus</i> is a plant in shrub form whose height can vary from 9 to 45 cm. It is distributed in pajonal paramo along the Andes mountain range. This species does not require very fertile soil, which makes it capable of growing in degraded soils where other species would not develop. It has a great capability for nitrogen fixation, which is why it is considered a soil improvement crop. In Antisana's slopes the degradation of the soil has caused alterations in the level of fertility and in its ability to sustain plant coverage, which leads to the acceleration of the erosive process. The objective of this investigation was to develop an in vitro micropropagation protocol of <i>Lupinus microphyllus</i>, as a contribution to the restoration of degraded soils in the Antisana paramo. As a pregerminative treatment, the seeds were scarified, thereby increasing their germination percentage to 100%. Seed disinfection was achieved by treating them with 1,3% sodium hypochlorite and 1 minute immersion time. These were placed in 50% MS medium and incubated for 15 days. With this treatment, 100% of the explants were free of contamination and oxidation. For the multiplication phase, the highest percentage of occurrence</p>

	and number of new shoots was achieved using 50% MS medium supplemented with 1,0 mg/L of BAP and 0,3 mg/L of IAA. These results were evidenced after 20 days of incubation. Finally, 60% of explants used in 50% MS medium with 0,5 mg/L of IAA and 0,5 g/L of activated charcoal were able to be rooted.
KEYWORDS	growth regulators, in vitro culture, propagation, plant coverage

Se autoriza la publicación de este Proyecto de Titulación en el Repositorio Digital de la Institución



f _____

JOSSELYN CAROLINA MERA PATIÑO

C.I. 1724152119

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, JOSSELYN CAROLINA MERA PATIÑO, CI 1724152119 autora del trabajo de titulación: “Desarrollo de un protocolo de micropropagación *in vitro* de *Lupinus microphyllus* como aporte a la restauración de suelos degradados en el páramo del Antisana” previo a la obtención del título de **INGENIERA AMBIENTAL Y MANEJO DE RIESGOS NATURALES** en la Universidad UTE.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las Instituciones de Educación Superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de titulación de grado para que sea integrado al Sistema Nacional de información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la BIBLIOTECA de la Universidad UTE a tener una copia del referido trabajo de titulación de grado con el propósito de generar un Repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Quito, 17 de febrero de 2020



f: _____

JOSSELYN CAROLINA MERA PATIÑO

C.I. 174152419

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de tutor, certifico que el presente trabajo de titulación que lleva por título “Desarrollo de un protocolo de micropropagación *in vitro* de *Lupinus microphyllus* como aporte a la restauración de suelos degradados en el páramo del Antisana” para aspirar al título de INGENIERA AMBIENTAL Y MANEJO DE RIESGOS NATURALES desarrollado por MERA PATIÑO JOSSELYN CAROLINA, bajo mi dirección y supervisión, en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias; y que dicho trabajo cumple con las condiciones requeridas para ser sometido a las evaluaciones respectivas de acuerdo a la normativa interna de la Universidad UTE.



Roberto Granda

DIRECTOR DEL TRABAJO

C.I. 1716239593

DECLARACIÓN JURAMENTADA DEL AUTOR

Yo, **Josselyn Carolina Mera Patiño** portadora de la cédula de identidad N°, 1724152119 declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría que no ha sido previamente presentado para ningún grado o presentación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en ese documento.

La universidad UTE puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



f: _____

JOSELYN CAROLINA MERA PATIÑO

C.I. 1724152119

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios que con su bendición y guía me ha permitido culminar con esta etapa de mi vida.

A mi madre Patricia, mi mayor ejemplo de vida, que de no ser por su esfuerzo mis estudios no hubiesen sido posibles. Le doy gracias por cada abrazo y cada palabra de aliento que siempre tiene para mí en los momentos difíciles.

A mis abuelos Luis y Susana por sus consejos, apoyo incondicional y por motivarme a cumplir lo que me propongo.

A mi padre Carlos, mi hermana María José, tías y familia por siempre estar pendientes de mí y animarme durante este largo proceso. Gracias por todo su amor y cariño.

De igual manera mi más sincero agradecimiento a Roberto Granda por darme la oportunidad de realizar esta tesis, su conocimiento, paciencia, apoyo y amistad.

Finalmente a mis amigos y personas que me ayudaron en la realización de mi tesis nada hubieran sido lo mismo sin ellos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. METODOLOGÍA	9
2.1 FASE 1: IDENTIFICACIÓN Y RECOLECCIÓN DE PLANTA MADRE	10
2.1.1 UBICACIÓN	10
2.1.2 MATERIAL VEGETAL.....	10
2.2 FASE 2: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS VIABLES Y AXÉNICOS	11
2.2.1 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO BASE.....	11
2.2.2 ESTERILIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO E IMPLEMENTOS.	12
2.2.3 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS.....	13
2.2.4 ESCARIFICACIÓN.....	14
2.2.5 SIEMBRA DE SEMILLAS.....	15
2.3 FASE 3: MULTIPLICACIÓN.....	16
2.4 FASE 4: ENRAIZAMIENTO.....	17
2.5 FASE 5: ANÁLISIS DE DATOS	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
3.1 FASE 2: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS VIABLES Y AXÉNICOS	20
3.1.1 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS	20
3.1.1.1 Escarificación y germinación.....	20
3.1.1.2 Contaminación.....	21
3.1.1.3 Oxidación.....	24
3.1.1.4 Contaminación y oxidación	26
3.2 FASE 3: MULTIPLICACIÓN	28
3.2.1 Crecimiento longitudinal	28
3.2.2 Aparición de nuevos brotes.....	32
3.2.3 Número de nuevos brotes	35

	PÁGINA
3.3 FASE 4: ENRAIZAMIENTO	40
3.3.1 Aparición de raíces	40
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
4.1 CONCLUSIONES	45
4.2. RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Componentes del medio Murashige & Skoog con sacarosa y agar	12
Tabla 2. Tratamientos de desinfección de semillas <i>Lupinus microphyllus</i> para experimentación	14
Tabla 3. Medios de cultivo suplementados con auxinas y citoquininas para fase de multiplicación.	17
Tabla 4. Concentración de auxinas en medio de enraizamiento.....	18
Tabla 5. Número de ensayos no contaminados según el tratamiento aplicado	21
Tabla 6. Análisis de varianza de los factores que intervienen en cada tratamiento de desinfección con respecto a la variable contaminación	23
Tabla 7. Prueba de Duncan para comparación de tratamientos aplicados en la desinfección (contaminación).....	23
Tabla 8. Número de ensayos no oxidados según el tratamiento aplicado ...	24
Tabla 9. Análisis de varianza de los factores que intervienen en cada tratamiento de desinfección con respecto a la variable oxidación	25
Tabla 10. Prueba de Duncan para comparación de tratamientos aplicados en la desinfección (oxidación).....	26
Tabla 11. Crecimiento longitudinal después de 15 días según la concentración de BAP e IAA.....	28
Tabla 12. Análisis de varianza con respecto a la variable crecimiento longitudinal de acuerdo a la concentración de BAP e IAA	31
Tabla 13. Prueba de Duncan para la variable crecimiento longitudinal de acuerdo a la concentración de BAP e IAA	32
Tabla 14. Análisis de varianza con respecto a la variable aparición de nuevos brotes de acuerdo a la concentración de BAP e IAA.....	34
Tabla 15. Prueba de Duncan para la variable aparecimiento de nuevos brotes de acuerdo a la concentración de BAP e IAA	34
Tabla 16. Análisis de varianza con respecto a la variable número de nuevos brotes de acuerdo a la concentración de BAP e IAA.....	36
Tabla 17. Prueba de Duncan para la variable número de nuevos brotes de acuerdo a la concentración de BAP e IAA	36

Tabla 18. Análisis de varianza para los resultados de crecimiento longitudinal, aparición y número de nuevos brotes con respecto a la concentración de BAP e IAA y su interacción.	37
Tabla 19. Porcentaje de aparición de raíces de acuerdo a la concentración de IAA	40
Tabla 20. Análisis de varianza con respecto a la variable aparición de raíces de acuerdo a la concentración de IAA y al material vegetal utilizado	41
Tabla 21. Prueba de Duncan para la variable aparición de raíces brotes de acuerdo a la concentración de BAP e IAA	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Mapa de ubicación de puntos de muestreo.....	10
Figura 2. <i>Lupinus microphyllus</i>	11
Figura 3. a. vaina cerrada, b. vaina abierta	13
Figura 4. Escarificación física de semillas	15
Figura 5. Semilla germinada libre de contaminación vs semilla germinada contaminada	15
Figura 6. Semilla oxidada vs semilla sin oxidación germinada	16
Figura 7. Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	21
Figura 8. Número de ensayos no contaminados con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio.	22
Figura 9. Número de ensayos no oxidados contaminados con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio.	24
Figura 10. Número de ensayos no contaminados vs número de ensayos no oxidados según el tratamiento aplicado	27
Figura 11. Media de crecimiento longitudinal de acuerdo a la concentración de BAP e IAA.....	29
Figura 12. Media de aparición de nuevos brotes en relación a la concentración de BAP	33
Figura 13. Media de nuevos brotes de acuerdo a la concentración de IAA.	33
Figura 14. Media de nuevos brotes en relación a la concentración de BAP	35
Figura 15. Plántulas de la primera reproducción luego de 20 días en medio de multiplicación.	39
Figura 16. Plántulas de la segunda reproducción luego de 20 días en medio de multiplicación.	39
Figura 17. Explantes enraizados después de 45 en medio de cultivo con 0,5 mg/L de IAA y 0,5 g/L de carbón activado.	41

RESUMEN

El *Lupinus microphyllus* es una planta en forma de arbusto tendido cuya altura puede variar de entre 9 a 45 cm. Se encuentra distribuido en páramos de pajonal a lo largo de la cordillera de los Andes. Esta especie no requiere de un suelo muy fértil, lo que la hace capaz de crecer en suelos degradados donde otras especies no desarrollarían. Posee gran capacidad de fijación de nitrógeno por lo que es considerado un cultivo mejorador de suelos. En las faldas del Antisana la degradación del suelo ha provocado alteraciones en el nivel de fertilidad y en su capacidad de sostener cobertura vegetal lo que conlleva a la aceleración del proceso erosivo. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo de micropropagación *in vitro* de *Lupinus microphyllus*, como aporte a la restauración de suelos degradados en el páramo del Antisana. Como tratamiento pregerminativo se escarificó las semillas con lo que su porcentaje de germinación aumentó al 100%. La desinfección de semillas se logró al tratarlas con hipoclorito de sodio al 1,3% y tiempo de inmersión de 1 minuto. Estas fueron colocadas en medio MS al 50% e incubadas por 15 días. Con este tratamiento el 100% de los explantes resultaron libres de contaminación y oxidación. Para la fase de multiplicación se logró el mayor porcentaje de aparición y número de nuevos brotes al utilizar un medio MS al 50% suplementado con 1,0 mg/L de BAP y 0,3 mg/L de IAA. Estos resultados se evidenciaron al cabo de 20 días de incubación. Finalmente se logró enraizar el 60% de explantes utilizados en medio MS al 50% junto con 0,5 mg/L de IAA y 0,5 g/L de carbón activado.

Palabras clave: reguladores de crecimiento, cultivo *in vitro*, propagación, cobertura vegetal

ABSTRACT

Lupinus microphyllus is a plant in shrub form whose height can vary from 9 to 45 cm. It is distributed in pajonal paramo along the Andes mountain range. This species does not require very fertile soil, which makes it capable of growing in degraded soils where other species would not develop. It has a great capability for nitrogen fixation, which is why it is considered a soil improvement crop. In Antisana's slopes the degradation of the soil has caused alterations in the level of fertility and in its ability to sustain plant coverage, which leads to the acceleration of the erosive process. The objective of this investigation was to develop an in vitro micropropagation protocol of *Lupinus microphyllus*, as a contribution to the restoration of degraded soils in the Antisana paramo. As a pregerminative treatment, the seeds were scarified, thereby increasing their germination percentage to 100%. Seed disinfection was achieved by treating them with 1,3% sodium hypochlorite and 1 minute immersion time. These were placed in 50% MS medium and incubated for 15 days. With this treatment, 100% of the explants were free of contamination and oxidation. For the multiplication phase, the highest percentage of occurrence and number of new shoots was achieved using 50% MS medium supplemented with 1,0 mg/L of BAP and 0,3 mg/L of IAA. These results were evidenced after 20 days of incubation. Finally, 60% of explants used in 50% MS medium with 0,5 mg/L of IAA and 0,5 g/L of activated charcoal were able to be rooted.

Keywords: growth regulators, in vitro culture, propagation, plant coverage

1. INTRODUCCIÓN

Por definición se entiende como páramo a un ecosistema de montaña alta, que se encuentra situado entre los bosques andinos y las nieves perpetuas, cuya vegetación se caracteriza por ser herbácea, arbustiva y de pajonales con gran capacidad de retención de líquido vital (Novoa, 2017).

Los ecosistemas paramunos son considerados como una unidad ecológica de gran importancia a causa de los servicios ambientales que prestan. Según Hofstede (2008), los páramos son definidos principalmente como reguladores de grandes flujos de agua dulce debido a sus suelos hidromórficos, es decir suelos de baja densidad y alta permeabilidad por la presencia de poros (Daza, Hernández, & Triana, 2014). La coloración mayormente oscura del suelo de páramo se debe a que pueden acumular gran cantidad de materia orgánica, la cual sirve como indicador de un sistema de suelo poroso, que no solo permite la regulación de agua, sino además de aire y nutrientes (Zúñiga et al., 2018).

El potencial de regulación hídrica de estos ecosistemas se relaciona con su alta capacidad de retención de líquido, alcanzando condiciones de saturación entre 80–90%, siendo estos los principales abastecedores de agua para las ciudades. Por ejemplo los páramos de Papallacta y Antisana aportan con el 70% del agua que se consume en la ciudad de Quito (FONAG, 2018). Dichos ecosistemas de montaña también tienen importancia como bancos genéticos de plantas andinas endémicas.

Los páramos son considerados como biomas, presentes sobre las cadenas montañosas de los Andes de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, donde se encuentran el 99% de estos ecosistemas en el mundo (Garavito, 2015). Ecuador tiene 12.500 km² de páramo, de estos, 8.000 km² son de superficie degradada y están por encima de los 3.000 m s.n.m. Tres cuartos de todos los páramos naturales están dominados por pajonales, donde prácticamente su totalidad sufre algún grado de intervención humana (Hofstede et al., 2002).

Debido a la productividad de los suelos de páramo, el ser humano ha buscado aprovecharlos mediante actividades mineras, agrícolas y ganaderas, las cuales han ocasionado graves impactos (Novoa, 2017). La ganadería extensiva, la quema de pajonales y el sobrepastoreo son las actividades directas que más afectan la superficie de estos ecosistemas (Hofstede, 2001). Conllevan a la eliminación de la cobertura vegetal propia de estas áreas que protegen el suelo de la erosión tanto eólica como hídrica. La desaparición de la vegetación protectora de páramo, además de la exposición al agua y aire, aumenta la evaporación en su superficie provocando que los suelos volcánicos poco desarrollados se sequen irreversiblemente, liberando todos sus nutrientes de forma que no recuperan su morfología original aun cuando

se vuelven a humedecer (Daza et al., 2014). Como resultado a toda modificación en este sistema natural, la capacidad de regulación del agua de las cuencas montañosas e incluso el ciclo hidrológico se altera pudiendo disminuir la precipitación y la evapotranspiración (Buytaert et al., 2006). Esto hace que su conservación y preservación sea de alta prioridad.

En las faldas del Antisana, por años hubo sobrepastoreo que provocó la pérdida de biodiversidad y biomasa. La compactación que genera el pisoteo del ganado sobre el suelo reduce el espacio poroso para la acumulación de agua (Podwojewski & Poulénard, 2000). La degradación del suelo provoca alteraciones en el nivel de fertilidad y consecuentemente en su capacidad de sostener cobertura vegetal. Conjuntamente la eliminación de plantas propias de la zona genera fenómenos erosivos, dejando a los páramos expuestos, vulnerables y con alto porcentaje de suelo desnudo, lo que conlleva a que la colonización de especies sea menor.

Como consecuencia de la pérdida de la cubierta vegetal se acelera el proceso erosivo del suelo, se secan los humedales y la composición y estructura del ecosistema es afectada de forma irreversible, dando origen a los arenales (FONAG, 2014) (Quinteros, 2017). Por esta razón, los páramos son susceptibles a sufrir impactos ocasionados por factores humanos, lo que resulta en el deterioro ecológico y geomorfológico. A medida de que las condiciones naturales de este suelo varíen, sus características relacionadas con la captación y retención de agua se ven afectadas. A partir de esto surge la necesidad de restauración de este ecosistema.

En las áreas del Antisana donde la vegetación logra recuperarse se puede apreciar parte de su flora nativa, entre las que se destacan: *Calamagrostis intermedia*, *Festuca asplundii*, *Stipa ichu* y ciertas herbáceas como *Lupinus microphyllus* (Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales del Instituto Nacional de Biodiversidad, 2015).

Los especímenes de la familia *Fabaceae* o *Leguminosae* se encuentran extendidos alrededor de todo el planeta, desde biomas subtropicales, Alpes europeos, cordilleras andinas e incluso regiones polares (Llamas & Acedo, 2016). En cuanto al número de individuos, esta familia es la tercera más grande con 750 géneros y 20 000 especies (Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales del Instituto Nacional de Biodiversidad, 2015). Su importancia recae en que, además de que sus semillas sirven como alimento, estas plantas son principalmente de forraje y aportan al enriquecimiento del suelo. Estudios revelan que un 93% de plantas correspondientes a la familia *Fabaceae* presentan asociaciones a nivel de sus raíces con bacterias; principalmente *Rhizobium spp* para la fijación de nitrógeno atmosférico (UNNE, 2011).

Perteneciente a esta familia está el *Lupinus microphyllus*; una planta rastrera en forma de arbusto tendido cuya altura puede variar de entre 9 a 45 cm, posee ramas largas ascendentes y hojas palmeadas con abundante pubescencia (Missouri Botanical Garden, 2019). Se encuentra ampliamente distribuido en Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia en páramos de pajonal; ecosistemas de alta montaña entre 2800 a 4200 m s.n.m. (Beltrán et al., 2009) con suelos arenosos o limosos de baja fertilidad, pH de 4 a 8, con temperatura entre los 6 a 16°C (Santa Cruz, 2001) y precipitación anual con un rango de 500 a 2.000 mm (Hofstede et al., 2002).

Las especies rastreras constituyen uno de los recursos naturales más importantes que posee el páramo ya que permite la acumulación de semillas en estado de latencia de forma natural, manteniendo su viabilidad hasta que existan condiciones favorables para su germinación. A esta reserva en el suelo se la conoce como banco de semillas (Marañón, 2004). En zonas como los arenales, las corrientes de viento y la escorrentía son factores que dificultan de sobremanera la propagación por semillas, es aquí donde las plantas de forraje natural juegan un papel primordial. La importancia del cultivo de *Lupinus microphyllus* es que no requiere un suelo muy fértil, debido a que es capaz de crecer en suelos degradados donde otras especies no se desarrollarían. Además posee gran capacidad de fijación de nitrógeno, lo que convierte a esta especie en un cultivo mejorador de suelos (Benavides & Córdova, 2015).

Esta investigación se sustenta en que la principal estrategia de restauración de páramos es la reintroducción de plantas nativas mediante micropropagación vegetativa y obtención de plántulas (Aguirre, Torres, & Velasco, 2015). El *Lupinus microphyllus* es una planta con gran potencial agronómico, debido al efecto positivo sobre la fertilidad de los suelos de páramo, ya que además de servir como banco de semillas, gracias a esta se generan microclimas que favorecen la aparición de nueva vegetación (Proaño, 2011).

La micropropagación es una técnica de reproducción asexual, que permite la producción masiva de plantas en un corto lapso de tiempo. Esta técnica de biotecnología implica condiciones asépticas y controladas de forma que se puedan obtener individuos libres de patógenos, que son difíciles de obtener por medio de otros métodos tradicionales (Anis & Ahmad, 2016). El principio biológico de la micropropagación está basado en la regeneración de nuevos individuos debido a la totipotencia celular, es decir, las células poseen potencial de diferenciación y pueden dar lugar a un nuevo organismo (Loberant & Altman, 2010).

Ernest Ball fue el primer biólogo en utilizar la micropropagación para el género *Lupinus* en el año de 1946, en el cual exitosamente obtuvo plantas *in vitro* a partir de meristemos apicales de *L. albus*. Además estableció la línea base para protocolos de desinfección, multiplicación y enraizamiento utilizados en la familia de las fabáceas (Ball, 1946). Con el paso de los años a nivel internacional se han realizado más estudios que han constatado la efectividad de los cultivos *in vitro* de plantas de género *Lupinus* para asegurar la obtención de plántulas con características específicas (Ramírez, Rodríguez, Arreola, & Álvarez, 2015) que pueden ser aprovechadas en la industria agroquímica, alimenticia y farmacéutica. Al mismo tiempo este género es capaz de rehabilitar suelos pobres, debido a su alto contenido de proteínas y potencial de fijación de nitrógeno (Pniewski, Kapusta, & Legocki, 2002) por lo que es utilizado para la restauración de ecosistemas. A nivel nacional se han realizado estudios de micropropagación *in vitro* de varias especies del género *Lupinus* a manera de tesis como; el caso del *L. mutabilis* en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (Proaño, 2011) y en la Universidad de las Américas (Villacis, 2017) o el *Lupinus pubescens* en la Universidad Politécnica Salesiana (Benavides & Córdova, 2015).

La obtención de plantas mediante micropropagación *in vitro* es un proceso que se enfoca en la propagación de órganos, tejidos o células, de modo que se obtengan plantas con las mismas características de la planta madre. La micropropagación se realiza dentro de laboratorio en donde las condiciones de asepsia, luz, temperatura, humedad y pH puedan ser controladas (Villacis, 2017). La generación de nuevas plantas *in vitro* puede ser por; 1) desarrollo mejorado de yemas axilares, 2) regeneración y formación de órganos adventicios o también llamada organogénesis y 3) embriogénesis somática (Loberant & Altman, 2010)

El cultivo *in vitro* posee dos ventajas principales; favorece la obtención masiva de plantas a partir de semillas, esquejes, ápices, tejidos o células (Santa Cruz, 2001) y permite la propagación masiva de material vegetal limpio (Chamorro, Martínez, Fernandez, & Mosquera, 2007).

Según Sharry, Adema & Abedini (2015), la micropropagación consta de cinco fases. La fase 1 o preliminar comprende la selección, preparación y/o colecta de la planta madre o semillas. La elección del explante influye de forma directa sobre los problemas que pueden afectar durante el establecimiento del cultivo como por ejemplo contaminación microbiana o fúngica y oxidación de la planta (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010). Es necesario acondicionar el explante para asegurar que resista bajo condiciones de laboratorio. La fase 2 consiste en el establecimiento de cultivos viables y axénicos por lo que se debe empezar con la desinfección del explante con agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio, etanol u otros (Rojas,

García, & Alarcón, 2013). La contaminación por microorganismos representa una gran dificultad en el proceso de micropropagación ya que estos compiten junto con las plantas, por los nutrientes del medio de cultivo y pueden afectar directamente en la formación de nuevos tejidos. La fase 3 es la multiplicación del material vegetal donde su principal objetivo es aumentar la cantidad de brotes, a manera que sea posible obtener nuevos subcultivos para lo que utilizan reguladores de crecimiento que pueden emular las funciones de las fitohormonas producidas de forma natural. Los reguladores de crecimiento son compuestos sintéticos, que intervienen en los principales procesos bioquímicos en las plantas como; la ramificación y generación de brotes axilares, formación de meristemos (Laguna, Cueva, Tamariz, & Olivera, 2019), elongación de raíces (Alcántara, Acero, Alcántara, & Sánchez, 2019), entre otros. Actualmente las auxinas y citoquininas son las más utilizadas debido a que principalmente favorecen los procesos de diferenciación y multiplicación celular en esta etapa (Olmos, Luciani, & Galeano, 2010). A continuación la fase 4, es el enraizamiento y la obtención de plántulas completas donde se produce la formación de raíces adventicias para lo que generalmente las cantidades de citoquininas son reducidas. Finalmente la fase 5 es la de acondicionamiento de las plantas micropropagadas para que puedan sobrevivir a condiciones fuera de laboratorio.

El objetivo general del presente trabajo fue el de desarrollar un protocolo de micropropagación *in vitro* de *Lupinus microphyllus* para restauración de suelos degradados en el páramo del Antisana. Se realizó el análisis bibliográfico para la determinación del estado actual de la especie *L. microphyllus* en páramos ecuatorianos. Para el desarrollo del protocolo de micropropagación se determinó el método más efectivo para la desinfección de semillas; se formuló un medio de cultivo adecuado para la inducción de brotes a partir de ensayos en laboratorio, y por último, se estableció un cultivo de plantas viables de *Lupinus microphyllus*.

2. METODOLOGÍA

2.1 FASE 1: IDENTIFICACIÓN Y RECOLECCIÓN DE PLANTA MADRE

2.1.1 UBICACIÓN

La obtención de muestras de *Lupinus microphyllus* fue realizada en el cantón Archidona y el cantón Quito, debido a que la zona de muestreo se encuentra en el límite de las provincias de Pichincha y Napo, Ecuador. El material vegetal fue tomado dentro de la zona de amortiguamiento de la Reserva Ecológica Antisana, denominada como Arenal 2, cuyas coordenadas de punto central son; longitud -78,231300 y latitud -0,480803 a 4099.9 m s.n.m. Los puntos de donde las semillas fueron tomadas se muestran en la figura 1.

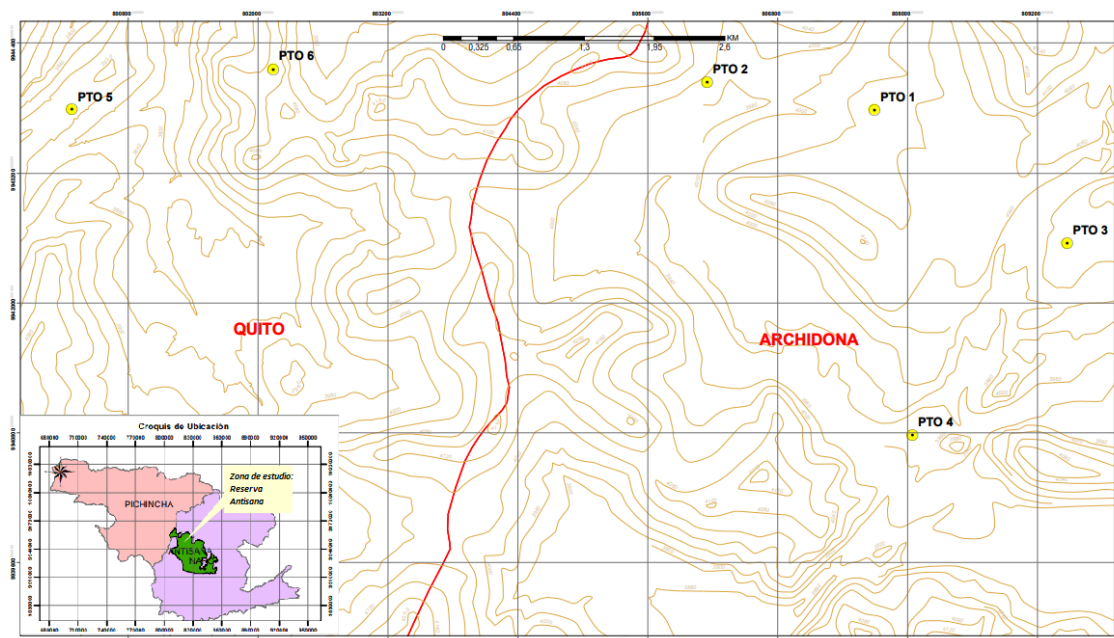


Figura 1. Mapa de ubicación de puntos de muestreo

2.1.2 MATERIAL VEGETAL

Previo a la realización de esta investigación fue necesario obtener un permiso para la toma de material vegetal, otorgado por la Dirección Provincial de Pichincha del Ministerio del Ambiente (Anexo 1). Se delimitó el área de muestreo donde se identificó las plantas madre y se extrajo alrededor de 5 vainas por planta. Dichas plantas fueron seleccionadas en base a su estado sanitario y fisiológico, es decir, visiblemente no se notó la presencia de enfermedades y poseían características de vigorosidad y tamaño, follaje frondoso, mayor número de yemas y vainas, además de presencia de brotes juveniles. Para esto se hizo uso de pinzas metálicas, tijeras podadoras, palas, fundas para muestras y frascos previamente esterilizados en los cuales el material vegetal fue trasladado dentro de una hielera a las instalaciones de la Universidad UTE – Campus Occidental. Para los posteriores ensayos se utilizaron los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias.

Las plantas que poseían vainas aun inmaduras fueron llevadas a laboratorio y almacenadas bajo condición de invernadero (Bedoya, Sánchez, Bermudez, & Ramirez, 2016), con el objeto de que las vainas tengan mayor tiempo para madurar.



Figura 2. *Lupinus microphyllus*

2.2 FASE 2: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS VIABLES Y AXÉNICOS

2.2.1 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO BASE

Para la micropropagación se utilizó el medio Murashige & Skoog (1962) enriquecido con 30 mg/L de sacarosa como fuente estéril de nutrientes para iniciar y mantener el crecimiento *in vitro*. Los componentes del medio MS se detallan a continuación en la Tabla 1.

Se preparó el medio de cultivo al 50% ya que en algunos estudios se indica que plantas sembradas bajo estas condiciones presentan mayor biomasa, puesto que los requerimientos de minerales no son tan altos, de igual forma previene la oxidación de los explantes (Jiménez, Nuñez, & Gordon, 2017).

El pH del medio de cultivo afecta la disponibilidad de nutrientes e influye directamente sobre los procesos vitales de las células, por lo que fue ajustado a 5,8 (Bogado, Vera Bravo, Ayala, Sansberro, & Luna, 2016) utilizando KOH

y H₂SO₄ como agentes reguladores. Adicionalmente se agregó agar-agar como gelificante, en concentración del 6% para que el sustrato tenga consistencia sólida.

Tabla 1. Componentes del medio Murashige & Skoog con sacarosa y agar

Componentes	mg/L
Nitrato de amonio	1650.0
Ácido bórico	6.2
Cloruro de calcio anhidro	332.2
Cloruro de cobalto • 6H ₂ O	0.025
Sulfato cúprico • 5H ₂ O	0.025
Na ₂ -EDTA	37.26
Sulfato ferroso • 7H ₂ O	27.8
Sulfato de magnesio	180.7
Sulfato de manganeso • H ₂ O	16.9
Ácido molibdeno (sal de sodio) • 2H ₂ O	0.25
Yoduro de potasio	0.83
Nitrato de potasio	1900.0
Fosfato de potasio monobásico	170.0
Sulfato de zinc • 7H ₂ O	8.6
Agar	8000.00
Glicina (base libre)	2.0
myo-Inositol	100.0
Ácido nicotínico (ácido libre)	0.5
Piridoxina • HCl	0.5
Sacarosa	30.00
Tiamina • HCl	0.1

(Merk KGaA, 2019)

2.2.2 ESTERILIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO E IMPLEMENTOS

Para evitar la contaminación, previo a la siembra de los explantes todos los materiales y herramientas; pinzas, bisturíes, matraces, envases de vidrio y tubos, además del medio de cultivo, fueron esterilizados en el autoclave a 121°C y 103.42 kPa durante 20 minutos con el fin de eliminar cualquier tipo de microorganismo.

Antes de encender la cámara, la superficie de trabajo y las paredes fueron desinfectadas con etanol al 70%. A continuación se encendió la luz ultravioleta por 15 minutos y otros 15 minutos de flujo de aire. Cualquier otra herramienta no estéril fue limpiada con alcohol antes de ser llevada al interior de la cámara con el objetivo de evitar el ingreso de contaminantes. Dentro de la cámara de flujo laminar en los tubos de ensayo una vez estériles, se dispensó 8 ml de

medio de cultivo en cada uno. Para esto se utilizó tubos de 20 mm de ancho y 125 mm de largo.

2.2.3 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Una de las principales características de las plantas de la familia de las leguminosas es que sus semillas se encuentran alojadas dentro de vainas que brindan protección ante condiciones desfavorables. Las vainas de *Lupinus microphyllus* varían de 1,5 a 2,4 cm de largo y contienen en su interior entre 3 a 6 semillas pequeñas de 1,8 a 2,8 mm de superficie lisa y color entre crema y gris oscuro (Dunn, 1955). Debido a que estas se encuentran naturalmente protegidas de contaminantes exteriores (figura 3), el porcentaje de contaminación es menor y su desinfección es menos compleja que la desinfección de esquejes.



Figura 3. a. vaina cerrada, b. vaina abierta

Para establecer el mejor método de desinfección de las semillas se tomó como base la metodología y los resultados de los estudios de micropropagación de *Lupinus montanus* (Ramírez et al., 2015), *Lupinus mutabilis* (Villacis, 2017) , *Lupinus luteus*, *L. albus* y *L. angustifolius* (Pniewski et al., 2002).

El proceso de desinfección constó de dos partes, dentro y fuera de la cámara de flujo laminar. Se determinó el protocolo como se detalla a continuación:

Fuera de la cámara de flujo laminar

1. Las vainas fueron lavadas con agua corriente procurando eliminar restos de tierra u otros contaminantes.
2. A continuación fueron sumergidas en etanol al 70% durante 1 minuto y luego pasaron a otra solución de agua destilada junto con detergente Tween 20 al 1% por 5 minutos y agitación constante.
3. Finalmente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada, previamente esterilizada en el autoclave, durante 1 minuto cada uno.

Dentro de la cámara de flujo laminar

Luego de la desinfección superficial las vainas fueron abiertas dentro de la cámara de flujo encendida. Posteriormente se experimentó con diferentes concentraciones y tiempos de inmersión de; etanol, hipoclorito de sodio y detergente Tween 20, en un total de 8 tratamientos como se muestra en la tabla 2:

Tabla 2. Tratamientos de desinfección de semillas *Lupinus microphyllus* para experimentación

Trat.	SOLUCIÓN 1		SOLUCIÓN 2			Lavados en agua destilada
	Etanol		NaClO	Tween 20		
	%	tiempo	%	tiempo		
T1	70	30 s	0,3	1 min	1 gota	3
T2				6 min		
T3	70	30 s	1	1 min	1 gota	3
T4				6 min		
T5	70	30 s	1,3	1 min	1 gota	3
T6				6 min		

Para el protocolo de desinfección de las semillas; como primer paso estas fueron sumergidas en etanol al 70% durante 30 segundos, posteriormente se sumergieron en las diferentes soluciones hipoclorito de sodio y tween 20 según los tiempos establecidos en la tabla 2, y finalmente se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril.

2.2.4 ESCARIFICACIÓN

Las semillas presentan una cutícula externa impermeable que brinda protección en caso de condiciones desfavorables, asegurando su supervivencia. El grado de latencia de las semillas es condicionado principalmente por factores ambientales como temperatura y humedad (Varela & Arana, 2011). Según Santa Cruz, Soltero, & Portillo, (2009) para acelerar el proceso de desarrollo de plántulas, es necesario realizar un tratamiento pre-germinativo con el objetivo de terminar con la latencia natural de las semillas y disminuir la dureza de las mismas. Este proceso es llamado escarificación para el cual se realizó una pequeña incisión en el lado opuesto del embrión (escarificación física) precautelando no dañarlo como se puede apreciar en la figura 4. Todas las semillas fueron escarificadas previo a la siembra, a excepción de 10 semillas que sirvieron como tratamiento testigo.

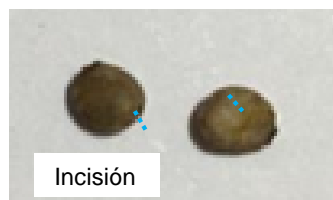


Figura 4. Escarificación física de semillas

2.2.5 SIEMBRA DE SEMILLAS

La inoculación de los explantes fue realizada dentro de la cámara de flujo laminar ya que esta permite mantener condiciones asépticas. Una vez realizada la desinfección y escarificación a cada una de las semillas se prosiguió a hacer la siembra colocando una semilla en cada tubo procurando colocarla en el centro sin hundirla en el medio de cultivo y evitando tocar las paredes del tubo. La forma de cubrir los tubos fue con tapones de gasa y algodón para prevenir el ingreso de contaminantes y permitir el intercambio de gases. Para evaluar la efectividad de los tratamientos propuestos se realizaron 15 ensayos por cada uno de ellos y fueron incubados bajo temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodos de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz junto con humedad relativa del 40%.

Los ensayos realizados fueron evaluados mediante observación, al paso de 15 días donde se identificó la presencia o ausencia de contaminación, al igual que presencia o ausencia de oxidación como se muestra en las figuras 5 y 6 a continuación.

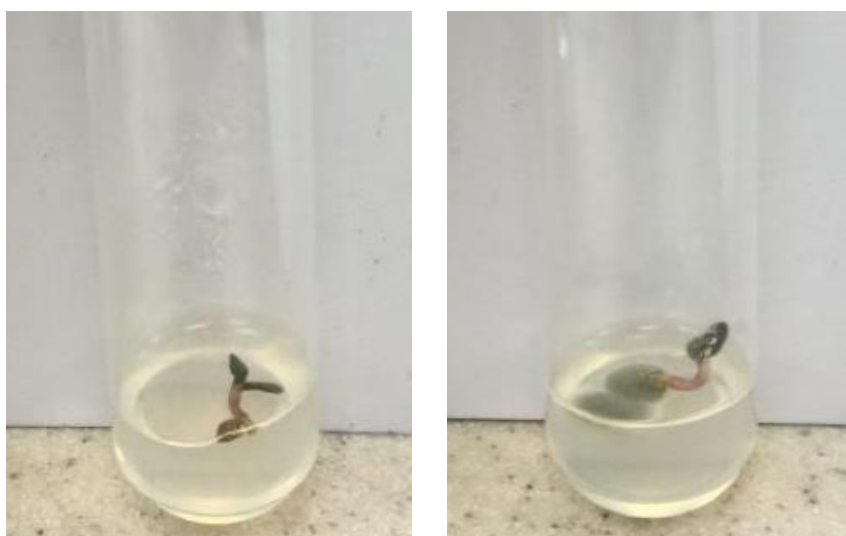


Figura 5. Semilla germinada libre de contaminación vs semilla germinada contaminada

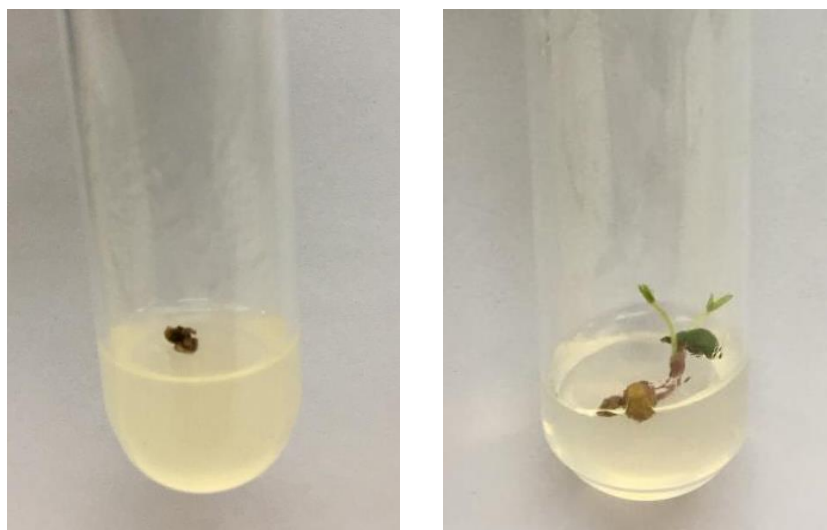


Figura 6. Semilla oxidada vs semilla sin oxidación germinada

La efectividad de los tratamientos utilizados en esta fase fue evaluada mediante un análisis estadístico ANOVA y la prueba de comparaciones de Duncan, valorando la contaminación, supervivencia y germinación de los explantes. Este análisis fue realizado en el programa estadístico SPSS en su versión 22.0. (IBM, 2019)

2.3 FASE 3: MULTIPLICACIÓN

Una vez establecido el mejor método para la obtención de plántulas, se prosiguió con la fase de multiplicación, para la cual se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. Durante esta fase se buscó obtener el mayor número de plantas posibles a partir del material vegetal conseguido en la fase anterior, mediante la estimulación del crecimiento de yemas axilares en menor tiempo.

Partiendo de las plántulas germinadas *in vitro*, para extraer los nuevos brotes, se realizaron cortes en pequeños segmentos de 1 a 1,5 cm y estos fueron sembrados en distintos medios de cultivo (MS al 50%) suplementados con auxinas y citoquininas, como se muestra en la tabla 3. Para la determinación del tipo de regulador de crecimiento y su concentración se referenció en estudios de micropropagación anteriormente realizados con especies *pubescens* (Benavides & Córdova, 2015) y *stipulatus* (Santa Cruz et al., 2009) pertenecientes al género *Lupinus*. A medida que los explantes crecieron, este procedimiento fue repetido para continuar con la obtención de nuevo material vegetal.

Tabla 3. Medios de cultivo suplementados con auxinas y citoquininas para fase de multiplicación.

	Combinación de reguladores	
	Citoquinina	Auxina
	BAP mg/L	IAA mg/L
M1		0,3
M2	0,5	0,5
M3		1
M4		0,3
M5	1	0,5
M6		1

Para cada medio de cultivo propuesto se realizaron 20 ensayos que luego fueron incubados bajo temperatura constante de 25°C +/- 2°C, fotoperiodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, junto con humedad relativa del 40%. Al cabo de 30 días del trasplante, mediante observación fueron evaluados los siguientes índices de multiplicación:

- ✓ Crecimiento longitudinal de la plántula: se realizó una medición en centímetros a partir de la base del tallo para determinar el crecimiento del mismo.
- ✓ Aparición de nuevos brotes: se determinó la presencia de crecimiento de nuevos brotes, dando valores de "1" presencia y "0" ausencia.
- ✓ Número de brotes: se realizó un conteo del total de brotes por plántula.

Al igual que en la fase 2, para la determinación de diferencias significativas en cuanto a las variables anteriormente mencionadas, se utilizó ANOVA y prueba de Duncan.

2.4 FASE 4: ENRAIZAMIENTO

El enraizamiento es la última fase dentro de la micropropagación en laboratorio para lo que los explantes obtenidos en la multiplicación, se sometieron a un proceso de enraizamiento bajo condiciones controladas para la obtención de plantas completas. De acuerdo a la literatura revisada, en esta fase al prescindir de citoquininas se obtiene mayor porcentaje de enraizamiento (Peña, 2009) y (Santa Cruz, 2001).

Para inducir la formación de raíces se probó con medio MS al 50% (Orquera, 2013) suplementado con IAA en diferentes concentraciones más carbón activado.

De acuerdo con Villacis (2017), el carbón activado ayuda en la prevención de oxidación, por su capacidad de absorción de compuestos que pueden ser producidos por la misma plántula pero a su vez pueden resultar tóxicos y

conllevar a la muerte del explante. Este agente antioxidante fue utilizado en una única concentración de 0,5 g/L a excepción de en 3 tubos de ensayo, 1 por cada medio, donde no se les agregó carbón activado para determinar si influyen o no en el enraizamiento. Los medios de cultivo empleados en esta etapa se detallan en la tabla 4. Se sembraron un total de 20 brotes para cada medio, mismos que fueron incubados bajo temperatura constante de 25°C +/- 2°C, fotoperiodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y humedad relativa del 40%.

Tabla 4. Concentración de auxinas en medio de enraizamiento

Medio de enraizamiento		
	Auxina	Carbón activado
M1	IAA 0,2 mg/L	
M2	IBA 0,5 mg/L	0,5 g/L
M3	IAA 1,0 mg/L	

La variable considerada y evaluada una vez transcurridos 20 días, fue:

- ✓ Aparición de raíces: se dio valores de “1” presencia y “0” ausencia a la formación de nuevas raíces.

2.5 FASE 5: ANÁLISIS DE DATOS

Como se mencionó anteriormente para el procesamiento estadístico e interpretación de datos se realizó análisis de varianza (ANOVA) para las fases de desinfección, multiplicación y enraizamiento con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas. De igual forma se utilizó la prueba de Duncan para la determinación de los tratamientos más efectivos. Para estos análisis estadísticos se utilizó el programa SPSS (IBM, 2019).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 FASE 2: ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS VIABLES Y AXÉNICOS

Se evaluó los tratamientos de desinfección de semillas de *Lupinus microphyllus* propuestos anteriormente.

3.1.1 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Para el proceso de desinfección de semillas fueron utilizados seis distintos tratamientos en los que se varió la concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) en dos tiempos de inmersión (Tabla 2). Al cabo de 15 días a partir de la siembra, se evaluaron las variables de germinación, contaminación y oxidación de las semillas.

3.1.1.1 Escarificación y germinación

El tratamiento pregerminativo de escarificación previo a la inducción al medio de cultivo permitió reducir el tiempo de germinación de manera evidente ya que el 100% de las semillas en las cuales se realizó la incisión lateral, germinaron exitosamente contrastando con las 10 semillas que sirvieron de tratamiento testigo en las cuales no se realizó ningún corte, de las cuales solo 3 germinaron en menos de una semana. Al obtener resultados notoriamente diferentes en base a una sola variable, no se realizó un análisis estadístico.

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Manotoa (2012) quien al evaluar tres tratamientos de escarificación; física, química y térmica, en semillas de *Olea europea*, obtuvo los mejores resultados de germinación (63,5%) y supervivencia (53,24%) en aquellas semillas a las que se les realizó cortes laterales.

Otros estudios realizados con otras especies de género *Lupinus* como *L. elegans* (Corona, Gómez, & Lindig, 2007) y *L. montanus* (Ramírez et al., 2015) confirman que el realizar un corte lateral en la testa, termina la latencia e incrementa el porcentaje de germinación en un menor tiempo.

Al cabo de 20 días a partir de la siembra de las semillas se obtuvieron las primeras plántulas obtenidas por germinación *in vitro* con longitud de 1,3 cm y 0,8 brotes en promedio (Figura 7).



Figura 7. Plántulas germinadas *in vitro*

3.1.1.2 Contaminación

Con respecto a la variable contaminación, casi todos los tratamientos presentaron índices de contaminación ya sea bacteriana o fúngica a excepción del tratamiento 5. Por esta razón se determinó que en el método de desinfección más efectivo se utilizó una concentración de 1,3% de hipoclorito de sodio con tiempo de inmersión de 1 minuto. De este tratamiento se obtuvieron 15 semillas sin contaminación de un total de 15. El tratamiento número 2 de igual manera presentó bajos índices de contaminación, obteniendo 12 de 15 ensayos libres de contaminación.

Por otra parte el tratamiento menos efectivo fue el número 1 que utilizó hipoclorito de sodio al 0,3% y tiempo de inmersión de 1 minuto de donde se obtuvieron apenas 4 semillas sin contaminación. A continuación en la tabla 5 y figura 8 se detallan mejor los resultados obtenidos para cada tratamiento evaluando la variable contaminación.

Tabla 5. Número de ensayos no contaminados según el tratamiento aplicado

	Concentración NaClO %	Tiempos de inmersión	Media de crecimiento
T1	0,3		3
T3	1,0	1 min	4
T5	1,3		15
T2	0,3		12
T4	1,0	6 min	7
T6	1,3		14

Como se observa en la figura 8, con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio, utilizando 1 minuto como tiempo de inmersión, a medida que la concentración de este aumenta, el número de explantes sin contaminación aumenta de igual manera. Al utilizar 6 minutos como tiempo de inmersión no se pudo notar la existencia de una relación directa entre estos factores.

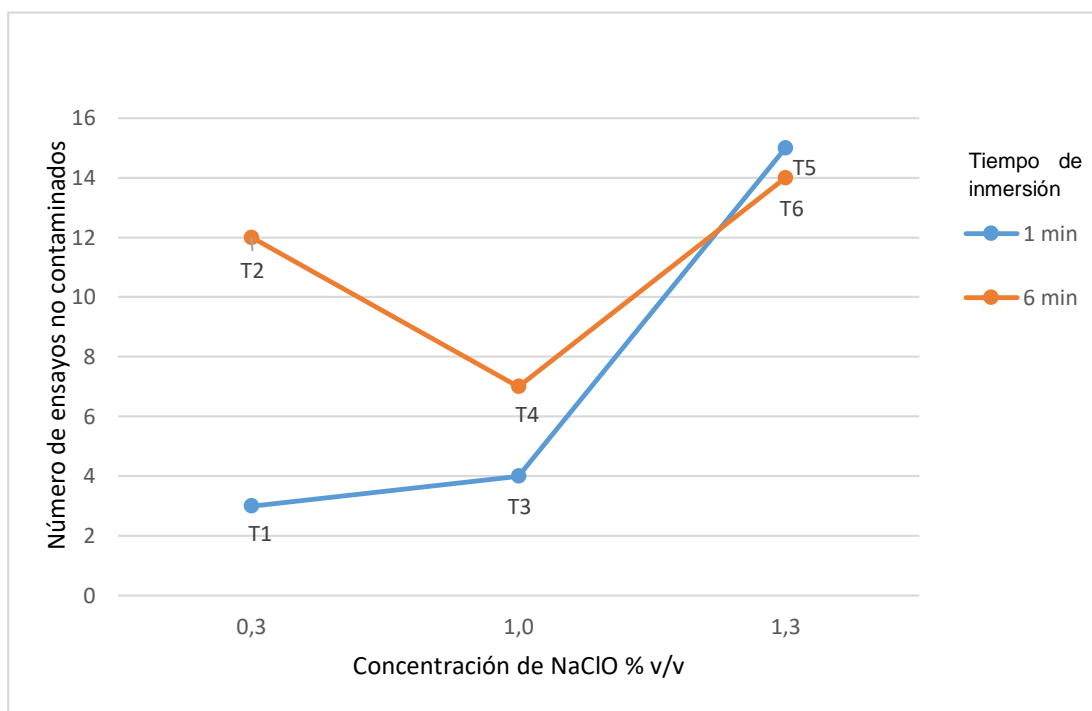


Figura 8. Número de ensayos no contaminados con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio.

Para la comparación de medias de acuerdo a la variable contaminación, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para la determinación de diferencias significativas detalladas en la Tabla 6, misma que se interpretó de la siguiente manera:

Al evaluar el factor NaClO y el factor tiempo por separado, se obtuvo valores de 0,0001 y 0,0034 respectivamente como valores críticos (α). Puesto que los valores son menores a 0,05, se concluye que existen diferencias significativas en las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y los tiempos de inmersión. En cuanto a la interacción de los factores (NaClO*Tiempo) el valor crítico (α) fue de 0,005, esto indica que la diferencia entre los tratamientos afecta directamente (es significativa) sobre la variable contaminación.

Tabla 6. Análisis de varianza de los factores que intervienen en cada tratamiento de desinfección con respecto a la variable contaminación

Variable dependiente: Contaminación

Origen	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor crítico (α)
Modelo corregido	8,989 ^a	5	1,798	12,178	0,0000
Intersección	33,611	1	33,611	227,688	0,0000
NaClO	5,956	2	2,978	20,172	0,0001
Tiempo	1,344	1	1,344	9,108	0,0034
NaClO * Tiempo	1,689	2	0,844	5,720	0,0050
Error	12,400	84	0,148		
Total	55,000	90			
Total corregido	21,389	89			

R al cuadrado = ,420 (R al cuadrado ajustada = ,386)_a

Para determinar estadísticamente qué tratamientos difieren, se utilizó la prueba de Duncan que agrupa los resultados en subgrupos homogéneos de acuerdo a las medias obtenidas. Esta prueba fue aplicada a los tratamientos realizados ya que cada uno variaba la concentración de NaClO y el tiempo de inmersión. Se evaluó la contaminación del explante, con valores de 0 presencia y 1 ausencia de contaminación. De acuerdo a las diferentes combinaciones se determinó que los tratamientos más efectivos fueron los del grupo B que poseen medias más cercanas a 1. El mejor resultado se obtuvo con el tratamiento número 5 (NaClO al 1,3% y 1 minuto de inmersión), seguido del tratamiento 2 (NaClO al 0,3% y 6 minutos de inmersión) y finalmente el tratamiento 6 (NaClO al 1,3% y 6 minutos de inmersión)

Tabla 7. Prueba de Duncan para comparación de tratamientos aplicados en la desinfección (contaminación)

Variable dependiente: Contaminación
Duncan

Tratamiento	Media	Subconjunto	
		1	2
T1	0,200	A	
T3	0,267	A	
T4	0,467	A	
T6	0,800		B
T2	0,933		B
T5	1,000		B

3.1.1.3 Oxidación

Para la variable oxidación se evaluó la mortalidad de las semillas con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. El mayor número de semillas germinadas y sin oxidación se obtuvo con el tratamiento 5 que utilizó hipoclorito de sodio al 1,3% y tiempo de inmersión de 1 minuto. Bajo este tratamiento de los 15 ensayos realizados, de todos se obtuvieron plántulas viables. El tratamiento 2, 0,3% de NaClO y tiempo de inmersión de 6 minutos también brindó resultados favorables obteniendo 14 de 15 ensayos libres de oxidación.

El tratamiento menos efectivo fue el número 6, aquel que utilizó NaClO al 1,3% y 6 minutos de tiempo de inmersión ya que se oxidaron 11 de las 15 semillas sembradas. Los resultados de los otros tratamientos evaluados en relación a la oxidación, se muestran en la tabla 8 y figura 8 a continuación.

Tabla 8. Número de ensayos no oxidados según el tratamiento aplicado

	Concentración de NaClO %	Tiempos de inmersión	Media de crecimiento
T1	0,3		11
T3	1,0	1 min	9
T5	1,3		15
T2	0,3		13
T4	1,0	6 min	7
T6	1,3		4

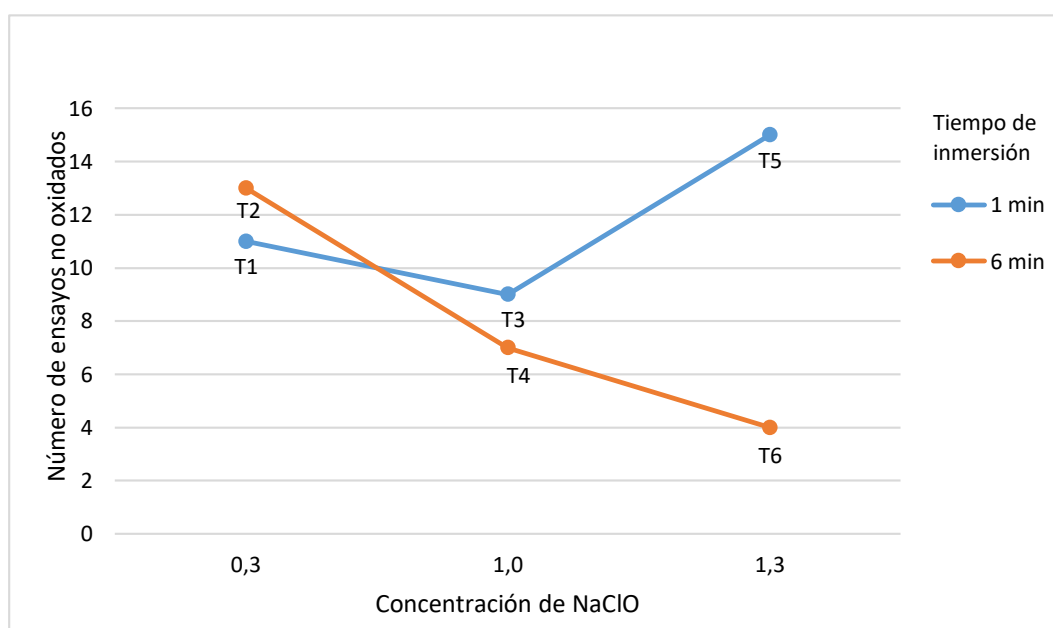


Figura 9. Número de ensayos no oxidados contaminados con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio.

Con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio, cuando el tiempo de inmersión fue de 6 minutos, a menor concentración de NaClO mayor número de explantes no oxidados, mientras que al utilizar 1 minuto como tiempo de inmersión no se vio una relación directa para ambos factores.

Al igual que para la variable contaminación, la comparación de medias en cuanto a la oxidación, utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas como se detalla en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis de varianza de los factores que intervienen en cada tratamiento de desinfección con respecto a la variable oxidación

Variable dependiente: Oxidación

Origen	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor crítico (α)
Modelo corregido	5,389 ^a	5	1,078	6,062	0,0000
Intersección	38,678	1	38,678	217,563	0,0000
NaClO	1,089	2	,544	3,062	0,0520
Tiempo	1,344	1	1,344	7,562	0,0730
NaClO * Tiempo	2,956	2	1,478	8,312	0,0005
Error	14,933	84	0,178		
Total	59,000	90			
Total corregido	20,322	89			

a. R al cuadrado = ,265 (R al cuadrado ajustada = ,221)

Al evaluar el factor de NaClO y el factor tiempo por separado, los valores críticos (α) obtenidos fueron de 0,0520 y 0,0730 respectivamente, es decir existen diferencias significativas con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio pero no en base a los tiempos de inmersión ya que su valor es mayor a 0,05. De la combinación de los factores (NaClO*Tiempo) se obtuvo el valor de 0,0005, es decir bajo estas condiciones la diferencia entre los tratamientos es significativa sobre la variable oxidación.

Para determinar estadísticamente qué tratamientos difieren, se utilizó la prueba de Duncan (Tabla 10). Se evaluó la oxidación del explante, con valores de 0 presencia y 1 ausencia de oxidación. De acuerdo a las diferentes combinaciones se determinó que los tratamientos más efectivos fueron los del grupo B que poseen medias más altas. El mejor resultado se obtuvo con el tratamiento número 5 (NaClO al 1,3% y 1 minuto de inmersión), el tratamiento 2 (NaClO al 0,3% y 6 minutos de inmersión) y el tratamiento 1 (NaClO al 0,3% y 1 minutos de inmersión).

Tabla 10. Prueba de Duncan para comparación de tratamientos aplicados en la desinfección (oxidación)

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
T6	0,267	A	
T4	0,467	A	
T3	0,600	A	B
T1	0,733		B
T2	0,867		B
T5	1,000		B

3.1.1.4 Contaminación y oxidación

En base a los resultados obtenidos en el análisis de las variables contaminación y oxidación, se puede concluir que: el tratamiento 1 (0,3% NaClO, 1 min) fue el menos efectivo ya que de este se obtuvo el menor número de plántulas viables y presentó el mayor índice de contaminación debido a la baja concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión utilizado. Los tratamientos 3 (1% NaClO, 1 min) y 4 (1% NaClO, 6 min) presentaron menor porcentaje de contaminación y oxidación, pero aun así los resultados no eran los deseados ya que mostraron contaminación bacteriana y fúngica en los primeros siete días de evaluación.

Por otro lado el tratamiento 6 (1,3% NaClO, 6 min), el cual utilizó la mayor concentración de hipoclorito de sodio y el mayor tiempo de inmersión, resultó efectivo para eliminar contaminantes; sin embargo, fue el que obtuvo los índices más altos de oxidación, por lo tanto a mayor concentración de NaClO, menor presencia de contaminación pero a su vez mayor oxidación de explantes.

Esto concuerda con Bedoya, Sánchez, Bermudez, & Ramirez (2016) quienes sostienen que aunque en términos de contaminación, el uso de concentraciones de hipoclorito de sodio superiores al 1% por largos periodos de tiempo resultan efectivas, el grado de oxidación generado afectó directamente en la obtención de cultivos *in vitro* de *Aloysia tryphilla*.

Los tratamientos más efectivos fueron el número 2 y 5, donde el tratamiento 2 (0,3% NaClO, 6 min) presentó el 80% de ensayos con resultados favorables de acuerdo a la contaminación y oxidación de los mismos. Dicho tratamiento aplicó menor concentración de hipoclorito de sodio y mayor tiempo de inmersión. Mientras que en el tratamiento 5 (1,3% NaClO, 1 min), consistió en utilizar mayor concentración de NaClO y menor tiempo de inmersión. De los 15 ensayos realizados se obtuvo el 100% de estos libres de contaminación y oxidación.

Estos resultados se asemejan a lo reportado por Sánchez y Salaverría (2004). En su estudio de control de la oxidación y contaminación en el cultivo *in vitro* de *Fragaria X ananassa*, concluyen que para obtener el equilibrio óptimo entre las concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión fue necesario utilizar concentraciones altas de NaClO con un bajo tiempo de inmersión o viceversa. De este modo se logró la descontaminación del explante y a su vez se evitó la oxidación del mismo, obteniendo el mayor porcentaje de plántulas viables.

Para determinar el tratamiento más eficaz en base a la viabilidad y descontaminación, se seleccionó aquel cuya interacción posea el punto más alto entre las variables contaminación y oxidación como se observa en la figura 10

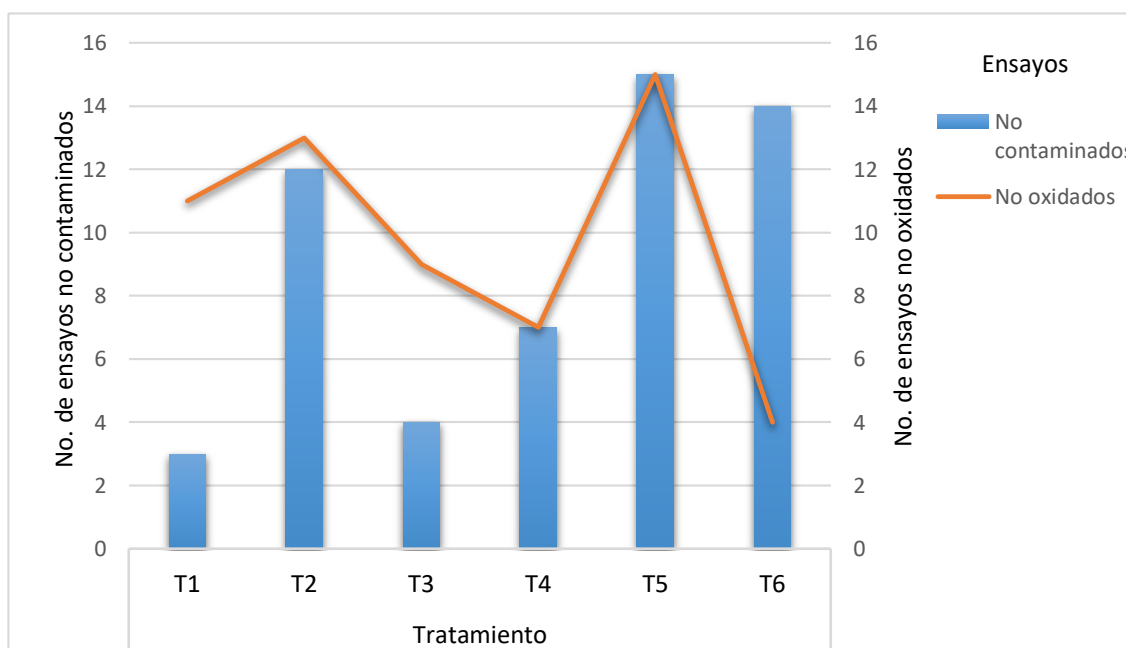


Figura 10. Número de ensayos no contaminados vs número de ensayos no oxidados según el tratamiento aplicado

Como se indica en el la figura 10, de acuerdo a los datos obtenidos conforme a la contaminación y oxidación, es evidente que el mejor tratamiento aplicado al desinfectar las semillas es el número 5 (1,3% NaClO, 1 min), con el cual se logró obtener el mayor número de plántulas viables. Esta hipótesis concuerda con lo propuesto por (Benavides & Córdova, 2015) quienes indican que la combinación de etanol e hipoclorito de sodio en intervalos cortos son los mejores agentes descontaminantes y además favorecen la desinfección y aumentan la viabilidad del explante.

La desinfección es uno de los procesos más importantes durante la micropropagación *in vitro* ya que si no es realizada correctamente puede existir contaminación por bacterias u hongos tanto endógenos como

exógenos, que conllevan a la pérdida total del explante puesto que no podrá crecer si existe proliferación de microorganismos (Villacis, 2017).

En otros estudios realizados a especies del mismo género *Lupinus*, para el desarrollo de protocolos de desinfección han utilizado varios agentes desinfectantes como el cloruro de mercurio, hipoclorito de calcio, hipoclorito de sodio y etanol, siendo los dos últimos los más efectivos para la remoción de contaminantes (Ramírez et al., 2015 y Pniewski 2002). El tratamiento número 5 proporcionó un equilibrio óptimo en la concentración de NaClO y el tiempo de inmersión, el cual permitió la germinación de las semillas libres de contaminación.

Según los resultados obtenidos se puede decir que la germinación de semillas *in vitro* es el mejor método para la obtención de material vegetal viable y libre de contaminación.

3.2 FASE 3: MULTIPLICACIÓN

Durante esta fase se evaluó seis medios de cultivo formulados con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento; auxina (IAA) y citoquinina (BAP), para estimular la aparición de nuevos brotes y crecimiento longitudinal de las plántulas, tomando como referencia los resultados de estudios previamente citados.

3.2.1 Crecimiento longitudinal

El crecimiento longitudinal del tallo de los explantes fue evaluado a los 15 días desde la inducción al medio de cultivo suplementado con BAP e IAA. El medio más efectivo para el crecimiento longitudinal fue el M3; que utilizó BAP 0,5 mg/L e IAA 1,0 mg/L, del cual se obtuvo plántulas con 3,3 cm de longitud en promedio. Por otra parte el medio con el promedio más bajo 2,1 cm, fue el M1 que utilizó BAP 0,5 mg/L e IAA 0,3 mg/L. Los resultados de los medios de cultivo con respecto al crecimiento se detallan en la tabla 11 a continuación.

Tabla 11. Crecimiento longitudinal después de 15 días según la concentración de BAP e IAA

	Concentración BAP mg/L	Concentración IAA mg/L	Media de crecimiento cm
M1		0,3	2,1
M2	0,5	0,5	2,3
M3		1,0	3,3
M4		0,3	2,2
M5	1	0,5	2,9
M6		1,0	2,2

En la figura 11 se puede observar cómo se obtiene un mayor porcentaje de crecimiento del tallo al utilizar menor concentración de BAP (0,5 mg/L) mientras las auxinas aumentan. Soto (2019), al propagar *Ñuñu suntu* concluyó que existe una relación inversa entre el crecimiento de los brotes y la concentración de BAP, es decir a mayor concentración de BAP, menor crecimiento de tallos. Los mejores resultados de este estudio se dieron utilizando 0,5 ppm de BAP en conjunto con 1,0 ppm de IBA. Ayala (2011), es su estudio con *Schinus molle L.* reportó que la formación de meristemas que permiten mayor crecimiento en longitud de los explantes es una consecuencia de la adición de citoquininas y auxinas al medio de cultivo.

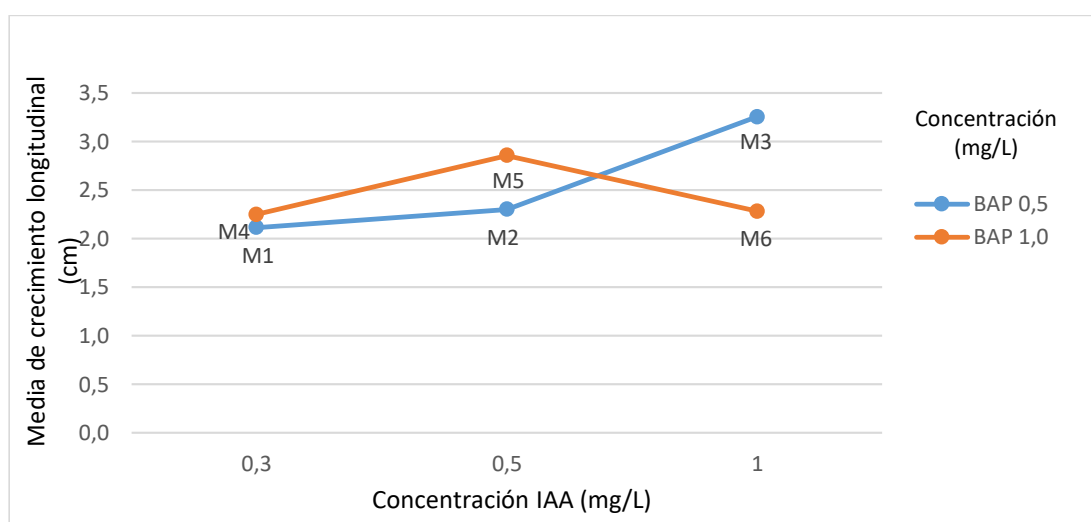


Figura 11. Media de crecimiento longitudinal de acuerdo a la concentración de BAP e IAA

Además del crecimiento de tallo se evidenció la formación de callos en el 100% de los ensayos realizados con reguladores de crecimiento, al mismo tiempo que se pudo contrastar el grosor de los tallos de las plántulas. Se determinó visualmente que el grosor de los tallos fue mayor en aquellas plántulas que se encontraban en los medios suplementados con BAP e IAA (figura 13 y 14) en comparación que las plántulas que se encontraban solo en medio MS (figura 12).



Figura 12. Explante a los 20 días en medio MS

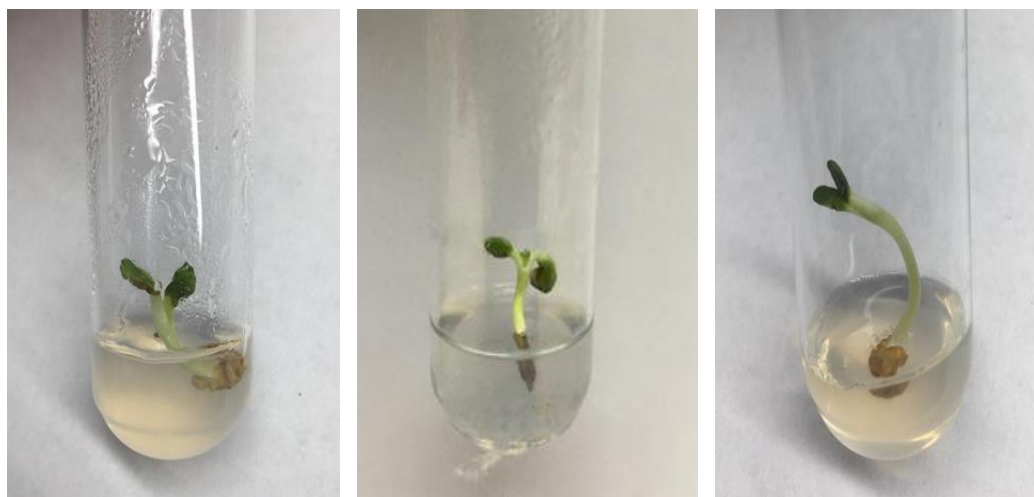


Figura 13. Explantes a los 20 días en medio con 0,5 mg/L de BAP



Figura 14. Explantes a los 20 días en medio con 1,0 mg/L de BAP

En los medios 4, 5 y 6 se evidenció que el tamaño del callo era mayor, esto debido a la presencia de BAP en mayor concentración. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Benavides y Córdova en su estudio de *Lupinus pubescens* (2015), quienes al trabajar con BAP e IAA de igual manera obtuvieron presencia de callos en todos los tratamientos aplicados. En el estudio de micropropagación de piñón, Peña (2009) obtuvo resultados similares consiguiendo mayor formación de callos cuando utilizó BAP en concentraciones superiores 0,5 ppm.

De estos resultados se pudo concluir que a mayor concentración de BAP, mayor formación de callos, además mayor grosor de tallo con lo que se deduce que estas dos variables se encuentran relacionadas entre sí ya que al obtener tallos más gruesos, existe mayor probabilidad de formación de callo (Peña, 2009)

Con respecto al crecimiento longitudinal del tallo, el análisis de varianza de esta variable (Tabla 12) se realizó descomponiendo las contribuciones de los factores que influyen sobre esta. Evaluando la concentración de BAP y la concentración de IAA por separado se obtuvieron valores críticos de 0,5359 y 0,0065 respectivamente, lo que indica que solo la concentración de IAA representa una diferencia significativa con respecto al crecimiento, puesto que su valor crítico es menor a 0,05. De acuerdo a la combinación de los factores (BAP*IAA) se obtuvo un valor de 0,0001, es decir que bajo la interacción de ambos reguladores de crecimiento la diferencia entre los medios de cultivo es significativa.

Tabla 12. Análisis de varianza con respecto a la variable crecimiento longitudinal de acuerdo a la concentración de BAP e IAA

Variable dependiente: Crecimiento longitudinal

Origen	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor crítico (α)
Modelo corregido	11,345 ^a	3	3,782	8,580	0,0001
Interceptación	73,804	1	73,804	167,437	0,0001
Concentración BAP	0,196	1	0,196	0,39	0,5359
Concentración IAA	5,428	2	2,714	5,35	0,0065
BAP * IAA	6,702	5	12,657	23,80	0,0001
Error	37,908	86	0,441		
Total	615,760	90			
Total corregido	49,253	89			

a. R al cuadrado = ,230 (R al cuadrado ajustada = ,204)

Una vez establecido que las diferentes concentraciones de BAP e IAA tienen significancia sobre la variable crecimiento, para determinar estadísticamente

qué medios de cultivo difieren, se empleó la prueba de Duncan. De acuerdo a la media de crecimiento se agruparon los resultados en 3 subgrupos como se indica en la tabla 13. Los medios más efectivos fueron los pertenecientes al grupo C que poseen los promedios más altos. El mejor resultado se obtuvo con el medio 3, formulado con 0,5 mg/L de BAP y 1,0 mg/L de IAA.

Tabla 13. Prueba de Duncan para la variable crecimiento longitudinal de acuerdo a la concentración de BAP e IAA

Medio	N	Subconjunto		
		1	2	3
M1	2,11	A		
M4	2,24	A	B	
M6	2,29	A	B	
M2	2,30	A	B	
M5	2,85		B	C
M3	3,25			C
Sig.		0,967	0,109	0,528

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

Benavides y Córdova (2015) obtuvieron resultados similares en su estudio de propagación *in vitro*, donde se obtuvieron los mejores resultados con el tratamiento que utilizó 0,5 ppm de BAP y 1,0 ppm de IAA y afirmaron que a menor presencia de BAP, se facilita la elongación de tallos en plántulas durante la fase de multiplicación.

3.2.2 Aparición de nuevos brotes

Para la evaluar la aparición de nuevos brotes, se dio valores de 0 para ausencia y 1 presencia de nuevos brotes, de esta forma los tratamientos M3, M4 y M5 cuyas medias fueron superiores a 0,5 resultaron los más efectivos mientras que los medios M1, M2 y M6 no superaron el promedio como se puede apreciar en la figura 12.

La concentración más efectiva fue la de 1,0 mg/L de BAP con 0,3 mg/L de IAA (M4) de la cual el 93,33% de plántulas obtuvieron nuevos brotes. Estos resultados concuerdan completamente con Peña (2009), quien reportó que los mejores tratamientos utilizados en su estudio, fueron aquellos compuestos por BAP en concentración de 1,0 mg/L junto con una auxina en concentraciones no mayores a 1,0 mg/L

Según Orquera (2013), las elevadas concentraciones de citoquininas y de auxinas conllevan a la inhibición de formación de nuevos brotes. Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con el anteriormente mencionado ya que el medio de cultivo con menores resultados para el crecimiento de nuevos brotes fue el M6 que utilizó 1,0 mg/L de BAP y 1,0 mg/L

de IAA con el que solo el 20% de las plántulas respondió favorablemente con la aparición de brotes. Dicho medio fue el que utilizó las concentraciones más altas de BAP e IAA durante esta fase.

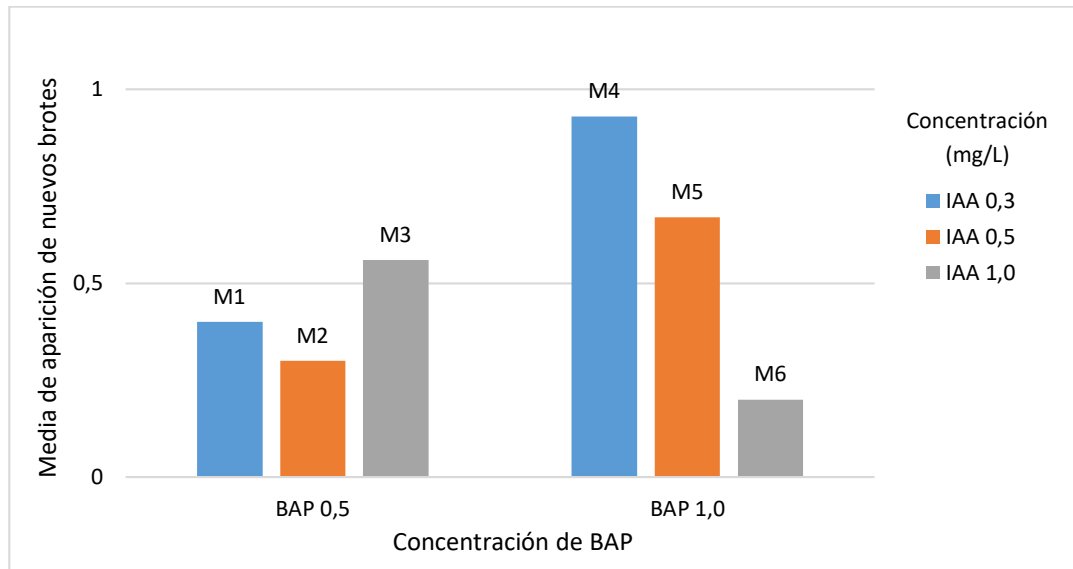


Figura 12. Media de aparición de nuevos brotes en relación a la concentración de BAP

Aquellos medios de cultivo que fueron formulados con 1,0 mg/L de BAP (M4, M5) a excepción del M6 demuestran tener mayor porcentaje de aparición de nuevos brotes, mismo que es inversamente proporcional a la concentración de IAA. En los medios (M1, M2 y M3) que utilizaron 0,5 mg/L de BAP, la presencia de nuevos brotes disminuyó debido a la baja concentración de BAP en el medio de cultivo (Figura 13). Según Jordan y Casaretto (2006), esto se debe a la influencia que ejerce la 6-Bencilaminopurina sobre la morfogénesis de los brotes y el rompimiento de la latencia de yemas.

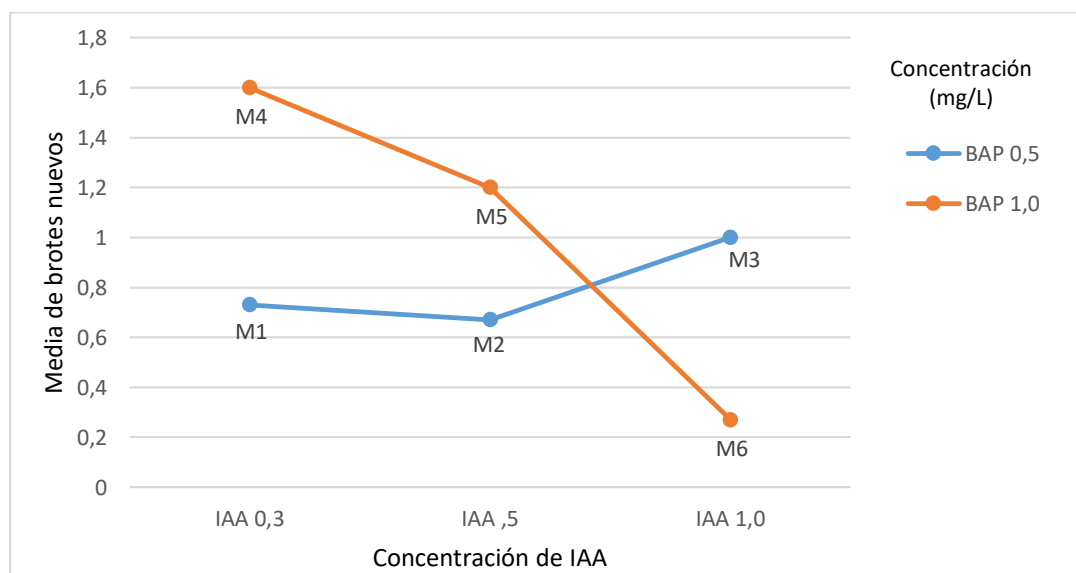


Figura 13. Media de nuevos brotes de acuerdo a la concentración de IAA

Al realizarse el análisis de varianza para la variable aparición de nuevos brotes (Tabla 14), las concentraciones de BAP e IAA independientemente, no representan diferencias significativas puesto que sus valores críticos 0,3561 y 0,0771 respectivamente, son superiores a 0,05. El factor BAP*IAA obtuvo un valor de 0,0002 lo que demuestra que la interacción de ambos reguladores de crecimiento tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la aparición de nuevos brotes.

Tabla 14. Análisis de varianza con respecto a la variable aparición de nuevos brotes de acuerdo a la concentración de BAP e IAA

Variable dependiente: aparición de nuevos brotes

Origen	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor crítico (α)
Modelo corregido	5,156a	5	1,031	4,997	0,0001
Interceptación	23,511	1	23,511	113,938	0,0001
Concentración BAP	0,178	1	0,178	0,862	0,3561
Concentración IAA	1,089	2	,0544	2,638	0,0771
BAP * IAA	3,889	2	1,944	9,423	0,0002
Error	17,333	84	0,206		
Total	46,000	90			
Total corregido	22,489	89			

a. R al cuadrado = ,229 (R al cuadrado ajustada = ,183)

Luego de determinar que las diferentes concentraciones de BAP e IAA tienen significancia en la aparición de nuevos brotes se realizó la prueba de Duncan (Tabla 15), mediante la cual se pudo agrupar los resultados en tres subconjuntos. Debido a que los tratamientos del grupo C tuvieron los valores más altos, se concluyó que estos eran los más efectivos para esta variable. El mejor resultado se obtuvo con el medio 4, formulado con 1,0 mg/L de BAP y 0,3 mg/L de IAA.

Tabla 15. Prueba de Duncan para la variable apareamiento de nuevos brotes de acuerdo a la concentración de BAP e IAA

Medio	N	Subconjunto		
		1	2	3
M6	0,20	A		
M2	0,33	A	B	
M1	0,40	A	B	
M5	0,56	A	B	
M3	0,67		B	C
M4	0,93			C
Sig.		0,069	0,069	0,112

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,206.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

b. Alfa = 0,05.

3.2.3 Número de nuevos brotes

El promedio de nuevos brotes para cada medio formulado varió con respecto a la concentración de BAP donde se obtuvo 11,6 brotes nuevos al utilizar 0,5 mg/L de BAP mientras que al utilizar 1,0 mg/L se obtuvo 14,7 brotes nuevos.

En la figura 14 se evidencia que mientras menor es la concentración de BAP (0,5 mg/L) el número de nuevos brotes no varió mucho a medida que la concentración de IAA aumentó. Por otra parte, a mayor concentración de BAP (1,0 mg/L) el número de brotes disminuyó considerablemente mientras que la concentración de IAA aumentó. Con el tratamiento 4 suplementado con 1,0 mg/L de BAP y 0,3 mg/L de IAA se obtuvo 24 nuevos brotes en promedio en 15 plántulas, es decir el 93,33% de explantes reaccionó con la aparición de nuevos brotes como se esperaba. Estos resultados se asemejan a lo obtenido por Rozo (2014), que al utilizar 1,0 mg/L de BAP con 0,5 mg/L de IAA consiguió que el 70% de explantes formen nuevos brotes, siendo este el mejor tratamiento de un total de 20 combinaciones y variaciones de BAP, KIN, IAA y ANA.

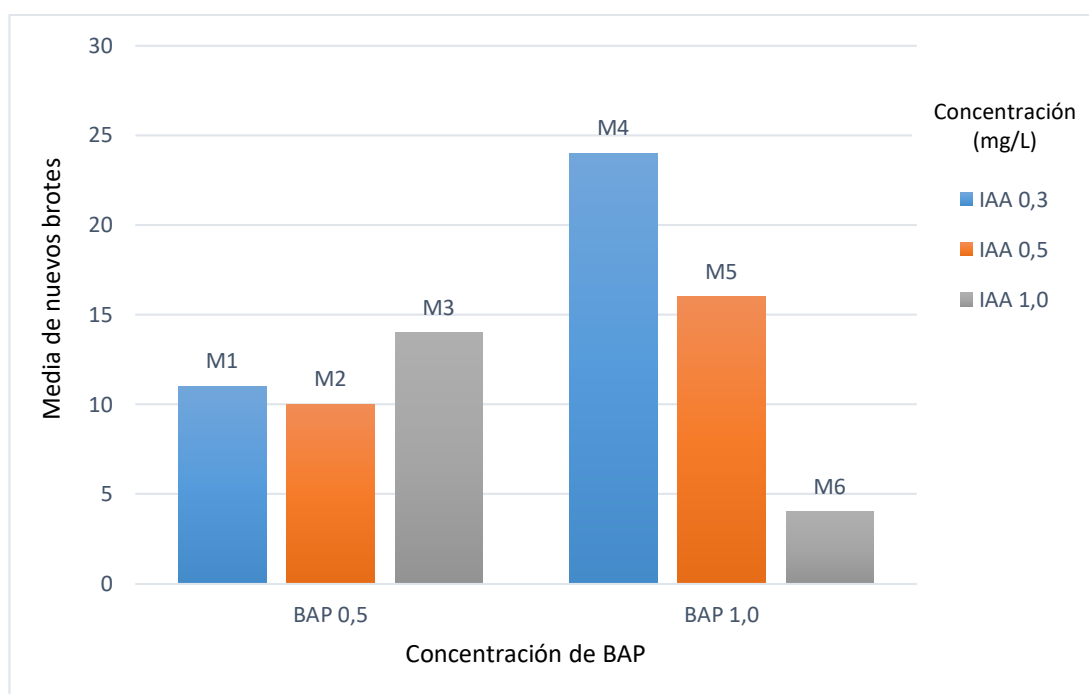


Figura 14. Media de nuevos brotes en relación a la concentración de BAP

Se realizó el análisis de varianza para la determinación de diferencias significativas detalladas en la Tabla 16, misma que se interpretó de la siguiente manera:

Al evaluar el factor concentración BAP y el factor concentración IAA por separado, se obtuvo valores de 0,8943 y 0,0552 respectivamente como valores críticos. Puesto que los valores son mayores a 0,05, ninguno de los

factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre número de nuevos brotes. Sin embargo, en la combinación de ambos factores (BAP * IAA) el valor crítico obtenido fue de 0,0001, esto indica que la interacción de estos factores representa una diferencia significativa y afecta directamente a la variable.

Tabla 16. Análisis de varianza con respecto a la variable número de nuevos brotes de acuerdo a la concentración de BAP e IAA

Variable dependiente: Número de nuevos brotes

Origen	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor crítico (α)
Modelo corregido	3,767 ^a	3	1,256	2,004	0,1190
Interceptación	69,344	1	69,344	110,665	0,0001
Concentración BAP	0,011	1	0,011	0,018	0,8943
Concentración IAA	3,756	2	1,878	2,997	0,0552
BAP * IAA	12,289	2	6,144	12,407	0,0001
Error	53,889	86	0,627		
Total	127,000	90			
Total corregido	57,656	89			

a. R al cuadrado = ,065 (R al cuadrado ajustada = ,033)

Una vez establecidas las significancias para esta variable, se realizó la prueba de Duncan (Tabla 17), donde se evidenció que el mejor resultado se obtuvo con el medio 4, al combinar con 1,0 mg/L de BAP y 0,3 mg/L de IAA obteniendo 1,6 nuevos brotes en promedio.

Tabla 17. Prueba de Duncan para la variable número de nuevos brotes de acuerdo a la concentración de BAP e IAA

Medio	N	Subconjunto		
		1	2	3
M6	0,27	A		
M2	0,67	A	B	
M1	0,73	A	B	
M3	0,93	A	B	
M5	1,06		B	C
M4	1,60			C
Sig.		0,060	0,060	0,123

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,495.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

b. Alfa = 0,05.

Se realizó un análisis de varianza entre los diferentes resultados obtenidos en cada variable con respecto a la concentración de BAP, IAA y su interacción (tabla 18), con esto se pudo constatar que sí existen diferencias

estadísticamente significativas para todos los factores; crecimiento longitudinal, aparición de nuevos brotes y número de nuevos brotes, es decir la interacción y combinación de estos reguladores de crecimiento tiene efectos significativos.

Tabla 18. Análisis de varianza para los resultados de crecimiento longitudinal, aparición y número de nuevos brotes con respecto a la concentración de BAP e IAA y su interacción.

Origen		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor crítico (α)
Modelo corregido	Crecimiento longitudinal	14,866 ^a	5	2,973	7,263	0,0000
	Aparición de nuevos brotes	5,156 ^b	5	1,031	4,997	0,0004
	Número de nuevos brotes	16,056 ^c	5	3,211	6,484	0,0003
Interceptación	Crecimiento longitudinal	566,507	1	566,507	1383,868	0,0000
	Aparición de nuevos brotes	23,511	1	23,511	113,938	0,0001
	Número de nuevos brotes	69,344	1	69,344	140,022	0,0001
BAP * IAA	Crecimiento longitudinal	9,242	2	4,621	11,288	0,0000
	Aparición de nuevos brotes	3,889	2	1,944	9,423	0,0002
	Número de nuevos brotes	12,289	2	6,144	12,407	0,0001
Error	Crecimiento longitudinal	34,387	84	0,409		
	Aparición de nuevos brotes	17,333	84	0,206		
	Número de nuevos brotes	41,601	84	0,495		
Total	Crecimiento longitudinal	615,760	90			
	Aparición de nuevos brotes	46	90			
	Número de nuevos brotes	127	90			
Total corregido	Crecimiento longitudinal	49,253	89			
	Aparición de nuevos brotes	22,489	89			
	Número de nuevos brotes	57,656	89			

a. R al cuadrado = ,302 (R al cuadrado ajustada = ,260)

b. R al cuadrado = ,229 (R al cuadrado ajustada = ,183)

c. R al cuadrado = ,278 (R al cuadrado ajustada = ,236)

El efecto que producen los reguladores de crecimiento al interactuar, ya sea al inducir el crecimiento de los explantes o al promover la formación de nuevos brotes, es denominado sinergismo (Orquera, 2013). Los ensayos con diferentes concentraciones de BAP e IAA fueron realizados con el propósito de determinar el sinergismo que influye en la multiplicación de *Lupinus microphyllus*.

De acuerdo a los resultados anteriormente obtenidos con respecto a las variables de aparición de nuevos brotes y al número de brotes, el medio 4 con 1,0 mg/L de BAP y 0,3 mg/L de IAA obtuvo los promedios más altos. Al aplicar dicha concentración la aparición de brotes se dio en 14 de 15 explantes utilizados para este tratamiento y se obtuvo 1,6 brotes nuevos por cada individuo. Este medio no fue el más efectivo para el crecimiento longitudinal; sin embargo, sí existió elongación en el tallo, de la cual se obtuvo plántulas de 2,4 cm en promedio al cabo de 20 días (Figura 15).

Debido a que el objetivo de la fase de multiplicación es obtener el mayor número de plantas posibles, y esto se logra a través del subcultivo de los nuevos brotes producidos, se puede concluir que el medio 4 resultó ser el más efectivo para esta etapa aun cuando con respecto a la variable crecimiento longitudinal no fue el mejor. Al tener mayor número de brotes estos pueden ser cortados y reintroducidos a un medio de cultivo suplementado con las mismas concentraciones de BAP e IAA y repetir este proceso sucesivamente hasta obtener el número de plantas deseadas.

Rozo (2014) obtuvo resultados similares al emplear de igual manera, 1 mg/L de BAP e IAA en mayor concentración (0,5 mg/L) con lo que consiguió entre 3 a 6 nuevos brotes por explante. Por otra parte la formación de callo puede estar relacionada directamente con la presencia y concentración de IAA ya que en el mismo estudio se advierte sobre la formación excesiva de callo cuando la concentración de esta auxina aumenta.

Para aumentar el número de individuos se realizó una segunda reproducción para la cual se tomó las plántulas de mayor tamaño y se realizó repiques. Estos segmentos fueron puestos en el medio que anteriormente dio resultados favorables (1,0 mg/l de BAP y 0,3 mg/L de IAA).



Figura 15. Plántulas de la primera reproducción luego de 20 días en medio de multiplicación.

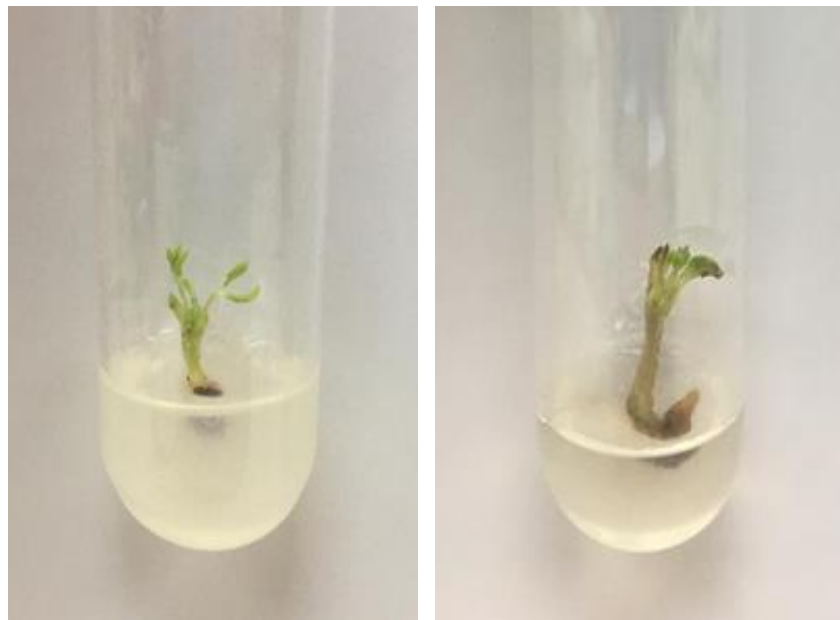


Figura 16. Plántulas de la segunda reproducción luego de 20 días en medio de multiplicación.

Luego de haber transcurrido 20 días desde el trasplante, se pudo notar que estos explantes no formaron callo excesivamente. Además se evidenció que el grosor del tronco se redujo levemente (Figura 16).

De estas plántulas de segunda generación, 15 no fueron utilizadas para el proceso de enraizamiento y fueron dejadas en este medio. Alrededor de 45 días desde su trasplante se pudo observar que el medio de cultivo se tornó oscuro y las plántulas presentaron necrosamiento con el paso de los días.

En gran parte de la literatura encontrada y previamente citada, se utiliza BAP en concentraciones mayores a 1,0 mg/L para los tratamientos más eficaces; sin embargo, en este estudio se pudo evidenciar que las plántulas en medios de cultivo con concentración de 1 mg/L presentaron necrosis al cabo de 45 días. Esto puede ser atribuido a que las plántulas naturalmente exudan metabolitos (Orquera, 2013) y a falta de un agente antioxidante que contrarreste estos efectos, los explantes mueren a medida que pasa el tiempo. Esta condición fue observada y reportada de igual forma por Villanueva, Avila, Mansilla, y Abades (2013) que obtuvieron necrosis utilizando 3 mg/L de BAP en su estudio con *Ahnfeltia plicata*.

3.3 FASE 4: ENRAIZAMIENTO

Una vez determinado el mejor método para la propagación vegetal, los explantes obtenidos en la fase anterior fueron cultivados en medios con diferentes concentraciones de IAA y 0,5 g/L de carbón activado para lograr su enraizamiento (Prasad & Palacios, 2019).

3.3.1 Aparición de raíces

Para la variable aparición de raíces solo el M2 obtuvo resultados favorables, logrando 60% de enraizamiento (Figura 17). De los medios restantes, en el M1 no se observó la formación de raíces y en el M3 se evidenció la muerte de los explantes al cabo de 10 días. El medio con 0,5 mg/L de IAA solo fue efectivo cuando se utilizó explantes más no plántulas trasplantadas. Estos resultados pueden ser apreciados en la tabla 19.

Tabla 19. Porcentaje de aparición de raíces de acuerdo a la concentración de IAA

	Concentración IAA mg/L	Tipo de material vegetal	Media de aparición de raíces
M1	0,2	Explante	0%
		Plántula	0%
M2	0,5	Explante	60%
		Plántula	0%
M3	1	Explante	0%
		Plántula	0%



Figura 17. Explantes enraizados después de 45 en medio de cultivo con 0,5 mg/L de IAA y 0,5 g/L de carbón activado.

El análisis de varianza fue realizado para corroborar que existen diferencias significativas entre las concentraciones de IAA, el material vegetal utilizado y con respecto a la interacción de estos dos factores ya que sus valores críticos fueron menores a 0,05, además de que únicamente al utilizar 0.5 mg/L de IAA se obtuvo los resultados deseados.

Tabla 20. Análisis de varianza con respecto a la variable aparición de raíces de acuerdo a la concentración de IAA y al material vegetal utilizado

Variable dependiente: Aparición de raíces

Origen	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor crítico (α)
Modelo corregido	3,000 ^a	5	0,600	13,500	0,000
Interceptación	0,600	1	0,600	13,500	0,001
Concentración IAA	0,600	1	0,600	13,500	0,001
Tipo material vegetal	1,200	2	0,600	13,500	0,000
IAA * Tipo	1,200	2	0,600	13,500	0,000
Error	2,400	54	0,044		
Total	6,000	60			
Total corregido	5,400	59			

a. R al cuadrado = ,556 (R al cuadrado ajustada = ,514)

En la tabla 21 se puede observar la prueba de Duncan donde el único resultado favorable con respecto a esta variable se encuentra en un subconjunto separado del resto de resultados negativos.

Tabla 21. Prueba de Duncan para la variable aparición de raíces brotes de acuerdo a la concentración de BAP e IAA

Medio	N	Subconjunto	
		1	2
M1	0	A	
M3	0	A	
M2	0,6		B
Sig.		1,00	1,00

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,044.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 20,000

b. Alfa = 0,05.

Al finalizar los ensayos en la etapa de enraizamiento, se pudo determinar que obviamente el mejor medio para la de formación de raíces de *Lupinus microphyllus* fue el que utilizó 0,5 mg/L de IAA junto con 0,5 g/L de carbón activado. Es importante mencionar que cuando se utilizó plántulas enteras provenientes de la fase de multiplicación, no se observó que se formen raíces; sin embargo, al utilizar explantes se logró enraizar el 60% de estos.

Cuando se utilizó explantes no tan desarrollados y fueron introducidos a un medio de enraizamiento, se evidenció que sus tallos no tuvieron el mismo grosor que el de las plántulas de las que fueron extraídas, debido a que los explantes crecieron en ausencia de BAP.

Jiménez, Fonseca, García, Infante y Vázquez (2019), al utilizar 0,5 mg/L de IAA obtuvieron el mayor número de raíces (3,9), no obstante, la aparición de estas fue la que más demoró con respecto a las otras concentraciones utilizadas. Orquera (2013) señala que para reducir la oxidación durante este proceso, el uso de IBA e IAA resulta más efectivo que ANA. Esto concuerda con Santa Cruz (2001), que obtuvo 7 plántulas de *Lupinus stipulatus* enraizadas con 0,2 mg/L de IAA.

Quintero, Polo, y Espitia (2003) realizaron pruebas con diferentes dosis de ANA que variaban entre 0 a 0,9 mg/L, de los cuales el mayor porcentaje de enraizamiento se dio al utilizar 0,9 mg/L de esta auxina; sin embargo, ANA también está relacionada con la formación de callo, por lo que recomiendan no utilizar concentraciones mayor a 0,5 mg/L.

Comparando estos resultados con los tratamientos testigo donde se obvió el uso de carbón activado, se evidenció que el medio de cultivo se oscureció al cabo de 5 días y el explante murió en menos de una semana.

Según Benavides y Córdova (2015), la combinación de auxinas y carbón activado es uno de los factores que más favorecen y estimulan el

enraizamiento de plantas *in vitro*. En su estudio con *Lupinus pubescens* obtuvo los mejores resultados al utilizar 1 ppm de ANA junto con 1 g/L de carbón activado, alcanzado presencia de raíces en un 64% de explantes utilizados. Orquera (2013) afirma que la presencia de carbón activado ayuda a absorber metabolitos producidos por las plantas previniendo su oxidación. Por el contrario, Peña (2009) señala que el carbón activado no representó diferencias significativas en la formación de raíces al combinarlo con IAA, además señala que en los tratamientos donde se dio esta interacción, el desarrollo radicular fue tardío.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

El tratamiento más efectivo para la desinfección de semillas de *Lupinus microphyllus* fue aquel que utilizó hipoclorito de sodio al 1,3 % v/v y tiempo de inmersión de 1 minuto, el cual resultó completamente eficaz ya que el 100% de los ensayos realizados. De la misma forma se concluyó que el realizar un tratamiento pregerminativo de escarificación previo a la inducción al medio de cultivo, aumenta el porcentaje de germinación al 100% en menor tiempo.

En la fase de multiplicación la mejor interacción entre BAP e IAA la presentó el M4 que empleó 1,0 mg/L de BAP y 0,3 mg/L de IAA. Este medio fue el adecuado para inducir la aparición de nuevos brotes, donde el 93,33% respondió como se esperaba, obteniendo en promedio 1,6 brotes nuevos por cada plántula y su media de crecimiento longitudinal fue de 2,4 cm.

Para el enraizamiento de plántulas de *Lupinus microphyllus* se utilizó un medio de cultivo con 0,5 mg/L de IAA y 0,5 g/L de carbón activado, de esta forma se logró enraizar el 60% de los explantes utilizados en esta fase. Además se concluyó que la presencia de carbón activado es un factor que influye durante el proceso de desarrollo radicular ya que evita la oxidación del medio de cultivo y previene la muerte del explante.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el desarrollo de las fases de desinfección, multiplicación y enraizamiento, se puede concluir que esta metodología es efectiva para el establecimiento de un protocolo de micropropagación *in vitro* de *Lupinus microphyllus* ya que permitió la obtención de un cultivo de plantas viables al término de esta investigación.

4.2. RECOMENDACIONES

- Experimentar con otras auxinas y citoquininas como ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 – D), ácido indolbutírico (IBA), kinetina (KIN) o tidiazuron (TDZ) para establecer otras posibles combinaciones que puedan resultar mejores para la inducción de brotes de *Lupinus microphyllus*.
- Evitar que las plántulas se mantengan en medio de multiplicación sin antioxidantes por un tiempo mayor a 30 días, ya que de no ser así, aumenta el porcentaje de necrosamiento a medida que pasa el tiempo.
- Durante todas las fases se pueden añadir agentes antioxidantes y antibióticos además del carbón activado, como son el polivinil piridona (PVP) o el ácido abscísico (ABA) para reducir el porcentaje de oxidación y contaminación tanto del medio como del explante.
- De igual manera con respecto al enraizamiento, se puede utilizar otras auxinas que permitan optimizar el desarrollo de raíces ya que es este estudio solo se obtuvo enraizamiento en el 60% de plántulas empleadas.
- Para la aclimatación de *Lupinus microphyllus* se recomienda utilizar como sustrato estéril suelo más turba en relación de 1:1 ya que la presencia de materia orgánica reduce el estrés asociado al traslado a ambientes *ex vitro* y favorece la supervivencia del cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, N., Torres, J., & Velasco, P. (2015). *Guía para la restauración ecológica en los páramos del Antisana*. Quito.
- Alcántara, J., Acero, J., Alcántara, J., & Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109–129.
- Anis, M., & Ahmad, N. (2016). *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1917-3>
- Ball, E. (1946). Development in Sterile Culture of Stem Tips and Subjacent Regions of *Tropaeolum Majus* L. And of *Lupinus Albus*. *Development in Sterile Culture of Stem Tips and Subjacent Regions of Tropaeolum Majus L. And of Lupinus Albus*, 33(5), 301–318. Recuperado de <http://www.jstor.org/stable/2437117>
- Bedoya, J., Sánchez, C., Bermudez, S., & Ramirez, S. (2016). Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo in vitro de *Aloysia tryphilla*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 38–46. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)38-46](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)38-46)
- Beltrán, K., Salgado, S., Cuesta, F., León, S., Romoleroux, K., & Ortiz, E. (2009). *Distribución espacial, sistemas ecológicos y caracterización florística de los páramos en el Ecuador*. Quito: EcoCiencia.
- Benavides, T., & Córdova, A. (2015). *Desarrollo de un protocolo de propagación in vitro de Geranium chilloense y Lupinus pubescens. Para la obtención de Plantas completas para la restauracion de quebradas de Quito*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Bogado, F., Vera Bravo, C., Ayala, P., Sansberro, P., & Luna, C. (2016). Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Grevillea robusta*, 11–16.
- Buytaert, W., Célleri, R., De Bièvre, B., Cisneros, F., Wyseure, G., Deckers, J., & Hofstede, R. (2006). Human impact on the hydrology of the Andean páramos. *Earth-Science Reviews*, 79(1–2), 53–72. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2006.06.002>
- Chamorro, A. H., Martínez, S. L., Fernandez, C., & Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Limonium*. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 47–53.
- Corona, A., Gómez, M., & Lindig, R. (2007). Efecto de la Escarificación y la Calidad de la Luz en la Germinación de *Lupinus elegans*, (9), 47–54.

- Daza, M. C., Hernández, F., & Triana, F. A. (2014). Efecto del Uso del Suelo en la Capacidad de Almacenamiento Hídrico en el Páramo de Sumapaz - Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 67(1), 7189–7200. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v67n1.42642>
- Dunn, D. (1955). Taxonomy of Lupinus, Group Micranthi (Leguminosae) of the Pacific Coast. *Aliso*, 3(2), 135–171. <https://doi.org/10.5642/aliso.19550302.05>
- FONAG. (2014). *Restauración Ecológica de los Páramos de Jatunhuaycu: Degradación, sistemas de referencia y estrategias de restauración*. Quito.
- FONAG. (2018). Justificaciones de la estación científica agua y páramos. *EMMAPS*.
- Garavito, L. (2015). Los páramos en Colombia, un ecosistema en riesgo. *INGENIEARE*, 127–136.
- Hofstede, R. (2001). El impacto de las actividades humanas sobre el páramo. En Los. En *Páramos del Ecuador. Particularidades y perspectivas*.
- Hofstede, R. (2008). Los servicios del ecosistema páramo: una visión desde la evaluación de ecosistemas del milenio. *Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN)*, 5–18.
- Hofstede, R., Coppus, R., Mena, P., Segarra, P., Wolf, J., & Sevink, J. (2002). El estado de conservación de los páramos de pajonal en el Ecuador. *Ecotropicos*, 15(1), 3–18.
- IBM. (2019). SPSS Statistics.
- Jiménez, A., Nuñez, P., & Gordon, H. (2017). Micropropagación de *Agave durangensis* gentry en un sistema de inmersión temporal (SIT). *Jóvenes en la ciencia*, 3(2), 11–16.
- Jiménez, L., Fonseca, M., García, A., Infante, S., & Vázquez, J. (2019). Effect of different concentrations of Indole acetic acid (IAA) in the in vitro rooting of *Dahlia* sp. *Cultivos Tropicales*, 40(1). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362019000100011&script=sci_arttext&lng=en
- Jordan, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento : Auxinas , Giberelinas y Citocininas. En *Fisiología Vegetal* (pp. 1–28). Chile: Ediciones Universidad de la Serena.
- Laguna, Y., Cueva, J., Tamariz, A., & Olivera, P. (2019). Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *senecio calvus* (asteraceae), planta medicinal altoandina, endémica del Perú. *Journal of High Andean Research*, 21(2), 111–121.

- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). Parte IV: Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. En S. Olmos, G. Luciani, & E. Galeano (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (pp. 351–376). Argentina.
- Llamas, F., & Acedo, C. (2016). Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia. *AmbioCiencias*, 14(5).
- Loberant, B., & Altman, A. (2010). Micropropagation of plants. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib442>
- Manotoa, S. (2012). *Escarificación mecánica y química como tratamientos pregerminativos en semillas de olivo (Olea europea)*. Universidad Técnica de Ambato. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Marañón, T. (2004). Banco de semillas. En J. de Andalucía (Ed.), *El monte Mediterraneo en Andalucía*. Andalucía.
- Merk KGaA. (2019). Murashige and Skoog Plant Cell Culture Media Formulations. Recuperado el 20 de octubre de 2019, de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/murashige-skoog.html>
- Missouri Botanical Garden. (2019). *Lupinus microphyllus*. Recuperado el 27 de noviembre de 2019, de [http://www.mobot.org/mobot/ParamoCajas/results.aspx?taxname=Lupinus microphyllus](http://www.mobot.org/mobot/ParamoCajas/results.aspx?taxname=Lupinus%20microphyllus)
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15(2), 473–497. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales del Instituto Nacional de Biodiversidad. (2015). *Plantas de los Páramos del Distrito Metropolitano De Quito, Ecuador. Publicación Patrimonio Natural del Ecuador* (Vol. 2). Quito.
- Novoa, J. (2017). *Análisis de la degradación de páramos debido a las actividades productivas en este ecosistema*. Universidad Militar Nueva Granada.
- Orquera, G. (2013). *Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de chuquiragua (Chuquiraga jussieu) a partir de yemas apicales y axilares*. Universidad de las Fuerzas Armadas.

- Peña, C. (2009). *Establecimiento y evaluación de protocolos de desinfección, introducción y multiplicación in vitro de piñón (jatrophaCurcas) a partir de semillas y yemas apicales obtenidas de plantas adultas con miras a una propagación masiva de plantas élite*. Escuela Politécnica del Ejército.
- Pniewski, T., Kapusta, J., & Legocki, A. (2002). In vitro micropropagation of four lupin species. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(4), 417–424. <https://doi.org/10.1007/s11738-002-0038-0>
- Podwojewski, P., & Poulenard, J. (2000). La degradación de los suelos de los páramos. *ResearchGate*.
- Prasad, N., & Palacios, A. (2019). Efecto de diferentes medios y sustratos en el enraizamiento y adaptación de rosa transgénica. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1). Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6756605>
- Proaño, A. (2011). *Regeneración y conservación mediante la técnica de crecimiento mínimo de Lupinus mutabilis (chocho andino) in vitro*. Escuela Politécnica Del Ejército.
- Quintero, I., Polo, J., & Espitia, A. (2003). Enraizamiento in vitro de Dioscoreas sp. In vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 51–56. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/575/1112>
- Quinteros, L. (2017). *Respuesta hídrica de suelos de páramo bajo diferentes niveles de degradación, estudio de caso a escala parcela*. Escuela Politécnica Nacional. <https://doi.org/10.1103/PhysRevX.7.041008>
- Ramírez, G., Rodríguez, J., Arreola, J., & Álvarez, J. (2015). Morphogenic responses of three explants of *Lupinus montanus* (H.B.K.) cultured in vitro. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 21(10), 17–27. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.07.022>
- Rojas, S., García, J., & Alarcón, M. (2013). *Propagación Asexual de Plantas. Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas*. (PRONATTA, Ed.) (Vol. 53). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Rozo, G. (2014). *Multiplicación clonal masiva in vitro de acacia mangium willd., como estrategia para la recuperación de suelos deprimidos*. Universidad de Tolima.
- Sánchez, C., & Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista UDO Agrícola*, 4(1), 21–26.

- Santa Cruz, E. (2001). *Distribución, abundancia y regeneración in vitro de Lupinus stipulatus J. Agardh (leguminosae) del nevado de Colima*. Universidad De Guadalajara Centro Universitario De Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
- Santa Cruz, E., Soltero, R., & Portillo, L. (2009). Propagación y regeneración in vitro de *Lupinus stipulatus*. *Laboratorio De Biotecnología Departamento De Botánica y Zoología Universidad De Guadalajara*, 5.
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. (Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, Ed.). Recuperado de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
- Soto, R. (2019). *Efecto de las diferentes dosis de citoquininas en la multiplicación in vitro en dos variedades de papas amargas solanum sp.* Universidad Nacional Santiago Antunez de Mayalo.
- UNNE. (2011). *Guía de Consultas Botánica II*. (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Ed.).
- Varela, S., & Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *INTA EEA*, 3(1), 1–10.
- Villacis, A. (2017). *Establecimiento de un protocolo para la obtención de callos in vitro a partir de cotiledones de chocho andino (Lupinus mutabilis)*. Universidad de la Américas.
- Villanueva, F., Avila, M., Mansilla, A., & Abades, J. (2013). Efecto de auxinas y citoquininas en el cultivo de tejido de *Ahnfeltia plicata* (Hudson) Fries, 1836 (Ahnfeltiales, Rhodophyta) de la región de Magallanes. *Anales Instituto Patagonia*, 41(1). Recuperado de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-686X2013000100009
- Zúñiga, F., Huertas, J., Guerrero, G., Dörner, J., Sarasty, J., & Burbano, H. (2018). Soil morphological properties related to Páramo ecosystems in Nariño, Southern Colombia. *Revista Terra Latinoamericana*, 36(2), 183. <https://doi.org/10.28940/terra.v36i2.363>

ANEXOS

ANEXO 1. AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA



MINISTERIO DEL AMBIENTE
DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE PICHINCHA



AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Nº 002 – 2019 - IC –FLO - DPAPCH - MA

Quito, 04 de febrero de 2019

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere el Código Orgánico Ambiental, autoriza a: Roberto Carlos Jaramillo, docente de la Universidad Tecnológica Equinoccial, con C.I. No. 1716239593, investigador ecuatoriano, para que lleve a cabo la investigación titulada "**Desarrollo de un protocolo de micropropagación *in vitro* de *Lupinus microphyllus*, como aporte a la restauración de suelos degradados en el páramo del Antisana**". De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de autorización de extracción e investigación de: Roberto Carlos Jaramillo, mediante oficio S/N, recibido el 29 de enero de 2019, entrega de información complementaria, recibido el 04 de febrero de 2019.
2. Valoración técnica del proyecto: Ing. Diego Morillo G.
3. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Dirección Provincial del Ambiente Pichincha, Unidad de Patrimonio Natural.
4. Complementos autorizados de la investigación: colección de flora silvestre, semillas de *Lupinus microphyllus* (50 vainas por 10 plantas en estudio).
5. Duración: desde 04 de febrero 2019, hasta 29 de febrero de 2020, de acuerdo al cronograma de trabajo establecido.
6. Obligaciones de los investigadores:
 1. ENTREGAR DOS COPIAS IMPRESAS (EN AMBAS CARAS) Y EN FORMATO DIGITAL, DE LOS RESULTADOS FINALES DE LA INVESTIGACION, EN CASTELLANO, INCLUYENDO LA LOCALIZACION EXACTA (COORDENADAS UTM) DE LOS ESPECIMENES COLECTADOS Y OBSERVADOS, COPIA DE LAS FOTOGRAFIAS, GRABACIONES Y OTROS DOCUMENTOS PRODUCTO DE LA MISMA, UNA A ESTA DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE Y OTRA A LA RESERVA ECOLOGICA ANTISANA.
 2. EL PLAZO DE ENTREGA DEL INFORME FINAL, VENGE EL 29 DE FEBRERO DE 2020.
 3. Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el párrafo anterior se responsabiliza a: Roberto Carlos Jaramillo, (C.I: 1716239593), Josselyn Mera (C.I: 1724152119), investigadores de nacionalidad ecuatoriana.

Atentamente,


Mgs. Janetina Mina Arroyo

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE PICHINCHA
DIRECTORA PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE PICHINCHA



MINISTERIO DEL AMBIENTE



OBSERVACIONES SOBRE AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA N° 002 – 2019 -IC – FAU – DPAPCH - MA

- Se autoriza la investigación en la provincia de Pichincha, en el Distrito Metropolitano de Quito, parroquia Pintag, en la Reserva Ecológica Antisana.
- En caso de ingreso a un área protegida se deberá coordinar previamente el ingreso con el Jefe de área correspondiente.
- El equipo de investigadores principales está conformado por: Roberto Carlos Jaramillo, Josselyn Mera.
- En caso de involucrarse propiedades particulares, el investigador deberá obtener el permiso correspondiente de los propietarios.
- Los resultados de la investigación deberán ser entregados al Ministerio del Ambiente, conforme al Art. Del 5 al 19 del Libro IV, Título II del TULSMA (Texto Unificado de Legislación Secundaria del Medio Ambiente), así como también el registro de la localización exacta de las muestras colectadas, fotografías, informe parcial y/o final y todos los productos resultado de la investigación, tanto en formato físico como digital.
- Se autoriza la colección de flora silvestre, semillas de *Lupinus microphyllus* (50 vainas por 10 plantas en estudio), con el objetivo de establecer un protocolo de obtención de plantas *in vitro* a partir de semillas de "chocho silvestre".
- Para la movilización de todas las muestras colectadas, mediante esta autorización, los investigadores deberán contar con las respectivas órdenes de movilización, emitidas por la Dirección Provincial del Ambiente de Pichincha.
- Se autoriza el uso de los equipos y materiales siguientes: podadoras, fundas plásticas.
- Ningún espécimen o muestra, producto de esta investigación podrá ser utilizado para uso comercial o como material para manejo *in situ* / *ex situ*.
- Las muestras colectadas no podrán ser utilizados para cualquier actividad de bioprospección y biopiratería.
- Las muestras colectadas de los especímenes, no podrán ser utilizados para el acceso a recursos genéticos.
- En caso de prórroga, se solicitará quince días antes de la fecha de vencimiento que indica este documento.
- En caso de que la investigación produzca informes parciales, estos deberán estar contemplados en el informe final tanto en formato impreso como digital.

TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE LOS ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME AL CÓDIGO ORGÁNICO AMBIENTAL; Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN SECUNDARIA DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.

La tasa por concepto de emisión de autorización es de: USD\$ 20 (veinte dólares), depositada en la cuenta 0010000785 del BanEcuador, factura No. 001-002-64777.

JMJV/DM
04/02/2019

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ANA	Ácido Naftalenacético
BAP	6-Bencilaminopurina
IAA	Ácido indol-3-acético
IBA	Ácido indol-3-butírico
KIN	Kinetina
MS	Murashigue y Skoog
NaClO	Hipoclorito de sodio
TDZ	Tidiazurón
2,4 - D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético