

I. INTRODUCCIÓN

El cedro (*Cedrela odorata* L.), pertenece a la familia de las Meliaceae es originario de Centroamérica, desde México, hasta el norte de Suramérica es una especie de los bosques semicaducifolios (mesolíticos), aunque también se halla en los bosques higrofiticos. En algunos sitios el cedro forma “gregas”, pero en otros son árboles aislados dispersos en el bosque natural (Betancourt Barroso, 1983).

El cedro sirve como indicador natural para saber cuál es el grado de perturbación de los bosques tropicales, también sirven de refugios para ciertas especies faunísticas. Las semillas son el alimento principal de un gran número de roedores y aves. Estas especies forestales de grandes dimensiones brindan sombra para que otras puedan desarrollarse. (Little & Dixon ,1969).

En Ecuador, no existen programas destinados a la conservación y mejora de esta especie, resultando necesario realizar investigaciones orientadas a resolver los problemas citados anteriormente; estableciéndose bases sólidas que permitan estructurar un programa integral de rescate, conservación y mejora del cedro y así contribuir al desarrollo ecológico, económico y ambiental del sector forestal de nuestro país.

Al respecto, la FAO (1999) ha indicado la necesidad de mantener el recurso genético de cedro, de igual manera su conservación ha sido definida como de alta prioridad. Con el empleo de técnicas biotecnológicas contribuiremos al rescate, conservación y mejora del cedro mediante la propagación asexual de esta especie, debido que en el Ecuador el cedro se propaga por los métodos tradicionales conocidos por vía sexual (semillas) o regeneración natural.

Para así en un futuro obtener árboles plus con un alto potencial genético que servirán para mitigar distintos problemas como la falta de huertos semilleros, ya que en

nuestro país la disponibilidad de semillas de cedro con algún grado de mejora genética obtenida en áreas productoras de semillas o de huertos semilleros es nula.

A. Justificación

El alto costo comercial del cedro, ha impulsado a taladores ilegales, a ingresar en zonas forestales naturales. La extracción es prohibida en poblaciones reducidas de estas especies, al encontrarlas son depredadas en su totalidad. De continuar la situación actual se estima que dentro de pocos años el cedro estará totalmente en extinción. En el Ecuador, la propagación del cedro, se realiza por vía sexual (semillas), cuyo origen es desconocido. Estas plantas de las cuales se escogen las semillas no son seleccionadas por sus características fenotípicas y genotípicas. Por tal razón, la mayoría de las plantaciones presentan alta heterogeneidad.

La presente investigación pretende desarrollar un protocolo idóneo para la multiplicación asexual del cedro produciendo plantas genéticamente similares a las seleccionadas fenotípicamente, contribuyendo de esta manera a la conservación de esta especie.

B. Objetivos

- **General**

Establecer la metodología para la multiplicación *in vitro* vía organogénesis directa del cedro (*Cedrela odorata* L.)

- **Específicos**

- Determinar el mejor protocolo de desinfección de explantes de cedro para su establecimiento *in vitro*.

- Determinar la mejor concentración de BAP para la proliferación de brotes *in vitro* de cedro.
- Establecer la mejor concentración de ANA y AIB en el enraizamiento *in vitro* de brotes.

C. Hipótesis

- En la desinfección de los explantes de cedro (*Cedrela odorata* L.) la concentración de Bicloruro de Mercurio al 0.25% a 8 minutos de inmersión + 10 mg L⁻¹ de Gentamicina se obtendrá el mayor número de explantes vivos.
- Con la concentración hormonal de la citoquininas BAP de 0,50 mg L⁻¹ favorecerá la proliferación de brotes del Cedro (*Cedrela odorata* L.) en condiciones *in vitro*.
- Las concentración hormonales de Auxinas 1 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ ANA favorecerá la proliferación de raíces en condiciones *in vitro* del Cedro.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. Origen y distribución de *Cedrela odorata* L.

El cedro (*Cedrela odorata* L) pertenece a la familia meliaceae. Su principal sinónimo es *Cedrela mexicana* M. J. Roem. Actualmente se admite que el cedro de Cuba y las demás Antillas no es *C. mexicana*, como se creía hasta hace poco tiempo, sino *C. odorata*.

Ateniéndonos al Index Kewensis hasta 1950, tenemos reconocidas 66 especies en total, de las cuales 3 como especies dudosas, con la siguiente distribución: 49 en América tropical y subtropical (con 2 de las 3 especies dudosas mencionadas arriba), 1 en África tropical *Cedrela kotshyi* Schweinf. 14 en Asia, 1 sin distribución dada *Cedrela amara* Goebel y 1 en Asia y Australia *Cedrela toona*. Aparecen además, en el Index 10, especies de *Toona*, de las cuales solamente 3 son especies no descritas primeramente al género *Cedrela*.

Según Lamb (1969) expone que el género *Cedrela* fue establecido por Browne en 1756, para el árbol *Cedrela odorata* encontrado en Jamaica, descrito y publicado por Linnaeus (Linneo) en 1759 (Syst. Nat, ed. 10:490). Desde entonces 69 especies han sido asignadas a este género por los botánicos. Estos incluyen árboles que crecen en las Américas, India, parte suroriental de Asia y Australia (Bascopé y otros, 1957), pero las bases de la diferenciación de estas especies no fueron satisfactorias ni dignas de confianza, con el resultado de la última revisión del género, las especies asiáticas y de Australia fueron separadas y colocadas en el género *Toona*; las especies americanas se redujeron a nueve (Smith, 1960).

Las especies de *Cedrela* están ampliamente distribuidas en América; forman parte de la flora autóctona de todos los países latinoamericanos; desde México hasta Argentina (con excepción de Chile) y también de la flora de las Antillas. El límite septentrional del área de distribución de este género está situado,

aproximadamente, en los 24° N, en México; y el meridional, en los 27° S, en la provincia de Misiones, Argentina (Lamb ,1969).

Lamb (1969), afirma que todas las procedencias de las Antillas pertenecen a la especie *C. odorata*, también se encuentra en México; desde el sur de Tampico hasta la Península de Yucatán inclusive, en la vertiente del Golfo; y desde Sinaloa hasta Guerrero, en la del Pacífico (Pennington y Sarukhan ,1968).

Es probable que esta especie también forme parte de la flora de América Central y del norte de América del sur, pero no se tiene información fidedigna acerca de esta posibilidad.

B. Descripción dendrológica de *Cedrela odorata* L.

Los cedros son árboles de tamaño mediano a grande. Normalmente, tiene entre 15 y 20 m de altura y de 40 a 60 cm de diámetro a la altura de pecho (DAP); pero, en casos excepcionales, se encuentran ejemplares que alcanzan hasta 40m, de altura y unos 2 m de diámetro. Se describe a *Cedrela odorata* como un árbol grande decíduo que varía mucho en tamaño de acuerdo con las condiciones ambientales, desde un máximo de 30 m en el bosque decíduo subtropical, hasta 4 m o más en el bosque tropical caducifolio y 50 m en condiciones óptimas de los bosques higrofiticos de tierras bajas. Este investigador dice que en estos árboles majestuosos la circunferencia encima de los contrafuertes de los árboles maduros, varía desde 3 m en los sitios secos hasta 10 m (3,1 m de D.A.P.) en los gigantes que se localizan en el bosque higrofitico tropical (Lamb, 1969).

El fuste es recto y bastante cilíndrico. A más de la mitad de la altura del árbol se forma la copa de ramas ascendentes y gruesas, en forma de cúpula. El sistema radical es amplio y generalmente superficial, salvo en los suelos profundos areno-arcillosos La corteza es de color gris claro en los árboles jóvenes y ligeramente dividida en placas por leves fisuras; en los ejemplares maduros, se agrieta y las hendiduras van aumentando con la edad del árbol; la corteza de las

ramitas es de coloración pardusca y presenta puntos ligeramente levantados, (lenticelas). La corteza interior es de color rosado a castaño claro, fibroso y amargo. Los árboles de gran tamaño tienen contrafuertes en la base del tronco (Lamb, 1969).

C. Características botánicas de *Cedrela odorata* L.

- **Hojas**

Hojas compuestas dispuestas en espiral, paripinnadas (en algunos casos imparipinnadas) alternas, agrupadas en los extremos de las ramitas; miden entre 20 cm. y 70 cm de largo. Raquis redondo, de color castaño verdoso, a lo largo del cual se encuentran entre 5 y 15 pares de folíolos. Los folíolos son, comúnmente opuestos, algunos de ellos alternos o subopuestos, oblicuamente, lanceolados u oblongos, asimétricos, acuminados hacia el ápice, agudos o algo redondeados hacia la base, de borde liso, glabros; verde oscuros y ligeramente lustrosos en el haz, verde amarillentos o verde pálidos y algo tomentosos en el envés; el nervio central relativamente prominente en ambas caras.

Pecíolo de 0,5 cm a 1,2 cm de largo, pubescentes o glabros. Los folíolos miden Entre 5 cm y 15 cm de largo y de 2,5 a 5cm de ancho. Son muy variables en tamaño, según la edad de los árboles, el medio en que éstos se desarrollan y la procedencia. El follaje, normalmente de color verde claro se torna amarillento antes de su caída en el invierno (Betancourt, 1983).

- **Flores**

Son flores perfectas, en panículas terminales o subterminales. Inflorescencia de 2 a 3,5 dm de altura, sus ramas poco densamente floridas, lampiñas o un tanto puberulentas. Pedicelos de 1 a 2 mm de largo, comúnmente articulados por encima del medio. Cáliz pequeño 4 o 5-lobado, delgado, escasamente

puberulento, sus lóbulos agudos. Pétalos 4 o 5, erectos imbricados, aquillados hasta el medio o debajo sobre el raquis de la cara interna, la quilla adherente al disco a través del surco; delgados, oblongos, de 5 a 6 mm de longitud y de 1,5 a 2 mm de ancho, agudos u obtusos, aterciopelados-puberulentos con pelos grisáceos sedosos y aproximados; disco grueso o elevado columnar, 4-6-lobado. Estambres de 4 a 6; filamentos libres, lampiños, insertos encima del borde del disco, a veces alternando con estaminodios, aleznados; anteras, versátiles. Ovario 5-ocular, sésil en el ápice del disco, gradualmente adelgazándose hacia el delgado estilo, éste filiforme, estigma discoideo, a menudo 5-lobado; óvulos péndulos, biselados, de 8 a 12 en cada celda (Roig, 1974).

- **Frutos**

Frutos, cápsulas leñosas elíptico-oblongas, de 2,5 a 5 cm de largo y unos 2 cm de diámetro; con 5 lóculos, a veces 4 lóculos, con dehiscencia septicida apical; valvas con 2 capas, que se separan de un eje persistente con 5 costillas, en algunas cápsulas 4 costillas. En la madurez las cápsulas adquieren color marrón chocolate (Betancourt, 1983).

- **Semillas**

Semillas samaroides, oblongas o elíptico-oblongas, de 1,2 a 3cm de largo y entre 5 y 8 mm de ancho, con la parte seminal hacia el ápice del fruto. Cada cápsula puede contener entre 25 y 40 semillas fértiles. Una cantidad de semillas que puede variar de 45 000 a 60 000, pesan 1 kg. Varios análisis realizados en el Centro de Investigación Forestal han arrojado, como promedio, 54 055 semillas/kg.

D. Métodos de propagación tradicional

Los métodos tradicionales de propagación de plantas de cedro son el sexual (semillas) y el de regeneración natural.

La producción de semillas de cedro es anual y abundante. Estas son ampliamente dispersadas por el viento, sin embargo, el repoblado natural es escaso. En el bosque alto, la reproducción natural por lo general, se limita a sitios próximos a árboles semilleros donde, por alguna razón, existía algún claro en la cubierta foliar de copas, en los bosques de segundo crecimiento con un dosel ralo, o bien en campos que fueron dedicados a cultivos agrícolas y, posteriormente abandonados, se observa mayor cantidad de brinzales que en los bosques altos (Betancourt, 1983).

Según (Lamb,1969) informa que en Honduras Británica (Belice), después de un incendio forestal rastrero se produjo una magnífica regeneración de cedro y caoba al ser diseminada la semilla de árboles de estas especies que sobrevivieron al incendio. Opina que esta magnífica regeneración se debió a las condiciones de buena luminosidad existente, la reducción de la competencia radical y el número de elementos nutritivos disponibles especialmente el potasio a causa de la quema de la hojarasca. En Cuba, también se ha observado buena regeneración natural en lugares donde se ha talado el monte y, posteriormente, se han quemado los residuos.

Con anticipación a la época de la cosecha, se deben visitar los árboles porta granos para determinar el estado de madurez de los frutos. Para comprobar si las cápsulas están maduras, se abren algunas y se observa el color de las semillas; éstas deben tener un color carmelita claro. Los frutos se recogen a mano sobre los árboles, se tumban de ellos con garabatos u otros, implementos adecuados, o bien se sacuden las ramas para que caigan y recogerlos en el suelo. (Betancourt, 1983).

Para facilitar la dehiscencia de las cápsulas, se colocan al sol no muy intenso durante 2 o 3 días en capas de poco espesor, sobre mantas de lona o de arpillera, o bien en cajas de madera de base amplia y poca altura. Después que se abren las cápsulas, se procede a separar las semillas de las impurezas, utilizando un tamiz apropiado. Finalmente, avientan las semillas, a fin de eliminar la paja de las simientes que no lograron desarrollarse (Betancourt, 1983).

Cuando las semillas están bien secas, se envasan en vasijas, de cierre hermético y se almacenan en cámaras de refrigeración, a temperatura de 3 a 5 °C. En Puerto Rico, han llegado a la conclusión de que para un almacenamiento efectivo de las semillas de cedro, es necesaria la refrigeración para períodos en exceso de 2 meses y que a temperaturas bajas se pueden almacenar, convenientemente, durante 8 meses; aunque se obtiene alguna germinación con semillas de hasta 2 años.

Hueck y Lam Precht, (1959). Afirman que por almacenamiento en frío (4 °C, aproximadamente) se logra conservar la germinación de la semilla durante varios años. En Cuba, se ha logrado hasta 65 % de germinación con semillas almacenadas en frío durante 14 meses antes de efectuar el almacenamiento, es recomendable tratar las semillas con DDT y sulfato de cobre, con otros pesticidas apropiados, con objeto de evitar daños de plagas y enfermedades.

E. Mejoramiento genético

En Venezuela se han realizado investigaciones sobre la multiplicación agámica de *C. odorata*, mediante injertos y estacas, y aseveran que han dado mejores resultados los injertos de hendidura que los del sistema inglés y los homoplásticos (púa de cedro en patrón de cedro) que los heteroplásticos (púa de cedro en patrón de caoba). Se observó que los patrones deben tener, por lo menos, 1, cm de diámetro (Quijada y Gutiérrez, 1971).

En Cuba, la Sección de Investigaciones Forestales del INDAF inició en 1967, los trabajos de mejoramiento genético de *C. odorata*, mediante la selección basal. Al efecto se seleccionaron 6 rodales semilleros con buenas características fenotípicas. Posteriormente, la Sección de Genética del Centro de Investigación Forestal (CIF) continuó los estudios genéticos. En 1980, se contaba con 19 ha de rodales semilleros. Se habían seleccionado 220 árboles plus y se estaban estudiando 13 procedencias, a la vez que se contaba con 15 ha de ensayos de progenie. Para multiplicar los árboles de cedro, se han usado los injertos de púa lateral en patrón decapitado y en patrón sin de capitar. Se han injertado las púas de cedro en patrón de la misma especie, obteniéndose más de 80 % de prendimiento (Quijada y Gutiérrez, 1971).

F. Propagación clonal *in vitro* vía organogénesis

Jiménez, (1998), manifiesta que los orígenes del cultivo *in vitro* se remontan a los años 1902, con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células, aisladas de plantas, quién postuló el principio de totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro*.

Jiménez, (1998), señala que dentro de los métodos más utilizados en la regeneración de plantas se encuentran la organogénesis y la embriogénesis, la organogénesis es un evento morfogénético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de esta, en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno.

Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordio de raíces y el subsecuente enraizamiento final.

Hu y Wang, (1983), mencionan que esta técnica se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de la hoja, las cuales son divididas y subcultivadas repetidamente.

Este método no es rápido, pero da lugar a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Localización del proyecto

La presente investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicado en los predios centrales a 1.5 Km vía Quevedo - Santo Domingo de los Colorados. La recolección del material vegetativo se realizó en el invernadero de la UTEQ.

B. Características del área experimental

Las características ecológicas y meteorológicas de la zona de estudio son:

Temperatura.....	25 °C
Humedad relativa.....	81 a 85%
Precipitación media anual.....	1253mm
Altitud.....	73 msnm
Heliofanía.....	640 horas luz
Zona ecológica	bh-T
Topografía.....	Irregular

Fuente: Tesis de grado de ingeniería forestal Cruz, 2001.

C. Materiales y Reactivos

- **Materiales de laboratorio**

- Pinza
- Bisturí
- Frascos
- Tijeras
- Cajas petri
- Vasos de precipitación
- Pipetas
- Tubos de ensayo

- Balanzas
- Cámara de flujo laminar
- Peachímetro
- Agitador de calentador magnético
- Autoclave
- Guantes
- Mascarilla
- Mechero

- **Reactivos:**

- Tween 80
- Hipoclorito de sodio
- Fungicida (carbenpac)
- Bencilaminopurina (BAP)
- Ácido Naftaleno Acético (ANA)
- Ácido Indolbutírico (AIB)
- Macronutrientes
- Micronutrientes
- Fuentes de Hierro
- Vitaminas
- L- cysterina
- Hidróxido de Sodio
- Ácido Clorhídrico
- Agar
- Gentamicina
- Bicloruro de mercurio
- Alcohol absoluto
- Phytigel
- Vitrofurial

- **Material experimental (vegetativo)**

Como material experimental se utilizó *Cedrela Odorata* L.

-Yemas terminales

D. Metodología

Las plantas de cedro (*Cedrela odorata* L.) que fueron seleccionadas por sus características fenológicas, eran fumigadas en un periodo de cada 8 días con una concentración de 1ml L^{-1} de carbenpac, antes de realizar la extracción de las yemas terminales se esperaba 3 días por la aplicación del fungicida.

Los materiales del Laboratorio empleado en la propagación in vitro de cedro fue esterilizado en una autoclave All American a 121°C por 15 minutos y el agua destilada a 121°C por 20 minutos. La inoculación y las transferencias de las yemas axilares del cedro se realizó en la cámara de flujo laminar, la misma que fue desinfectada con alcohol al 70% y con luz ultravioleta durante 15 minutos. El medio de cultivo usado fue MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual fue esterilizado con vitrofural a 0.116 mg L^{-1} dejando en la zona de almacenamiento en forma hermética durante 48 horas para luego ser utilizado en sus distintas fases. El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.7, antes de la esterilización.

Como explantes, se utilizaron yemas terminales jóvenes entre 14 y 21 días de edad provenientes de plántulas de 3 a 6 meses de edad previamente seleccionados de árboles de Cedro por sus características fenológicas. Se utilizaron tres frascos con 100cc de agua destilada cada uno, en el primero se colocó las yemas que fueron cortadas en el invernadero para evitar deshidratación, las mismas fueron pasadas al segundo frasco con 100cc agua destilada, dos gotas de tween 80, más el hipoclorito de calcio o Biclورو de mercurio, dependiendo del tratamiento.

Se realizó tres enjuagues con agua esterilizada, posteriormente en el tercer frasco que contenía gentamicina a diferentes concentraciones (0 mg y 10 mg), se colocaron los explantes durante 10 minutos, esta última desinfección se realizó

dentro de la cámara de flujo laminar para que haya menor contaminación, luego de este paso, se procedió a dejar sobre una caja petri para eliminar el exceso de agua, luego se eliminó con el bisturí 0.1cm las partes terminales y basales de las yemas, finalmente fueron colocadas en el medio de cultivo respectivo, durante 21 días.

El crecimiento de brotes y plantas obtenidas de yemas terminales de cedro tuvo lugar en el cuarto crecimiento con lámparas fluorescentes de 20 y 40 vatios, y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

Para el procesamiento estadístico se empleó el análisis de ADEVA, la prueba de Tukey mediante el paquete estadístico MSTATC.

E. Fases de la investigación

La investigación se realizó en tres fases experimentales:

- 1.- Fase de establecimiento
- 2.- Fase de multiplicación
- 3.- Fase de enraizamiento

1. Fase de establecimiento

Se efectuaron dos tipos de experimentos para medir el nivel de eficacia en la desinfección de los explantes:

En el primer experimento se usaron diferentes dosificaciones de hipoclorito de calcio en 100 cc de agua destilada + 2 gotas de tween en inmersión durante 20 min, seguido de tres enjuagues del material vegetal con agua esterilizada.

Posteriormente fueron sumergidos en diferentes concentraciones de gentamicina durante 10 minutos en la cámara de flujo laminar con el fin de

reducir la contaminación para finalmente ser sembrados en tubos de ensayo con un medio de cultivo simple (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Factores y niveles utilizados en el experimento 1 durante la fase de establecimiento.

Factor		Niveles
A	Hipoclorito de calcio	2,0 g de hipoclorito de calcio
		2,5 g hipoclorito de calcio
B	Gentamicina	0 mg de gentamicina
		10 mg de gentamicina

Cuadro 2. Combinaciones y tratamientos utilizados del experimento 1 durante la fase de establecimiento.

Tratamientos	Combinación Factor (axb)	Tratamientos
1	a1b1	2 g hipoclorito de calcio por 20 minutos + 0 mg de gentamicina por 10 minutos
2	a1b2	2 g hipoclorito de calcio por 20 minutos + 10 mg de gentamicina por 10 minutos
3	a2b1	2,5 g hipoclorito de calcio por 20 minutos + 0 mg de gentamicina por 10 minutos
4	a2b2	2,5 g hipoclorito de calcio por 20 minutos + 10 mg de gentamicina por 10 minutos

En el segundo experimento se usó una concentración de bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) al 0,25% en 100 cc de agua destilada + 2 gotas de tween en inmersión durante diferentes tiempos, seguido de tres enjuagues del material vegetal con agua esterilizada. Posteriormente los explantes fueron sometidos en combinación con dos concentraciones de gentamicina en 100 cc agua destilada durante 10 min en la cámara de flujo laminar con el fin de reducir la contaminación. Finalmente fueron sembrados en tubos de ensayo con un medio de cultivo simple. (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Factores y niveles utilizados en el experimento 2 durante la fase de establecimiento.

Factor		Niveles
A	Bicloruro de mercurio	8 minutos
		15 minutos
B	Gentamicina	0 mg de gentamicina
		10 mg de gentamicina

Cuadro 4. Combinaciones y tratamientos utilizados del experimento 2 durante la fase de establecimiento.

Tratamientos	Combinación Factor (axb)	Tratamientos
1	a1b1	Bicloruro de mercurio + 2 gotas de tween en 100 cc de agua destilada tiempo de exposición 8 min.+ 0 mg de gentamicina en 100 cc de agua destilada por 10 min
2	a1b2	Bicloruro de mercurio + 2 gotas de tween en 100 cc de agua destilada tiempo de exposición 8 min.+ 10 mg de gentamicina en 100 cc de agua destilada por 10 min
3	a2b1	Bicloruro de mercurio + 2 gotas de tween en 100 cc de agua destilada tiempo de exposición 15 min.+ 0 mg de gentamicina en 100 cc de agua destilada por 10 min
4	a2b2	Bicloruro de mercurio + 2 gotas de tween en 100 cc de agua destilada tiempo de exposición 15 min.+ 10 mg de gentamicina en 100 cc de agua destilada por 10 min

En la fase de establecimiento se realizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x2 con 4 repeticiones y 5 observaciones por unidad experimental completando un total de 80 unidades experimentales. La obtención del análisis de varianza y separación de medias al 95% de probabilidad se realizó mediante el programa estadístico MSTATC.

a) Análisis de Varianza

Cuadro 5. Esquema del análisis de varianza de la fase de establecimiento

Fuente de variación	Grados de libertad	
Factor a	a-1	1
Factor b	b-1	1
Interacción ab	(a-1) (b-1)	1
Error	(ab) (r-1)	12
Total	rt - 1	15

Para establecer diferencias estadísticas entre tratamientos se utilizó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey ($P \geq 0,05$). Los datos con valores cero fueron transformados con la siguiente fórmula: $\sqrt{x+0,5}$

b) Mediciones experimentales y métodos de evaluación

1) Explantes contaminados

La evaluación de los explantes contaminados se realizó mediante la observación directa a los 21 días después de haberse sembrado en un medio de cultivo simple.

2) Explantes cloróticos

Esta variable se evaluó mediante la observación visual de aquellos explantes que tomaron una coloración blanquinosa a los 21 días de establecido el ensayo.

3) Explantes vivos

Se la determinó en porcentaje mediante una regla de tres simple. Esta variable se la evaluó a los 21 días después de establecido el explante en el medio.

2. Fase de multiplicación

El objetivo de esta fase fue evaluar la mejor concentración de citoquininas a emplearse en la multiplicación. Para lo cual se tomaron vitroplantas de 1 a 2 cm de tamaño provenientes de la fase de establecimiento con una edad de tres a cuatro semanas los que fueron transferidos a un medio de cultivo con cuatro diferentes dosis de hormona de crecimiento Bencilaminopurina (BAP) en tubos de ensayo durante 30 días a una temperatura entre 23-25°C.

Para esta fase se utilizó el medio propuesto por Murashige & Skoog (1962), con los nitratos al 50% de la concentración de las sales más 20 g sacarosa, 7 g L⁻¹ agar, vitrofural 0.116 g L⁻¹ y el pH 5,7 antes de su solidificación.

Cuadro 6. Concentración hormonal de los tratamientos aplicados en la fase de multiplicación

Tratamientos	Concentración hormonal
1	0,25 mg L ⁻¹ BAP
2	0,50 mg L ⁻¹ BAP
3	0,75 mg L ⁻¹ BAP
4	1 mg L ⁻¹ BAP

En la fase de multiplicación se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones y cinco observaciones por unidad experimental. La obtención del análisis de varianza y separación de medias al 95% de probabilidad se realizó mediante el programa estadístico MSTATC.

c) Análisis de Varianza

Cuadro 7. Esquema del análisis de varianza de la fase de multiplicación

Fuente de variación	Grados de libertad	
Tratamientos	t-1	3
Error	t(r-1)	12
Total	rt - 1	15

Para establecer diferencias estadísticas entre tratamientos se utilizó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey ($P \geq 0,05$). Los datos con valores cero fueron transformados con la siguiente fórmula: $\sqrt{x+0,5}$

d) Mediciones experimentales y métodos de evaluación

1) Explantes Contaminados

Esta variable se evaluó a los 30 días establecidos los explantes en el medio de multiplicación, mediante observación directa, tomando en cuenta aquellos contaminados por hongos y bacterias.

2) Explantes cloróticos

Se evaluaron los brotes que adquirieron un coloración blanquinosa, a los 30 días de haber sido establecido el experimento.

3) Vigor

Una vez que han permanecido los brotes durante un mes en su medio se evaluó el vigor de cada una de ellas mediante la siguiente tabla:

Cuadro 8. Niveles y escala del vigor de los explantes de cedro.

Niveles	Escala
1	Muy bueno
2	Bueno
3	Regular
4	Muerto

4) Números de brotes por explante

El registro del número de brotes por explante, se lo realizó a los treinta días, cuantificando la cantidad de brotes por cada vitroplanta después de haber permanecido en el medio de multiplicación.

5) Longitud de los brotes

Se utilizó una regla graduada en centímetros con aproximaciones al milímetro para medir la longitud de los brotes, este fue evaluado a los treinta días del experimento.

6) Explantes vivos

Se determinó a los treinta días después de haber sido transferido los brotes en el medio de multiplicación, el porcentaje de sobrevivencia se lo realizó mediante una regla de tres simple.

3. Fase de enraizamiento

Después de haber permanecido 30 días los mejores explantes en la fase de multiplicación de brotes en un habitat adecuado, las mejores vitroplantas fueron transferido para su desarrollo de callos y posterior a su enraizamiento a un medio que contienen hormonas de enraizamiento Ácido Naftaleno Acético (ANA) y Ácido Indolbutírico (AIB) que se encuentran en tubos de ensayo cerrado herméticamente, para luego ser evaluado a los 30 días de su transferencia.

Cuadro 9. Factores y niveles utilizados durante la fase de enraizamiento

Factor		Niveles
A	Ácido Indolbutírico (AIB)	1 mg L ⁻¹ (AIB)
		1,5 mg L ⁻¹ (AIB)
B	Ácido Naftaleno Acético (ANA)	0,5 mg L ⁻¹ (ANA)
		1 mg L ⁻¹ (ANA)

Cuadro 10. Combinaciones y tratamientos utilizados en la fase de enraizamiento.

Tratamientos	Combinación Factor (axb)	Tratamientos
1	a1b1	1 mg L ⁻¹ AIB + 0,5 mg L ⁻¹ ANA
2	a1b2	1 mg L ⁻¹ AIB + 1 mg L ⁻¹ ANA
3	a2b1	1,5 mg L ⁻¹ AIB + 0,5 mg L ⁻¹ ANA
4	a2b2	1,5 mg L ⁻¹ AIB + 1 mg L ⁻¹ ANA

En la fase de enraizamiento se utilizó un arreglo bifactorial 2x2 sobre un DCA con 4 repeticiones con 5 observaciones cada una de ellas completando un total de 80 unidades experimentales. La obtención del análisis de varianza y separación de medias al 95% de probabilidad se realizó mediante el programa estadístico MSTATC.

e) Análisis de Varianza

Cuadro 11. Esquema del análisis de varianza de la fase de enraizamiento

Fuente de variación	Grados de libertad	
Factor a	a-1	1
Factor b	b-1	1
ab	(a-1) (b-1)	1
Error	(ab) (r-1)	12
Total	rt - 1	15

Para establecer diferencias estadísticas entre tratamientos se utilizó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey ($P \geq 0,05$)

f) Datos tomados y métodos de evaluación a los 30 días

1) Explantes contaminados

Después que permanecieron 30 días los mejores explantes en el medio de enraizamiento procedemos a evaluar visualmente tanto la contaminación por hongos y bacterias, los resultados con valores cero fueron transformados con la siguiente fórmula: $\sqrt{x+0,5}$

2) Callos

Mediante la observación visual podemos darnos cuenta que existirá un posible crecimiento de raíz después de los 30 días de haber permanecido en el medio de enraizamiento.

3) Explantes cloróticas

Esto se realizó a través de la observación visual de los explantes que presentan un color blanquinoso, posterior a los 30 días de estar en el medio de enraizamiento.

4) Vigor

También se evaluó de forma directa con la observación visual, para determinar el vigor del explante con la tabla de valoración:

Cuadro 12. Niveles y escala del vigor de los explantes de cedro.

Niveles	Escala
1	Muy bueno
2	Bueno
3	Regular
4	Muerto

5) Número de raíces

El registro del número de raíces por planta se determinó considerando la existencia cada una de ellas.

6) Longitud de raíces

Se utilizó una regla graduada en centímetros con aproximaciones al milímetro.

7) Números de brotes por explante

El registro del número de brotes se realizó de forma visual a los 30 días después de haber permanecido en el medio de enraizamiento, mediante el conteo de brotes por vitroplanta.

8) Longitud de brotes

Después de permanecer treinta días en el medio de enraizamiento se procedió a medir con una regla graduada en centímetros con aproximaciones al milímetro.

9) Explantes vivos

Para conocer el porcentaje de supervivencia de las plantas se utilizó una regla de tres simple.

IV. RESULTADOS

La presente investigación se realizó en fases cuyos resultados se describen a continuación

A. Fase de establecimiento (hipoclorito de calcio)

1. Efecto simple del establecimiento en la variable contaminación por hongos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Hipoclorito de calcio

Para el efecto simple de la acción del hipoclorito de calcio sobre la contaminación por hongos en explantes de cedro en la fase establecimiento existió diferencias altamente significativas, obteniéndose el promedio más alto para la concentración 2 g L^{-1} que fue el de 0,25 explantes y el menor valor 0,07 para la concentración $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (Cuadro 13).

b. Gentamicina

Para el efecto simple de la gentamicina, sobre la contaminación por hongos en explantes de cedro se encontró diferencias altamente significativas entre las concentraciones de este factor, siendo el promedio más alto con 10 mg L^{-1} 0,29 explantes y el más bajo 0,04 en la concentración de 0 mg L^{-1} (Cuadro 13).

Cuadro 13. Promedios del efecto simple de los factores, hipoclorito de calcio y gentamicina en la variable contaminación por hongos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Contaminación Hongos
A1.Hipoclorito de calcio 2g L ⁻¹	0.25 a
A2. Hipoclorito de calcio 2,5g L ⁻¹	0.07 b
B1. Gentamicina 0 mg L ⁻¹	0.04 a
B2. Gentamicina 10 mg L ⁻¹	0.29 b
CV* %	5.02
P	

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores hipoclorito de calcio por gentamicina

En la interacción de los dos factores, hipoclorito de calcio por gentamicina hubo diferencias altamente significativas, a los 21 días de establecido los explantes, obteniendo como resultado el mejor tratamiento para combatir la incidencia de hongos en los explante, la concentración de 2 g L⁻¹ hipoclorito de calcio + 0 mg gentamicina, pero se encontró en este tratamiento un alto valor de contaminación por bacterias. (Anexo 1).

2. Efecto simple del establecimiento en la variable contaminación por bacteria en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Hipoclorito de calcio

Para el efecto simple de la acción del hipoclorito de calcio sobre la contaminación por bacteria en los explantes de cedro, no existen diferencias significativas en los dos niveles. (Cuadro 14).

b. Gentamicina

El efecto simple de la gentamicina, sobre la contaminación por bacteria en los explantes de cedro , se encontró diferencias altamente significativas entre las concentraciones de este factor, siendo el promedio más alto con 0 mg L⁻¹ 0,84 explantes y el más bajo con 0,20 en la concentración de 10 mg L⁻¹(Cuadro 14).

Cuadro 14. Promedios del efecto simple de los factores, hipoclorito de calcio y gentamicina en la variable contaminación por bacteria en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Contaminación Bacterias
A1.Hipoclorito de calcio 2g L ⁻¹	0.53 a
A2. Hipoclorito de calcio 2,5 g L ⁻¹	0.45 a
B1. Gentamicina 0 mg L ⁻¹	0.84 a
B2. Gentamicina 10 mg L ⁻¹	0.20 b
CV. %	8.26

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores hipoclorito de calcio por gentamicina

En la interacción de los dos factores, hipoclorito de calcio por gentamicina hubo diferencias significativas, a los 21 días de establecido los explantes, obteniendo como mejor tratamiento la concentración 2 g L⁻¹ hipoclorito de calcio + 10 mg L⁻¹ gentamicina para disminuir la contaminación por bacterias, tampoco se obtuvo presencia de explantes cloróticos. (Anexo 1).

3. Efecto simple del establecimiento en la variable clorótica en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Hipoclorito de calcio

En el efecto simple de la acción del hipoclorito de calcio en la variable clorótica en explantes de cedro, no existió diferencia significativa en sus respectivas concentraciones (Cuadro 15).

b. Gentamicina

El efecto simple de la gentamicina, para la variable clorótica en los explantes de cedro, no se encontraron diferencias significativas. (Cuadro 15).

Cuadro 15. Promedios del efecto simple de los factores, hipoclorito de calcio y gentamicina en la variable clorótica en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Clorótica
A1.Hipoclorito de calcio 2g L ⁻¹	0.00 a
A2. Hipoclorito de calcio 2,5 g L ⁻¹	0.00 a
B1. Gentamicina 0 mg L ⁻¹	0.00 a
B2. Gentamicina 10 mg L ⁻¹	0.00 a
CV. %	0.00

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores hipoclorito de calcio por gentamicina

En la interacción de los dos factores, hipoclorito de calcio por gentamicina no hubo diferencia significativas, debido que en todos los tratamientos que se le aplicó a los explantes no existió clorosis en las yemas axilares sembradas en el medio de cultivo (Anexo 1).

4. Efecto simple del establecimiento en la variable vivos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Hipoclorito de calcio

En el efecto simple de la acción del hipoclorito de calcio sobre la variable vivos en explantes de cedro, no existió diferencias significativas alguna. (Cuadro 16).

b. Gentamicina

Para el efecto simple de la gentamicina, sobre la variable vivos en los explantes de cedro, se encontró diferencias altamente significativas entre las diferentes concentraciones de este factor, siendo el promedio más alto con 10 mg L⁻¹ 0,45 explantes y el más bajo con 0,06 en la concentración de 0 mg L⁻¹ (Cuadro 16).

Cuadro 16. Promedios del efecto simple de los factores, hipoclorito de calcio y gentamicina en la variable vivos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Vivos
A1.Hipoclorito de calcio 2 g L ⁻¹	0.16 a
A2. Hipoclorito de calcio 2,5 g L ⁻¹	0.34 a
B1. Gentamicina 0 mg L ⁻¹	0.06 b
B2. Gentamicina 10 mg L ⁻¹	0.45 a
CV. %	11.70

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores hipoclorito de calcio por gentamicina

En la interacción de los factores hipoclorito de calcio por gentamicina para la variable vivos no existió diferencias significativas a los 21 días de establecido el ensayo, donde se obtuvo el mayor número de explantes vivos fue en la

concentración de 2,5 g L⁻¹ hipoclorito de calcio + 10 mg L⁻¹ gentamicina debido que hubo una incidencia menor de contaminación (Anexo 1).

B. Fase de establecimiento (bicloruro de mercurio)

1. Efecto simple del establecimiento en la variable de contaminación por hongos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Bicloruro de mercurio

El efecto simple de la acción del HgCl₂ sobre la variable hongos, a los 21 días no hubo diferencias significativas. (Cuadro 17).

b. Gentamicina

El efecto simple de la gentamicina en la variable contaminación por hongos, a los 21 días no hubo diferencias significativas (Cuadro 17).

Cuadro 17. Promedios del efecto simple de los factores, bicloruro de mercurio y gentamicina en la variable de contaminación por hongos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 21 días de establecidos los explantes” (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Contaminación Hongos
A1. Bicloruro de mercurio 8 minutos	0.00 a
A2. Bicloruro de mercurio 15 minutos	0.02 a
B1. Gentamicina 0 mg L ⁻¹	0.00 a
B2. Gentamicina 10 mg L ⁻¹	0.02 a
CV. %	3.49

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores bicloruro de mercurio por gentamicina

En la interacción de los dos factores, bicloruro de mercurio por gentamicina en la variable contaminación por hongos no hubo diferencias significativas, a los 21 días de establecido los explantes, pero se presentó una mínima contaminación en la concentración de 15 minutos de 0,25% bicloruro de mercurio + 10 mg L⁻¹ gentamicina, pero hubo un buen porcentaje de explantes vivos que fueron transferido a la fase de multiplicación (Anexo 2).

2. Efecto simple del establecimiento en la variable de contaminación por bacteria en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Bicloruro de mercurio

El efecto simple de la acción del bicloruro de mercurio sobre la variable de contaminación por bacteria, a los 21 días de haber sido establecido aquí si hubo diferencias altamente significativas, donde el mayor promedio fue 0.38 explantes cuando se sometió a 8 minutos de inmersión y a los 15 minutos se obtuvo el más bajo promedio 0.12 explantes contaminados. (Cuadro 18).

b. Gentamicina

El efecto simple de la acción de la gentamicina de la variable de contaminación por bacteria, mostró diferencias altamente significativas, donde el mayor efecto fue 0,46 números de explantes en la concentración 0 mg L⁻¹ y en la concentración de 10 mg L⁻¹ el más bajo con 0.07 promedio de explantes (Cuadro 18).

Cuadro 18. Promedios del efecto simple de los factores, bicloruro de mercurio y gentamicina en la variable de contaminación por bacteria en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Contaminación Bacterias
A1. Bicloruro de mercurio 8 minutos	0.38 a
A2. Bicloruro de mercurio 15 minutos	0.12 b
B1. Gentamicina 0 mg L ⁻¹	0.46 a
B2. Gentamicina 10 mg L ⁻¹	0.07 b
CV. %	7.91

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores bicloruro de mercurio por gentamicina

En la interacción de los dos factores, bicloruro de mercurio por gentamicina en la variable contaminación por bacterias existió diferencias altamente significativas, a los 21 días de haber sido establecido los explantes, el mejor tratamiento, fue el dos con la concentración de 0,25% de bicloruro de mercurio a 8 minutos + 10 mg L⁻¹ gentamicina donde no presentó ninguna contaminación y el porcentaje de sobrevivencia fue el más alto (Anexo 2).

3. Efecto simple del establecimiento en la variable clorótica en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Bicloruro de mercurio

El efecto simple de la acción del bicloruro de mercurio sobre la variable clorótica en la fase de establecimiento, a los 21 días de haber sido establecido no existió diferencias estadísticas significativas. (Cuadro 19).

b. Gentamicina

El efecto simple de la gentamicina en la variable clorótica, no causó efecto en sus dos concentraciones a los 21 días de haber sido establecido (Cuadro 19).

Cuadro 19. Promedios del efecto simple de los factores, bicloruro de mercurio y gentamicina en la variable de contaminación cloróticas en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	cloróticas
A1. Bicloruro de mercurio 8 minutos	0.16 a
A2. Bicloruro de mercurio 15 minutos	0.00 a
B1. Gentamicina 0 mg L ⁻¹	0.16 a
B2. Gentamicina 10 mg L ⁻¹	0.00 a
CV. %	15.55

*

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores bicloruro de mercurio por gentamicina

En la interacción de los dos factores, bicloruro de mercurio por gentamicina en la variable clorótica no hubo diferencias significativas, a los 21 días de haber sido establecido los explantes, en el tratamiento uno con la concentración de 0,25% bicloruro de mercurio + 0 mg L⁻¹ gentamicina hubo presencia de clorosis y contaminación por bacterias, pero tuvimos un índice considerable de explantes vivos para ser transferido a la siguiente fase (Anexo 2).

4. Efecto simple del establecimiento en la variable vivos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Bicloruro de mercurio

El efecto simple de la acción del bicloruro de mercurio sobre la variable vivos, a los 21 días de haber sido establecido no se obtuvo diferencias significativas (Cuadro 20).

b. Gentamicina

El efecto simple de la gentamicina en la variable vivos, no produjo efecto alguno en sus concentraciones a los 21 días de haber sido establecido por lo tanto no hubo diferencias significativas (Cuadro 20).

Cuadro 20. Promedios del efecto simple de los factores, bicloruro de mercurio y gentamicina en la variable vivos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Vivos
A1. Bicloruro de mercurio 8 minutos	0.81 a
A2. Bicloruro de mercurio 15 minutos	0.78 a
B1. Gentamicina 0 mg L ⁻¹	0.72 a
B2. Gentamicina 10 mg L ⁻¹	0.87 a
CV. %	8.92

* promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores bicloruro de mercurio por gentamicina

En la interacción de los dos factores, bicloruro de mercurio por gentamicina en la variable vivos no existió diferencias significativas, a los 21 días de haber sido establecido los explantes, pero la mejor concentración en esta variable fué 0,25% bicloruro de mercurio a 8 minutos + 10 mg L⁻¹ gentamicina no mostrando ninguna contaminación, alcanzando el mayor porcentaje de los explantes vivos con respecto a las otras concentraciones (Anexo 2).

C. Fase de multiplicación

1. Variable contaminación por hongos

El análisis de varianza para la variable contaminación por hongos mostró en los resultados que no existieron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos bajo estudio. (Anexo 3).

2. Variable contaminación por bacterias

De los resultados obtenidos de la varianza en la variable contaminación por bacterias se observó que existe diferencias altamente significativas en el tratamiento 3. (Anexo 3).

3. Variable clorótica

El análisis de varianza para la variable clorótica no reportó diferencias significativas en los tratamientos bajo estudio. (Anexo 3).

4. Variable vigor

Después del análisis de la varianza en esta variable se pudo determinar que existió diferencias altamente significativas en el tratamiento 3. (Anexo 3).

5. Variable número de brotes

Después de haber realizado los estudios respectivos de varianza se determinó que no existió diferencias significativas en ninguno de los tratamientos en estudio pero se pudo diferenciar entre uno y otro numéricamente. (Anexo 3).

6. Variable longitud de brotes

En el análisis de varianza para esta variable se determinó que no existieron diferencias significativas en los tratamientos en estudio. (Anexo 3).

7. Variable vivos

En esta variable se obtuvo mediante el análisis de varianza que en los 4 tratamientos no existieron diferencias significativas alguna en los diferentes tratamientos (Anexo 3).

D. Fase de enraizamiento

1. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable callos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata L*”.

a. Ácido indolbutírico (AIB)

El efecto simple causado por la acción del AIB en la variable callos se obtuvo diferencias significativas donde el mayor promedio fue en la concentración 1 mg L^{-1} 0,19 explantes, y causando menos efecto con el promedio de 0,00 de explantes en la concentración de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ AIB a los treinta días de haber sido transferido (Cuadro 21).

b. Ácido naftaleno acético (ANA)

En esta concentración el efecto simple causado en la variable callos no hubo diferencias significativas, pero el valor del promedio más alto fue en la concentración de 1 mg L^{-1} ANA con 0,14 promedio de explantes, y el más bajo en la concentración $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA con 0,05 explantes (Cuadro 21).

Cuadro 21. Promedios del efecto simple de los factores, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftaleno acético (ANA) en la variable callos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Callos
A1. Ácido indolbutírico (AIB) 1 mg L ⁻¹	0.19 a
A2. Ácido indolbutírico (AIB) 1,5 mg L ⁻¹	0.00 b
B1. Ácido naftaleno acético (ANA) 0,5 mg L ⁻¹	0.05 a
B2. Ácido naftaleno acético (ANA) 1 mg L ⁻¹	0.14 a
CV. %	11.02

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA).

En la interacción de los dos factores, Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable callos no existió diferencias significativas, a los 30 días de haber sido establecido los explantes. (Anexo 4).

2. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable de contaminación por hongos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Ácido indolbutírico (AIB)

El efecto simple causado por la acción del AIB en la variable de contaminación por hongos no hubo diferencias significativas después de los treinta días de su transferencia, donde las dos concentraciones tuvieron el promedio igual de explantes que es de 0,23 (Cuadro 22).

b. Ácido naftaleno acético (ANA)

En esta concentración el efecto simple causado en la variable de contaminación por hongos si existió diferencias significativas alguna, la concentración de 1 mg L⁻¹ ANA obtuvo el mayor número de explantes con un promedio de 0,41 mientras que la concentración de 0,5 mg L⁻¹ ANA tiene un promedio de explantes de 0,12 ((Cuadro 22).

Cuadro 22. Promedios del efecto simple de los factores, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftaleno acético (ANA) en la variable de contaminación por hongos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Contaminación Hongos
A1. Ácido indolbutirico (AIB) 1 mg L ⁻¹	0.23 a
A2. Ácido indolbutirico (AIB) 1,5 mg L ⁻¹	0.23 a
B1. Ácido naftaleno acético (ANA) 0,5 mg L ⁻¹	0.12 a
B2. Ácido naftaleno acético (ANA) 1 mg L ⁻¹	0.41 b
CV. %	12.76

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA).

En la interacción de los dos factores, Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable de contaminación por hongos no hay diferencias significativas, a los 30 días de haber sido establecido los explantes. (Anexo 4).

3. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable de contaminación por bacterias en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Ácido indolbutírico (AIB)

El efecto simple causado por la acción del AIB en la variable de contaminación por bacterias de acuerdo al estudio realizado de su análisis de varianza no hubo diferencias significativas a los treinta días de su respectiva transferencia, pero el promedio más alto de explantes lo encontramos en la concentración 1 mg L⁻¹ AIB con 0,46 y en la concentración de 1,5 mg L⁻¹ AIB el promedio más bajo de explantes con 0,32 (Cuadro 23).

b. Ácido naftaleno acético (ANA)

La acción del efecto simple de la hormona ANA no tuvo incidencia alguna en la variable de contaminación por bacterias después de su análisis no se obtuvo diferencias significativas a los treinta días de haber realizado su transferencia, en su medio respectivo. (Cuadro 23).

Cuadro 23. Promedios del efecto simple de los factores, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftaleno acético (ANA) en la variable de contaminación de bacterias en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Contaminación Bacterias
A1. Ácido indolbutírico (AIB) 1 mg L ⁻¹	0.46 a
A2. Ácido indolbutírico (AIB) 1,5 mg L ⁻¹	0.32 a
B1. Ácido naftaleno acético (ANA) 0,5 mg L ⁻¹	0.47 a
B2. Ácido naftaleno acético (ANA) 1 mg L ⁻¹	0.32 a
CV. %	19.65

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA).

En la interacción de los dos factores, Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable de contaminación por bacterias no hay diferencias significativas entre los tratamientos. (Anexo 4).

4. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable clorótica en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Ácido indolbutírico (AIB)

No hubo diferencias significativas por la acción de esta hormona en sus dos concentraciones respectivas en la variable clorótica a los treinta días de su transferencia, dando como resultado que el promedio más alto lo obtuvimos en la concentración de 1,5 mg L⁻¹ AIB con 0,14 para esta variable, obteniendo el promedio más bajo en la concentración de 1 mg L⁻¹ AIB con 0,08 de explantes (Cuadro 24).

b. Ácido naftaleno acético (ANA)

La acción del efecto simple del Ácido naftaleno acético (ANA) en sus dos concentraciones después de su análisis no hubo diferencia significativas, obteniendo el valor del promedio de explantes más alto en la concentración de 1 mg L⁻¹ ANA con 0,17 y el más bajo en la concentración de 0,5 mg L⁻¹ ANA con 0,05 de promedio de explantes (Cuadro 24).

Cuadro 24. Promedios del efecto simple de los factores, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftaleno acético (ANA) en la variable clorótica en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Clorótica
A1. Ácido indolbutírico (AIB) 1 mg L ⁻¹	0.08 a
A2. Ácido indolbutírico (AIB) 1,5 mg L ⁻¹	0.14 a
B1. Ácido naftaleno acético (ANA) 0,5 mg L ⁻¹	0.05 a
B2. Ácido naftaleno acético (ANA) 1 mg L ⁻¹	0.17 a
CV. %	10.15

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA).

En la interacción de los dos factores, Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable clorótica existió diferencias significativas en los tratamientos, la concentración 1,5 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ ANA no presentó clorosis y unos porcentajes bajos de contaminación, obteniendo el mayor número de explantes vivos en esta fase (Anexo 4).

5. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable vigor en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Ácido indolbutírico (AIB)

El efecto simple causado por la acción del AIB en la variable vigor se obtuvo diferencias altamente significativas a los treinta días de haber sido transferido a su medio respectivo, obteniendo el promedio más alto de explantes en la concentración de 1 mg L⁻¹ AIB con 2,60 y en la concentración de 1,5 mg L⁻¹ AIB el promedio de explante más bajo con 1,05 (Cuadro 25).

b. **Ácido naftaleno acético (ANA)**

En esta concentración el efecto simple causado por la acción del Ácido naftaleno acético ANA en la variable vigor después del análisis de varianza no se obtuvo diferencias significativas, el valor del promedio más alto fué en la concentración de 0,5 mg L⁻¹ ANA con 2,01 explantes, y el promedio más bajo en la concentración 1 mg L⁻¹ ANA con 1,52 explantes (Cuadro 25).

Cuadro 25. Promedios del efecto simple de los factores, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftaleno acético (ANA) en la variable vigor en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Vigor
A1. Ácido indolbutírico (AIB) 1 mg L ⁻¹	2.60 a
A2. Ácido indolbutírico (AIB) 1,5 mg L ⁻¹	1.05 b
B1. Ácido naftaleno acético (ANA) 0,5 mg L ⁻¹	2.01 a
B2. Ácido naftaleno acético (ANA) 1 mg L ⁻¹	1.52 a
CV. %	16.07

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. **Interacción de los factores Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA).**

En la interacción de los dos factores, Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable vigor no existió diferencias significativa a los treinta días de su transferencia. (Anexo 4).

6. **Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable número de raíces en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.**

a. **Ácido indolbutírico (AIB)**

El efecto simple causado por la acción del (AIB) en la variable número de raíces no tuvo incidencia alguna por lo tanto no hubo diferencias significativas a los treinta días de haber sido transferido los explantes, pero en

la concentración de 1 mg L⁻¹ AIB se obtuvo el mayor promedio de explantes en esta variable con 0,05 y donde no tuvo incidencia fué en la concentración de 1,5 mg L⁻¹ AIB con el promedio de explantes 0,00 (Cuadro 26).

b. Ácido naftaleno acético (ANA)

La acción del efecto simple del Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable número de raíces después de su análisis de varianza no se obtuvo diferencias significativas. (Cuadro 26).

Cuadro 26. Promedios del efecto simple de los factores, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftaleno acético (ANA) en la variable número de raíces en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Número de raíces
A1. Ácido indolbutírico (AIB) 1 mg L ⁻¹	0.05 a
A2. Ácido indolbutírico (AIB) 1,5 mg L ⁻¹	0.00 a
B1. Ácido naftaleno acético (ANA) 0,5 mg L ⁻¹	0.05 a
B2. Ácido naftaleno acético (ANA) 1 mg L ⁻¹	0.00 a
CV. %	8.28

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA).

En la interacción de los dos factores, Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable número de raíces no hubo diferencias significativas a los treinta días de su transferencia (Anexo 4).

7. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable longitud de raíces en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. **Ácido indolbutírico (AIB)**

No causo efecto alguno en sus dos concentraciones de (AIB) en la variable de longitud de raíces por lo tanto no existió diferencias significativas, pero se obtuvo en los resultados el promedio más alto de explantes en la concentración de 1 mg L⁻¹ AIB con 0,10 y donde no tuvo incidencia fué en la concentración de 1,5 mg L⁻¹ AIB con 0,00 promedio de explantes (Cuadro 27).

b. **Ácido naftaleno acético (ANA)**

La acción del efecto simple del Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable longitud de raíces a los treinta días que los explantes fueron transferido a su medio se obtuvo un análisis de varianza sin diferencia significativas en sus respectivas concentraciones, el resultado del promedio de explantes más alto fué en la concentración de 0,5 mg L⁻¹ ANA con 0,10 y en la concentración 1mg L⁻¹ ANA se obtuvo un promedio de explantes de 0,00 (Cuadro 27).

Cuadro 27. Promedios del efecto simple de los factores, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftaleno acético (ANA) en la variable longitud de raíces en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Longitud de raíces
A1. Ácido indolbutírico (AIB) 1 mg L ⁻¹	0.10 a
A2. Ácido indolbutírico (AIB) 1,5 mg L ⁻¹	0.00 a
B1. Ácido naftaleno acético (ANA) 0,5 mg L ⁻¹	0.10 a
B2. Ácido naftaleno acético (ANA) 1 mg L ⁻¹	0.00 a
CV. %	17.19

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA).

En la interacción de las dos hormonas tanto como AIB Y ANA en la variable longitud de raíces después de su análisis de varianza se obtuvo que no tienen diferencias significativas a los treinta días de haber sido transferido sus explantes. (Anexo 4).

8. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable número de brotes en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Ácido indolbutírico (AIB)

El efecto simple causado por la acción del (AIB) en la variable número de brotes si se obtuvo diferencias altamente significativas a los treinta días de haber sido transferido a su medio respectivo, donde la concentración de 1 mg L⁻¹ AIB se obtuvo el más alto promedio de explantes con 1,76 y en la concentración de 1,5 mg L⁻¹ AIB el más bajo promedio con 0,62 de explantes (Cuadro 28).

b. Ácido naftaleno acético (ANA)

En esta concentración el efecto simple causado por la acción del Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable número de brotes después del análisis de varianza no se obtuvo diferencias significativas, el promedio más alto fue en la concentración de 0,5 mg L⁻¹ ANA con 1,26 explantes, y el promedio más bajo en la concentración 1 mg L⁻¹ ANA con 1,02 explantes (Cuadro 28).

Cuadro 28. Promedios del efecto simple de los factores, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftaleno acético (ANA) en la variable número de brotes en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata L.*”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Número de brotes
A1. Ácido indolbutírico (AIB) 1 mg L ⁻¹	1.76 a
A2. Ácido indolbutírico (AIB) 1,5 mg L ⁻¹	0.62 b
B1. Ácido naftaleno acético (ANA) 0,5 mg L ⁻¹	1.26 a
B2. Ácido naftaleno acético (ANA) 1 mg L ⁻¹	1.02 a
CV. %	12.67

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA).

En la interacción de los dos factores, Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable número de brotes no hubo diferencias significativas a los 30 días de haber sido establecido los explantes. (Anexo 4).

9. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable longitud de brotes en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata L.*”.

a. Ácido indolbutírico (AIB)

El efecto simple causado por la acción del AIB en la variable longitud de brotes después de su análisis de varianza se determinó que hubo diferencias significativas a los treinta días de haber sido transferido a su medio respectivo, el promedio más alto se obtuvo en la concentración de 1 mg L⁻¹ AIB con el valor de 2,04 y en la concentración de 1,5 mg L⁻¹ AIB el promedio más bajo de explantes con 1,32 (Cuadro 29).

b. **Ácido naftaleno acético (ANA)**

La acción del efecto simple del Ácido naftaleno acético ANA en la variable longitud de brotes después del análisis de varianza se obtuvo diferencias significativas, numéricamente el promedio más alto fué en la concentración de 0,5 mg L⁻¹ ANA con 2,06 explantes, y el promedio más bajo en la concentración 1 mg L⁻¹ ANA con 1,30 explantes (Cuadro 29).

Cuadro 29. Promedios del efecto simple de los factores, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftaleno acético (ANA) en la variable longitud de brotes en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Longitud de brotes
A1. Ácido indolbutírico (AIB) 1 mg L ⁻¹	2.04 a
A2. Ácido indolbutírico (AIB) 1,5 mg L ⁻¹	1.32 b
B1. Ácido naftaleno acético (ANA) 0,5 mg L ⁻¹	2.06 a
B2. Ácido naftaleno acético (ANA) 1 mg L ⁻¹	1.30 b
CV. %	11.83

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. **Interacción de los factores Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA).**

En la interacción de los dos factores, Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable longitud de brotes no existe diferencias significativas a los 30 días de haber sido establecido los explantes, pero obteniendo resultados favorables en la longitud de los brotes en el tratamiento de 1 mg L⁻¹ AIB + 0,5 mg L⁻¹ ANA (Anexo 4).

10. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable vivos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para cedro *Cedrela odorata* L”.

a. Ácido indolbutírico (AIB)

El efecto simple causado por la acción del AIB en la variable vivos no se obtuvo diferencias significativas a los treinta días de haber sido transferido a su medio respectivo, pero se obtuvo el mayor promedio de explantes en la concentración de 1,5 mg L⁻¹ AIB con 0,34 y el promedio más bajo se lo obtuvo en la concentración de 1 mg L⁻¹ AIB con 0,23 de explantes vivos (Cuadro 30).

b. Ácido naftaleno acético (ANA)

La acción del efecto simple del Ácido naftaleno acético (ANA) en sus dos concentraciones después de su análisis de varianza se obtuvo que no existió diferencia significativas, a los treinta días de haber sido transferido los explantes, se obtuvo el promedio más alto en la concentración de 0,5 mg L⁻¹ ANA con 0,32 explantes, y el promedio de explantes más bajo se obtuvo con la concentración de 1 mg L⁻¹ ANA con 0,25 (Cuadro 30).

Cuadro 30. Promedios del efecto simple de los factores, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftaleno acético (ANA) en la variable vivos en el “Desarrollo de protocolo de propagación *in vitro* para (cedro) *Cedrela odorata* L.”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).

Efecto simple de los tratamientos	Vivos
A1. Ácido indolbutirico (AIB) 1 mg L ⁻¹	0,23 a
A2. Ácido indolbutirico (AIB) 1,5 mg L ⁻¹	0,34 a
B1. Ácido naftaleno acético (ANA) 0,5 mg L ⁻¹	0,32 a
B2. Ácido naftaleno acético (ANA) 1 mg L ⁻¹	0,25 a
CV. %	12.78

*Promedio con letras iguales no presenta diferencias estadísticas según Tukey al 5% de probabilidad.

c. Interacción de los factores Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA).

En la interacción de los dos factores, Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético (ANA) en la variable vivos no hubo diferencias significativas de los explantes a los treinta días de su transferencia. (Anexo 4).

E. Identificación de hongos

Durante el avance de la propagación *in vitro* de cedro se presencié el desarrollo de diversos hongos filamentosos en los diferentes tratamientos, los mismos que fueron identificados con la ayuda de claves taxonómicas (Barnett *et al.*, 1972) en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal de la UTEQ. Los hongos encontrados como contaminantes en el cultivo *in vitro* de cedro a nivel de género están: *Cladosporium* y *Curvularia*, donde *Cladosporium* se ha identificado con más frecuencia en la investigación (Anexo 5).

F. Análisis económico

Se calculó los costos de aplicación de cada tratamiento sumando los valores de los medios de cultivo, de las hormonas, insumos fitosanitarios, mano de obra, agua, explantes, suministros, materiales indirectos y gastos administrativos (Anexo 16-19).

V. DISCUSIÓN

La base de este trabajo de investigación, fue la búsqueda de un protocolo eficiente para la producción de plantas de cedro mediante micropropagación. El cultivo *in vitro*, permite la multiplicación de plantas a gran escala, especialmente en el ámbito de la producción comercial.

Para que la micropropagación sea eficiente es necesario comenzar el cultivo con plantas madres sanas y una alta tasa de multiplicación. Para conseguir una alta tasa de multiplicación a partir de los explantes primarios, es necesario disminuir el porcentaje de pérdidas en los estadios iniciales y desarrollar un medio de cultivo adecuado para conseguir el máximo número de plantas regeneradas (Cassells y Minas, 1983).

Por otra parte, la micropropagación comercial exige que las plantas regeneradas sean homogéneas e idénticas a la planta madre aunque la variabilidad de las plantas obtenidas puede utilizarse para la mejora de los cultivos propagados de forma vegetativa (Skirvin y Janick, 1976).

Además, existe la posibilidad de producir plantas utilizando el cultivo *in vitro* con un menor coste si se consigue una buena tasa de multiplicación y de supervivencia en los diferentes estadios críticos del proceso de micropropagación, especialmente en la aclimatación (Cassells *et al.*, 1997).

Otra aplicación del cultivo *in vitro* es la posibilidad de obtener plantas con nuevas características a través de la transformación genética (Pellegrineschi, 1996). Para poder transformar cualquier especie de plantas, a través de las diferentes técnicas disponibles, es necesario desarrollar un método de regeneración de plantas *in vitro*, cuya eficiencia sea adecuada para superar las bajas tasas de transformación y nos permita obtener transformantes de una forma eficiente.

El diseño de un protocolo de micropropagación eficaz, pasa por la optimización de cada uno de los estadios del cultivo *in vitro*, desde el cultivo de las plantas madre en el invernadero hasta la obtención de plantas ya aclimatadas.

A. Fase de establecimiento.

Uno de los principales problemas que se presenta para el establecimiento *in vitro* de especies forestales como es la *Cedrela odorata* L., es la contaminación microbiana.

Los daños mecánicos ocasionados por los cortes en los explantes de cedro durante la esterilización y la preparación para el cultivo *in vitro*, no produjeron problemas en cuanto a la producción de sustancias fenólicas . Los fenoles son compuestos lábiles que se oxidan muy fácilmente (Debergh y Read, 1991). La oxidación de estos exudados fenólicos produce sustancias que causan el ennegrecimiento del medio y que pueden llegar ser letales para los explantes porque inhiben en su crecimiento (Hildebrandt y Harney, 1988; Debergh y Maene, 1977).

Los resultados del experimento uno en la fase de establecimiento mostró que el tratamiento 4 (hipoclorito de calcio a la concentración 2,5 g L⁻¹ durante 20 minutos más 10 mg L⁻¹ de gentamicina) obtuvo un promedio de contaminación por hongos de 8%, la contaminación por bacterias fue de 24%, lo que permitió una sobrevivencia del 59%. Esto demuestra que el uso de hipoclorito de calcio combinado con la gentamicina al 10 mg L⁻¹, puede controlar este tipo de microorganismos, al menos durante los 21 días que permanecieron en el medio de cultivo inicial. También corroboran dichos resultados los obtenidos por Ramírez *et al.*, (1999), quienes determinaron que la contaminación por hongos es uno de los principales problemas que limitan el establecimiento aséptico de segmentos nodales de material adulto de guayabo.

Además Biasi *et al.* (1994) señalaron que la presencia de microorganismos contaminantes, hongos y bacterias, es uno de los elementos que puede limitar el establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de plantas leñosas. Otro efecto

observado fue que el blanqueamiento que ocurría en los explantes en experimentos preliminares tratados con hipoclorito de sodio, fue superado al utilizar el hipoclorito de calcio.

En el segundo experimento de la fase de establecimiento el mayor promedio de explantes vivos se lo obtuvo en el tratamiento 2 (25% de bicloruro de mercurio durante 8 minutos y 10 mg L⁻¹ gentamicina) con un promedio del 100% de explantes vivos, con estos resultados nos permite aceptar nuestra hipótesis planteada, ya que estos son superiores a los alcanzados por Borges 2004 en *Guadua angustifolia Kunth* (75 a 80%) y Sierra *et al.* (1999) durante la optimización de la metodología de desinfección de yemas apicales de *Philodendron xanadu* donde llevaron a cabo igualmente dos tratamientos: el primero con hipoclorito de calcio al 2.0% y el segundo con bicloruro de mercurio (0.01%), siendo los mayores resultados los alcanzados con hipoclorito de calcio (2.0%) durante 35 minutos, donde alcanzaron un 35% de explantes vivos.

Sin embargo se observó que transcurridos los 21 días al realizar la transferencia de los explantes (no contaminados) desinfectados con bicloruro de mercurio se morían, esto pudo deberse a que los explantes presentaron una clorosis continua de sus tejidos, la cual condujo de manera paulatina a la muerte de los mismos. Todo ello podría estar dado principalmente al efecto fitotóxico del reactivo bicloruro de mercurio sobre el material vegetal.

No se observó oxidación en los explantes, este fenómeno puede ser debido a que la cantidad de fenoles existentes en los tejidos de las plantas cultivadas en el invernadero es bajo. Los tejidos jóvenes cuando se escinden, tienen generalmente menos tendencia a producir exudados fenólicos que los más viejos (George, 1996). Estos resultados indican que la elección del explante y la época del año en la que se produzca la recolección, puede tener un gran efecto en el establecimiento *in vitro* y por tanto en el desarrollo de un eficiente protocolo de micropropagación.

B. Fase de multiplicación

El empleo de la citoquininas bencilaminopurina (BAP) hace que en los explantes regeneren mayor número de plantas y de menor tamaño a medida que aumenta la concentración de la citoquininas en el medio de cultivo ya que el BAP actúa como inhibidor de la dominancia apical y potencia la formación de brotes laterales (Pierik, 1988).

El objetivo de esta fase es establecer una mejor concentración de citoquininas (BAP) para la proliferación de brotes de cedro, en el Anexo 3 podemos observar que luego de los 30 días de haber sido transferido los explantes al medio WPM con diferentes concentraciones de citoquininas, no se observó diferencias significativas, el tratamiento T2 (BAP $0,5\text{ mg L}^{-1}$) presentó el promedio más alto en supervivencia con un 60% de explantes vivos así como longitud 3.10 mm, y en la variable vigor con un promedio de 3,20. Por lo tanto queda aceptada nuestra hipótesis, estos resultados son similares a la investigación realizada por (Abdelnour et al., 2002) quienes con explantes evaluados a las nueve semanas observaron que la proliferación de brotes con BAP al $0,5\text{ mg L}^{-1}$ fue el mejor tratamiento en cuanto a la aparición nuevas yemas, brotes con mayor longitud en comparación con los otros tratamientos.

En este tratamiento no se presentó incidencia de contaminación por hongos y bacterias sin embargo el efecto de la clorosis fue de un 40% haciendo inviables a los explantes para posteriores etapas de micropropagación. Este efecto pudo estar relacionado con las condiciones del medio de cultivo, lo que concuerda con lo manifestado por Schalpem y Pierik (1997) que indican que los compuestos inorgánicos en el agar y la interacción tejido, medio y agar también originan clorosis o necrosis en los explantes.

Los brotes obtenidos en esta fase no fueron de gran longitud por lo que dificultaron su separación posterior para pasar a su desarrollo.

C. Fase de enraizamiento

La falta de raíces desarrolladas *in vitro* en la mayoría de los tratamientos puede estar relacionada con la baja tasa de supervivencia de las plántulas cultivadas *in vitro* (Pillai y Hildebrandt, 1968).

Estos resultados difieren de los obtenidos por Torres *et al s/f.* quienes probaron por separado las auxinas manifestando que tanto el AIB como el ANA suministrados individualmente a una concentración de 0.25 mg L^{-1} producen un alto porcentaje de plantas enraizadas alcanzando hasta un 90%. Se logró la exitosa aclimatación de las plantas enraizadas con un porcentaje de supervivencia mayor al 80%.

La micropropagación mediante la inducción de yemas axilares y apicales derivados de plántulas de *Crescentia cujete* ha sido efectiva presentando un 98% de brotación a partir de plántulas germinadas *in vitro*. Sin embargo, la inducción de brotes a partir de tallos y hojas hasta ahora no ha dado resultados positivos. Asimismo para esta especie resultó una limitante significativa el alto índice de contaminación por bacterias en los explantes empleados (Hernandez *et al., s/f*).

Esta investigación coincide con la nuestra donde utilizamos yemas axilares similares, tampoco obtuvimos el mayor porcentaje de supervivencia requerido, que permita a lo posterior su enraizamiento, al igual que investigaciones anteriores tuvimos un limitante que fue la contaminación.

La producción de callo se vio incrementada por la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo Aunque la presencia de citoquininas aumenta los niveles de oxidación (George, 1996), ya que una vez que comienza la división celular la oxidación se reduce debido a que el proceso de exudado de sustancias fenólicas se ve inhibido. Existía también una relación negativa entre la presencia de oxidación y la producción de callo. Esto puede confirmar la teoría sugerida anteriormente acerca de la inhibición del crecimiento del callo por la presencia de oxidados fenólicos.

En nuestra investigación podemos observar en el (Anexo 4) que en el tratamiento 1 con 1 mg L^{-1} AIB + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA y el tratamiento 2 con 1 mg L^{-1} AIB + 1 mg L^{-1} ANA son los mejores con respecto a la proliferación de callos y raíces, sin embargo los dos tuvieron problemas de supervivencia debido que mostraron explantes contaminados y cloróticos, característica que provoca la muerte posterior de la planta, similar problema lo obtuvo Pérez (2001) en su investigación.

A pesar de no existir diferencias significativas, el tratamiento 1 mostró el promedio más alto de explantes con raíz teniendo un promedio de 0,1 en la concentración 1 mg L^{-1} AIB + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ANA, una longitud alcanzada de 0,20 mm promedio de explantes y una supervivencia del 25% de explantes. Se acepta la hipótesis planteada para esta fase, el efecto de la contaminación tanto por bacterias como por hongos fue persistente en esta fase con un promedio de 60% y 5% respectivamente.

Estos resultados coinciden con Cruz (2001). Con lo que él manifiesta de rechazar la hipótesis que a mayor concentración de ANA y AIB se obtiene una alta proporción de plantas enraizadas.

Los resultados obtenidos de nuestra investigación en la fase de enraizamiento tiene una similitud con respecto a la de Pérez (2001) donde manifiesta que el mayor porcentaje de explantes enraizadas y numero de esta, lo obtuvo con la concentración más baja de auxinas de 1 mg L^{-1} AIB y ANA $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

El principal limitante del cultivo de cedro es la alta incidencia de contaminantes, hongos y bacterias, durante la introducción *in vitro*. Los resultados obtenidos en esta fase sugieren que se requiera estudiar mejor sus requerimientos *in vitro* para optimizar el proceso de propagación.

VI. CONCLUSIONES

- Se logró establecer un protocolo para la micropropagación del cedro mediante yemas terminales de plantas jóvenes obtenidas del invernadero de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, mediante los siguientes pasos:
- En la desinfección de los explantes de cedro (*Cedrela odorata* L.) en la fase de establecimiento se obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia fue con la concentración de bicloruro de mercurio más gentamicina.
- Para la proliferación de brotes en cedro (*Cedrela odorata* L.), se obtuvo con la citoquininas BAP.
- Entre menor es la concentración de citoquininas (BAP) menor es la contaminación, pero mayor será la clorosis en los explantes.
- La obtención de callos y raíz se obtuvo en la concentración más baja con 1 mg L⁻¹ AIB + 0,5mg L⁻¹ ANA.
- Entre más bajas son las concentraciones de las Auxinas (AIB y ANA) existe una mayor proliferación de callos que después darán paso al enraizamiento de los explantes.

VII. RECOMENDACIONES

1. Utilizar para la proliferación de brotes en el cedro (*Cedrela odorata* L.) la hormona bencilaminopurina (BAP) en concentraciones más bajas.
2. Para la inducción de raíces en cedro (*Cedrela odorata* L.) se debe utilizar las interacciones de las auxinas, ANA Y AIB a bajas concentraciones realizando diferentes ensayos.
3. Realizar investigaciones específicas sobre los contaminantes presentes en el cedro para obtener un mayor índice de supervivencia.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A. ; Ramirez, C. ; Engelmann, F. 2002 Micropropagación de Chayote (*Sechium edule* Jacq. SW.) A partir de brotes vegetativos. Alajuela, Costa Rica PP. 147 – 151.
- Barnett, H.; Barry, I.; Hunter B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition, New York, USA P. 106-122.
- Bascopé, R.L.; Bernardi, L.; Lamprecht, H.; Martinez, P. 1957. El género *Cedrela* en América. Descripciones de Arboles Forestales No 2. Inst. For. Latinoam. de Inv. y Capacit, Mérida, Venezuela. p 1–22.
- Betancourt, B. 1983. Silvicultura especial de árboles Maderables Tropicales. P. 92-109, La Habana, Cuba. Editorial Científico Técnica.
- Biasi, L.; Koller, O. y Kämpf, A. 1994. Micropropagacão do abacateiro Ouro verde a partir de segmentos nodais. Pesq. Agrop. Brazill. 29 : 1051-1058
- Borges. 2004. Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth Biotecnología Vegetal. 4: 237 – 242.
- Buchinger, M.y Falcone, R. 1957. *Cedrela mexicana* M. J. Roemer, especie Nueva para la flora argentina. Darwiniana, 11: 209-212.
- Cassells, A.; Croke, J.; Doyle, B. 1997. Evaluation of image analysis, flow cytometry, and RAPD analysis for the assessment of somaclonal variation and induced mutation in tissue culture-derived *Pelargonium* plants. Journal of Applied Botany 71: 125-130.
- Cassells, A.; Minas, G. 1983. Beneficially-infected and chimeral pelargonium: implications for micropropagation by meristem and explant culture. Acta Horticulturae 131: 287-297.

- Cruz, N. 2001. Micropropagación clonal *in vitro* de *Tectona grandis* L. (TECA). Tesis de Grado. UTEQ. Quevedo. Ecuador. 1-38 pp
- Debergh, Maene L. (1977). Rapid clonal propagation of pathogen- free pelargonium plants starting from shoot tips apical meris tems. Acta. Horticulturae 78: 449-454.
- Debergh, P.; Read, P. 1991. Micropropagation. En: Micropropagation: Technology and Application. Ed. H. DPCyZR. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp.1-13.
- George, E. 1996. Herbaceous ornamentals. Pelargonium spp. En: Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practice. Ed. . Exegenetics Ltd., Edington, Wilts. England. pp.851-855
- George, E. 1996. Herbaceous ornamentals. Pelargonium spp. En: Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practice. Ed. . Exegenetics Ltd., Edington, Wilts. England. pp.851-855.
- Hernández, B.; González, J.; Díaz, R.; Peña, Y. s/f. Mejoramiento de un sistema de micropropagación por organogénesis en cedro rojo (*cedrela odorata*) y jicaro (*crescentia cujete*) mediante el tamizaje fino de distintos explantes. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Consultado 7 jun 2011. (en línea). Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_II/Carteles/CII-19.pdf
- Hildebrandt, V.; Harney, P. 1988. Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium x hortorum*, Bailey 'Sprinter Scarlet'. Journal of Horticultural Science 63: 651-675

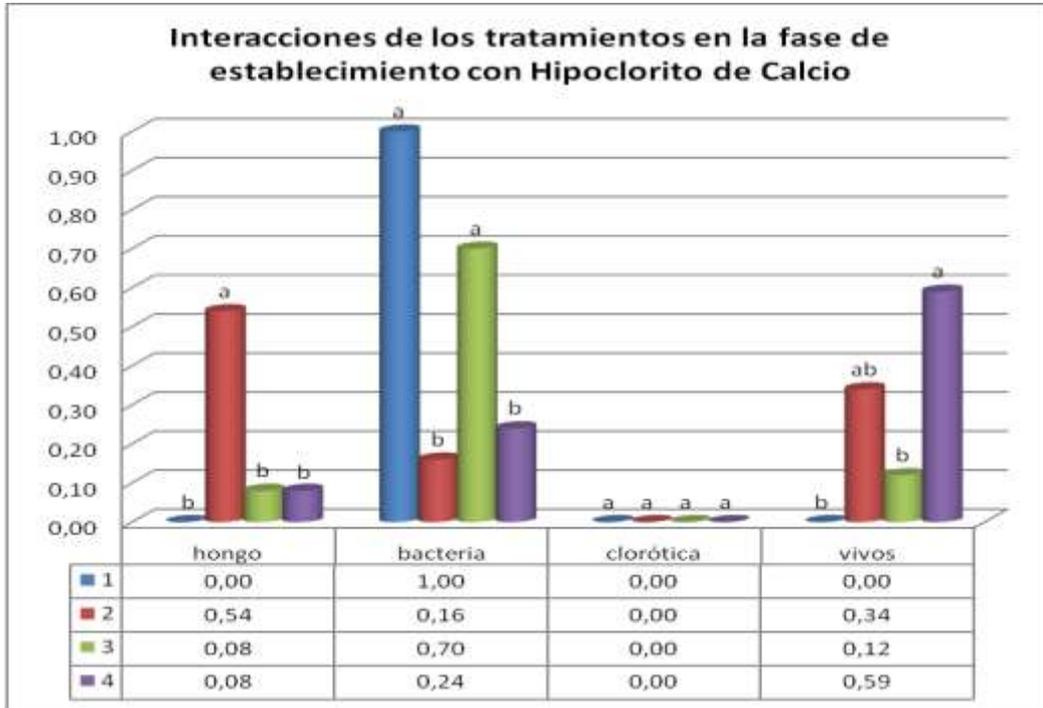
- Hu, C. y Wang, J. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. En: Handbook of Plant cell. Evans, D:A.; Ammirato, P.V.; Yaderma Y. (eds) pp 256-290.
- Huchmut, R.; Manso, D.; y M. Hernández. 1974. “Parásitos de plagas forestales en Cuba, conectados en su hospedante durante los años 1969 – 1974.” Baracoa, cuatro (1-2): 46-53.
- Hueck, K. y Lumprecht, H.. 1959.“Estados Morfológicos y Ecológicos sobre la germinación y desarrollo en la primera juventud de especies arbóreas en Venezuela.” IFLAIC, 3: 1-22.
- Huguet, L. y Verduzco, I. 1956. “Economía forestal de Yucatán.” En: Aprovechamiento de los Recursos Forestales. Departamento de Investigaciones Industriales, Banco de México S.A., México D.F. pp. 201-310.
- Jiménez, E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. V. 1. GEO. Cuba. pp. 13-24.
- Lamb, G. 1969. Especies maderables de crecimiento rápido en la tierra baja tropical En: Bol. Inst. Forestal Latinoamericana. Mérida, Venezuela. 30 -31/15-54.
- Little & Dixon. 1969. Arboles comunes de la provincia de Esmeraldas Ecuador (FAO). Roma, Reimpreso por el cuerpo de Paz. 502 pag.
- Murashige, T; Skoogn F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:53-58.
- Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Ganadería (FAO). 1999. Situación de los bosques del mundo. Informe Técnico. 149 pag.

- Pellegrineschi A, Davolio Mariani, O. 1996. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of scented geranium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 79-86.
- Pennington, T. y Sarukhán K. 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México. INIF-FAO-SAG. México. 413 p.
- Pérez, J. 2001. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de Cedrela odorata L. CATIE Turrialba, Costa Rica.
- Pierik, R. 1988. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores, 3rd edn. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 326 pp.
- Pillai, S.; Hildebrandt, A. 1968. *In vitro* differentiation of geranium (Pelargonium x hortorum Bailey) plants from apical meristems. Phytion (Buenos Aires) 25: 81-87.
- _____; _____. 1968. Origin and development of geranium callus from stem tip, internode, pith and petiole *in vitro*. Phytion (Buenos Aires) 25: 89-95.
- _____; _____. 1969. Induced differentiation of geranium plants from differentiated callus *in vitro*. American Journal of Botany 56: 52-58.
- Quijada, R. y Gutierrez, V. 1971 “Estudios sobre la propagación vegetativa de especies forestales venezolana”. Revista Forestal Venezolana; 14: 43-56.
- Ramírez, M.; Sierralta, S. y Urdaneta, A. 1999. Evaluation of surface disinfectants on the *in vitro* establishment of Psidium guajava L. and Psidium friedrichsthalianum (Berg) Nierdz. Plant Science, 156:125-135.

- Roig, J. 1946. El cedro: Estudio ecológico de las plantaciones existentes y recomendaciones para la propagación y el cultivo comercial. boletín 64, Est. Exp. Agr., Santiago de las Vegas, Cuba. 48 pp.
- Sierra, A, O Concepción R Trujillo y M Daquinta (1999) Optimación de la metodología de desinfección de yemas apicales de *Philodendron xanadu*. Taller internacional de Biotecnología. vegetal "Bioveg".2001, Libro de reportes cortos, Ciego de Ávila, Cuba p 99.
- Skirvin, R. Janick, J. 1976. Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 281-290.
- Smith, E. 1954. *The forest of Cuba*. Ed.: María Moors Cabot. Foundation, Cienfuegos, Cuba 98 pp.
- Torres, A.; López, A.; Villanueva, J.; Mata, M.; Murguía, J.; Solís, L. 2011. Micropropagación de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) como herramienta para su manejo. 4 p.

VIII. ANEXOS.

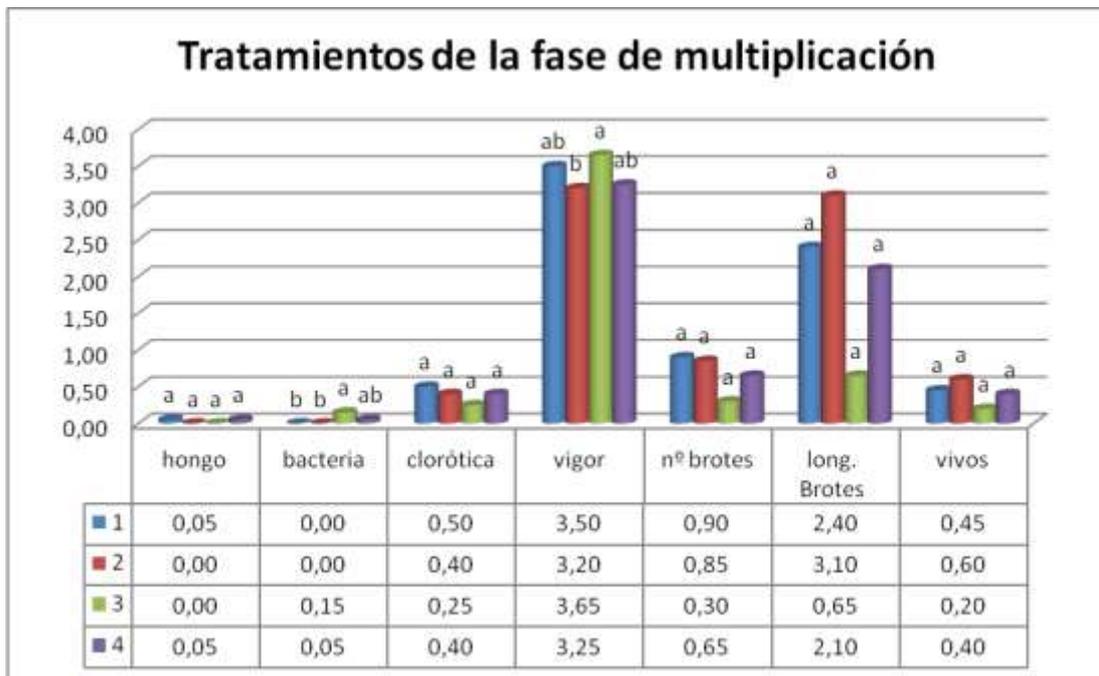
Anexo 1. Interacción de los factores Hipoclorito de calcio por gentamicina en la fase de establecimiento para el cultivo *in vitro* de cedro.



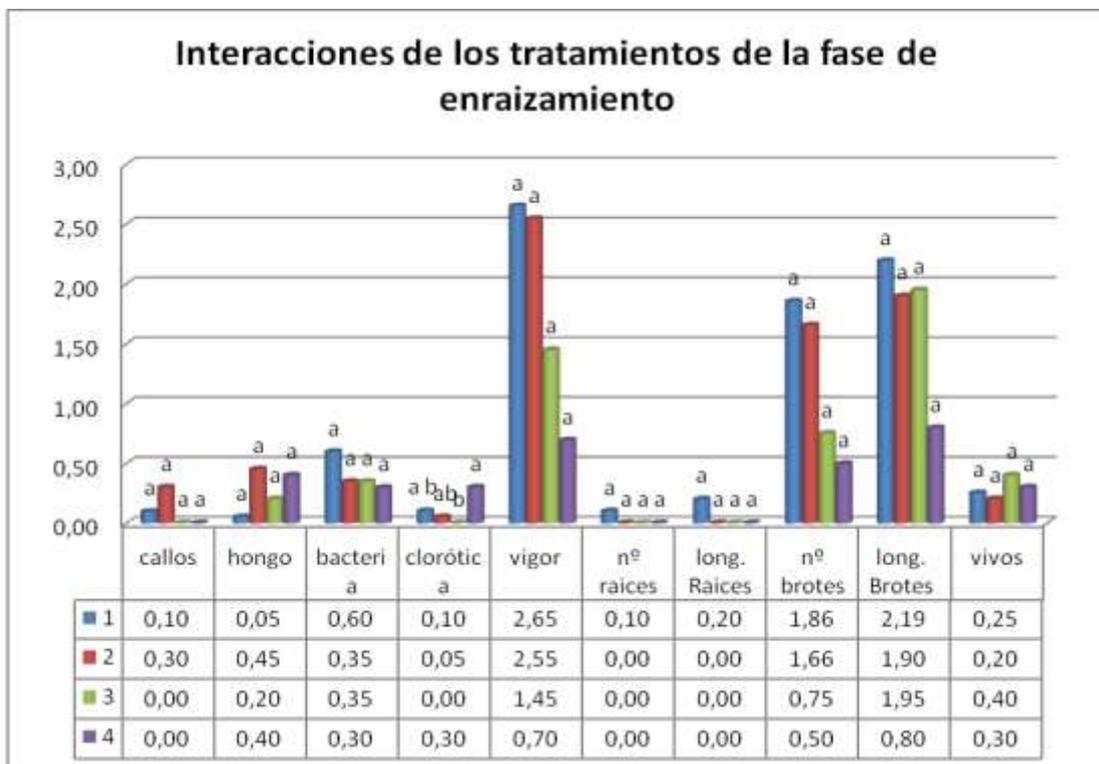
Anexo 2. Interacción de los factores bicloruro de mercurio por gentamicina en la fase de establecimiento para el cultivo *in vitro* de cedro.



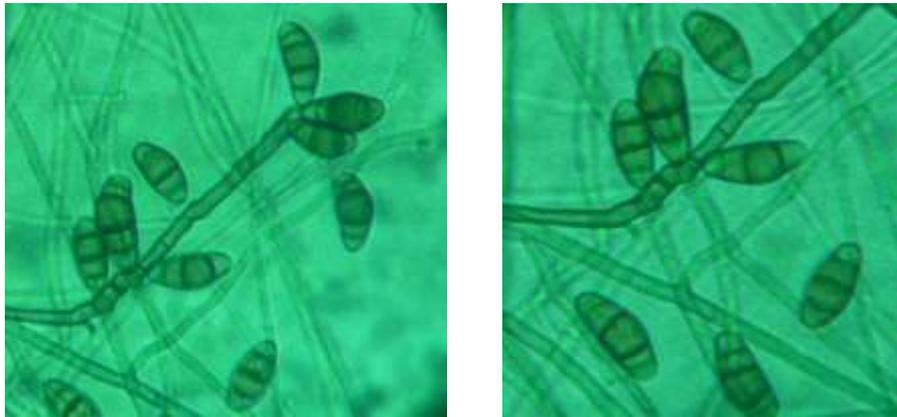
Anexo 3. Tratamientos y variables evaluadas en la fase de multiplicación de cedro.



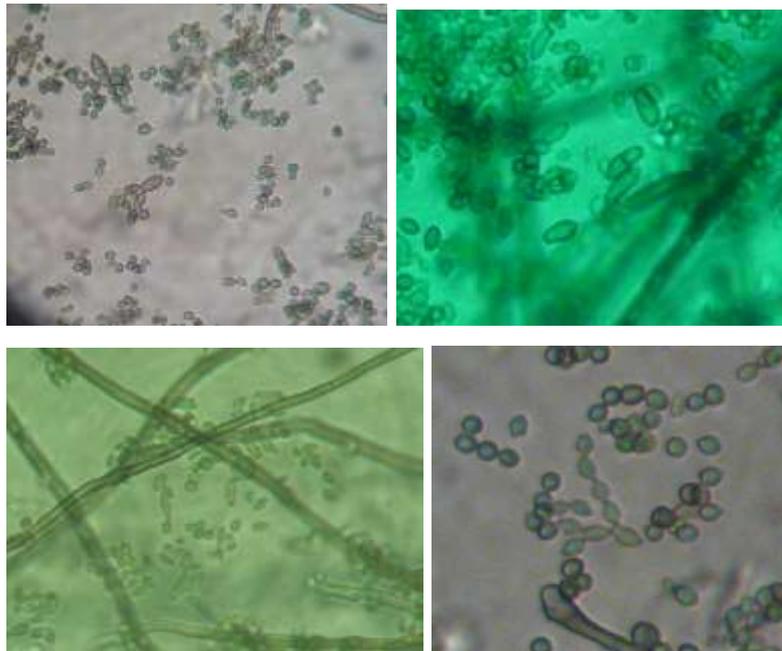
Anexo 4. Interacción de los factores Acido indolbutírico (AIB) con el Acido naftaleno acético (ANA) en la fase de enraizamiento



Anexo 5. Identificación de hongos presentes en medio de cultivos perteneciente a la fase de multiplicación.



Hongos del genero *Curvularia* identificados mediante claves taxonómicas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal.



Hongos del genero *Cladosporium* identificados en distintos tubos de ensayo en la fase de multiplicación mediante claves taxonómicas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Vegetal.

Anexo 6. Análisis de varianza de la fase de establecimiento con hipoclorito de calcio.

Análisis de varianza de la variable de contaminación por hongos

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.044	0.044	26.4600	0.0002
4	Factor B	1	0.096	0.096	57.6600	0.0000
6	AB	1	0.096	0.096	57.6600	0.0000
-7	Error	12	0.020	0.002		
TOTAL		15	0.256			

Análisis de varianza de la variable de contaminación por bacterias

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.006	0.006	0.8890	
4	Factor B	1	0.413	0.413	61.0999	0.0000
6	AB	1	0.032	0.032	4.6633	0.0518
-7	Error	12	0.081	0.007		
TOTAL		15	0.531			

Análisis de varianza de la variable clorótica

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.000	0.000	0.0000	
4	Factor B	1	0.000	0.000	0.0000	
6	AB	1	0.000	0.000	0.0000	
-7	Error	12	0.000	0.000		
TOTAL		15	0.000			

Análisis de varianza de la variable vivos

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.044	0.044	4.3324	0.0595
4	Factor B	1	0.207	0.207	20.3381	0.0007
6	AB	1	0.003	0.003	0.2972	
-7	Error	12	0.122	0.010		
TOTAL		15	0.376			

Anexo 7. Análisis de varianza de la fase de establecimiento con bicloruro de mercurio.

Análisis de varianza de la variable contaminación por hongos

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.001	0.001	1.0000	0.3370
4	Factor B	1	0.001	0.001	1.0000	0.3370
6	AB	1	0.001	0.001	1.0000	
-7	Error	12	0.008	0.001		
TOTAL		15	0.009			

Análisis de varianza de la variable contaminación por bacterias

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.090	0.090	19.2171	0.0009
4	Factor B	1	0.203	0.203	43.2384	0.0000
6	AB	1	0.221	0.221	47.1673	0.0000
-7	Error	12	0.056	0.005		
TOTAL		15	0.570			

Análisis de varianza de la variable clorótica

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.042	0.042	3.0000	0.1089
4	Factor B	1	0.042	0.042	3.0000	0.1089
6	AB	1	0.042	0.042	3.0000	0.1089
-7	Error	12	0.168	0.014		
TOTAL		15	0.294			

Análisis de varianza de la variable vivos

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.000	0.000	0.0388	
4	Factor B	1	0.017	0.017	1.6408	0.2244
6	AB	1	0.032	0.032	3.1456	0.1015
-7	Error	12	0.124	0.010		
TOTAL		15	0.173			

Anexo 8. Análisis de varianza en la fase de multiplicación.

Análisis de varianza de la variable contaminación por hongos

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
	3	0.004	0.001	0.667	
	12	0.025	0.002		
Total	15	0.030			

Análisis de varianza de la variable contaminación por bacterias

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
	3	0.025	0.008	4.000	0.0346
	12	0.025	0.002		
Total	15	0.051			

Análisis de varianza de la variable clorótica

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
	3	0.038	0.013	1.366	0.3000
	12	0.110	0.009		
Total	15	0.148			

Análisis de varianza de la variable vigor

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
	3	0.034	0.011	4.320	0.0277
	12	0.031	0.003		
Total	15	0.065			

Análisis de varianza de la variable número de brotes

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
	3	0.209	0.070	2.384	0.1204
	12	0.351	0.029		
Total	15	0.560			

Análisis de varianza de la variable longitud de brotes

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
	3	1.491	0.497	2.874	0.0804
	12	2.075	0.173		
Total	15	3.566			

Análisis de varianza de la variable vivos

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
	3	0.094	0.031	2.199	0.1410
	12	0.170	0.014		
Total	15	0.264			

Anexo 9. Análisis de varianza de la fase de enraizamiento.

Análisis de varianza de la variable callos

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.058	0.058	8.0000	0.0152
4	Factor B	1	0.014	0.014	2.0000	0.1827
6	AB	1	0.014	0.014	2.0000	0.1827
-7	Error	12	0.086	0.007		
	TOTAL	15	0.173			

Análisis de varianza de la variable contaminación por hongos

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.004	0.004	0.2902	
4	Factor B	1	0.112	0.112	9.0474	0.0109
6	AB	1	0.016	0.016	1.2597	0.2837
-7	Error	12	0.149	0.012		
	TOTAL	15	0.280			

Análisis de varianza de la variable contaminación por bacteria

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.023	0.023	0.6527	
4	Factor B	1	0.024	0.024	0.6970	
6	AB	1	0.011	0.011	0.3198	
-7	Error	12	0.414	0.034		
	TOTAL	15	0.471			

Análisis de varianza de la variable clorótica

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.008	0.008	1.2205	0.2909
4	Factor B	1	0.023	0.023	3.7074	0.0782
6	AB	1	0.047	0.047	7.5413	0.0177
-7	Error	12	0.075	0.006		
	TOTAL	15	0.153			

Análisis de varianza de la variable vigor

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	1.061	1.061	18.1921	0.0011
4	Factor B	1	0.109	0.109	1.8674	0.1968
6	AB	1	0.073	0.073	1.2501	0.2854
-7	Error	12	0.700	0.058		
	TOTAL	15	1.943			

Análisis de varianza de la variable número de raíces

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.004	0.004	1.0000	
4	Factor B	1	0.004	0.004	1.0000	
6	AB	1	0.004	0.004	1.0000	
-7	Error	12	0.043	0.004		
TOTAL		15	0.054			

Análisis de varianza de la variable longitud de raíces

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.016	0.016	1.0000	
4	Factor B	1	0.016	0.016	1.0000	
6	AB	1	0.016	0.016	1.0000	
-7	Error	12	0.195	0.016		
TOTAL		15	0.244			

Análisis de varianza de la variable número de brotes

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.797	0.797	30.2801	0.0001
4	Factor B	1	0.035	0.035	1.3364	0.2702
6	AB	1	0.004	0.004	0.1485	
-7	Error	12	0.316	0.026		
TOTAL		15	1.151			

Análisis de varianza de la variable longitud de brotes

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.238	0.238	7.8332	0.0161
4	Factor B	1	0.273	0.273	8.9984	0.0111
6	AB	1	0.114	0.114	3.7544	0.0766
-7	Error	12	0.364	0.030		
TOTAL		15	0.989			

Análisis de varianza de la variable vivos

Valor	Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
2	Factor A	1	0.018	0.018	1.3696	0.2646
4	Factor B	1	0.008	0.008	0.5973	
6	AB	1	0.001	0.001	0.0590	
-7	Error	12	0.154	0.013		
TOTAL		15				

Anexo 10. Elementos que forman el medio de cultivo para especies leñosas.

VITAMINAS DE MOREL		
NOMBRE REACTIVO	FORMULA	Cant. Pesar grs
Pant. De Calcio	$C_9H_{16}NO_3 \cdot 1/2Ca$	0.05
Acido Nicotínico	$C_6H_5NO_2$	0.05
Tiamina	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	0.05
Piridoxina	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	0.05
Biotina	$C_{10}H_9N_5O$	0.01*
Myo-inositol		5
*Preparar aparte		

FUENTES DE HIERRO		
NOMBRE REACTIVO	FORMULA	Cant. Gramos
Disodium Ethylenediaminetetracetico	Na_2EDTA	3.73
Sulfato Ferroso	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.78
Disolver em 500cc água destilada		

MACRONUTRIENTES		
NOMBRE REACTIVO	FORMULA	Cant. Pesar en grs
Nitrato de Amonio	NH_4NO_3	33
Nitrato de Potacio	KNO_3	38
Sulfato de Magnésio	$MgSO_4 \cdot H_2O$	7.4
Fosfato de Potacio	KH_2PO_4	3.4
Cloruro de Cálcio	$CaCl_2 \cdot H_2O$	8.8*
Disolver em 500cc de água destilada		
*Preparar aparte		

MICRONUTRIENTES		
N. Reactivo	Formula	Cant. Pesar gr
Acido Bórico	H_3BO_3	0.62
Sulfato de Magnesio	$MnSO_4 \cdot H_2O$	2.23
Sulfato de Zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.86
Yoduro de Potacio	KI	0.083
Molibdato de Sódio	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.025
Sulfato de Cobre	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0025
Cloruro de Cobre	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0025
Disolver em 5000 cc de agua destilada		
*Preparar aparte		

Anexo 11. Plantas seleccionadas de cedro (*Cedrela odorata* L.) de seis meses de edad y cortes de yemas terminales del invernadero de la UTEQ.



Figura 1. Plantas de cedro (*Cedrela odorata* L.)



Figura 2. Corte de yemas terminales

Anexo 12. Fase de establecimiento desinfección de los explantes de cedro (*Cedrela odorata* L.)



Figura 3. Yemas terminales en agua destilada



Figura 4. Peso de los desinfectantes de la fase de establecimiento.



Fig. 5. Desinfección de explantes

Anexo 13. Siembra de los explantes de cedro (*Cedrela odorata* L.) al medio de cultivo simple (Murashige y Skoog).



Figura 5. Siembra de yemas terminales en la cámara de Flujo



Figura 6. Medio de cultivo simple en tubos de ensayo.

Anexo 14. Fase de multiplicación transferencia de explantes al medio de cultivo con citoquinina Bencilaminopurina (BAP).

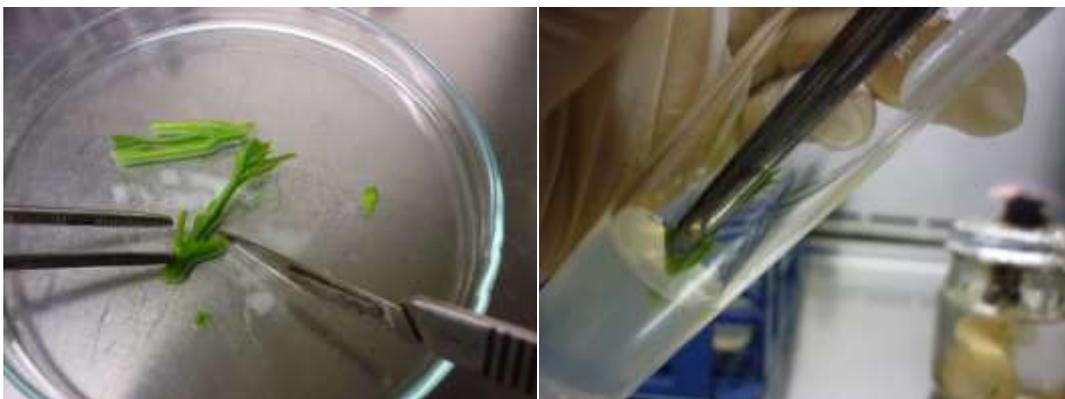


Figura 7-8. Transferencia de explantes al medio de cultivo con Citoquinina Bencilaminopurina (BAP).

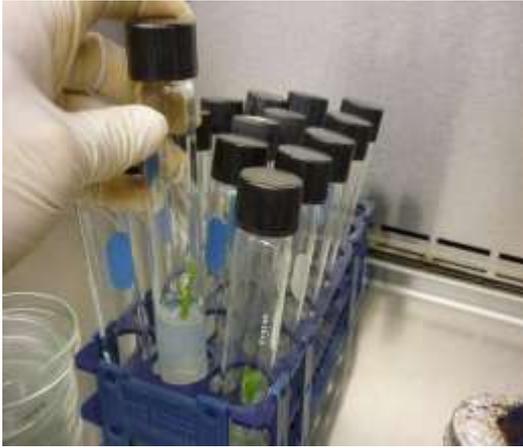


Fig. 9



Fig. 10



Fig. 11

Fig. 9-10-11. Vitroplantas de Cedro (*Cedrela odorata* L.) a los 30 días de ser transferido al medio de cultivo con la hormona citoquinina Bencilaminopurina (BAP)

ANEXO 15. Fase de enraizamiento transferencia de vitroplantas al medio de cultivo con las auxinas ácido indolbutírico (AIB) y ácido naftaleno acético.



Fig. 12. Vitroplanta con raíz.

Anexo 16. Costos en la fase de establecimiento *in vitro* con hipoclorito de calcio del cedro. Lab. de Biotecnología, UTEQ, Quevedo 2011

RUBRO	TRATAMIENTOS				TOTAL USD
	1	2	3	4	
COSTOS VARIABLES					
Materiales directos					
Reactivos					
Medio de cultivo Murashige skoog	23	23	23	23	92
Yemas	0,08	0,08	0,08	0,08	0,32
Hipoclorito de Calcio	0,76	0,76	1	1	3,52
SUBTOTAL					95,84
MATERIALES INDIRECTOS					
Agua destilada	0,10	0,10	0,10	0,10	0,40
Guantes	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
Mascarilla	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
Tween 80	0,07	0,07	0,07	0,07	0,28
Alcohol	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Otros gastos indirectos	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
Gentamicina	0	0,55	0	0,55	1,10
SUBTOTAL					3,78
SUMINISTROS					
Energía eléctrica	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Agua potable	0,03	0,03	0,03	0,03	0,12
SUBTOTAL					0,32
COSTOS FIJOS					
MANO DE OBRA DIRECTA					
Desinfección de Siembra y Control de Calidad	0,35	0,35	0,35	0,35	1,40
MANO DE OBRA INDIRECTA	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
DEPRECIACION Y MANTANIMIENTO					
Tubos de ensayo	1,10	1,10	1,10	1,10	4,40
Cajas petri	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Matraces	0,08	0,08	0,08	0,08	0,32
Pipetas	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Vasos de precipitación	0,27	0,27	0,27	0,27	1,08
Pinzas	0,04	0,04	0,04	0,04	0,16

Bisturí	0,25	0,25	0,25	0,25	1,00
Autoclave	0,74	0,74	0,74	0,74	2,96
Cámara de flujo laminar	3,20	3,20	3,20	3,20	12,80
Balanza	0,49	0,49	0,49	0,49	1,96
Agitador calentador	0,17	0,17	0,17	0,17	0,68
Peachímetro	0,44	0,44	0,44	0,44	1,76
Probetas	0,07	0,07	0,07	0,07	0,28
Edificio	0,80	0,80	0,80	0,80	3,20
SUBTOTAL					31,00
GASTOS ADMINISTRATIVOS					
Papelería	0,11	0,11	0,11	0,11	0,44
TOTAL DE INVERSIÓN					132,98

Anexo 17. Costos en la fase de establecimiento *in vitro* con bicloruro de mercurio del cedro. Lab. de Biotecnología, UTEQ, Quevedo 2011.

RUBRO	TRATAMIENTOS				TOTAL USD
	1	2	3	4	
COSTOS VARIABLES					
Materiales directos					
Reactivos					
Medio de cultivo Murashige skoog	23	23	23	23	92
Yemas	0,08	0,08	0,08	0,08	0,32
Bicloruro de Mercurio	0,07	0,07	0,07	0,07	0,28
SUBTOTAL					92,6
MATERIALES INDIRECTOS					
Agua destilada	0,10	0,10	0,10	0,10	0,40
Guantes	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
Mascarilla	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
Tween 80	0,07	0,07	0,07	0,07	0,28
Gentamicina	0,00	0,55	0,00	0,55	1,10
Alcohol	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Otros gastos indirectos	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
SUBTOTAL					3,78
SUMINISTROS					
Energía eléctrica	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Agua potable	0,03	0,03	0,03	0,03	0,12
SUBTOTAL					0,32

COSTOS FIJOS					
MANO DE OBRA DIRECTA					
Desinfección de Siembra y Control de Calidad	0,35	0,35	0,35	0,35	1,40
MANO DE OBRA INDIRECTA	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
DEPRECIACION Y MANTANIMIENTO					
Tubos de ensayo	1,10	1,10	1,10	1,10	4,40
Cajas petri	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Matraces	0,08	0,08	0,08	0,08	0,32
Pipetas	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Vasos de precipitación	0,27	0,27	0,27	0,27	1,08
Pinzas	0,04	0,04	0,04	0,04	0,16
Bisturí	0,25	0,25	0,25	0,25	1,00
Autoclave	0,74	0,74	0,74	0,74	2,96
Cámara de flujo laminar	3,20	3,20	3,20	3,20	12,80
Balanza	0,49	0,49	0,49	0,49	1,96
Agitador calentador	0,17	0,17	0,17	0,17	0,68
Peachímetro	0,44	0,44	0,44	0,44	1,76
Probetas	0,07	0,07	0,07	0,07	0,28
Edificio	0,80	0,80	0,80	0,80	3,20
SUBTOTAL					31,00
GASTOS ADMINISTRATIVOS					
Papelería	0,11	0,11	0,11	0,11	0,44
TOTAL DE INVERSIÓN					129,74

Anexo 18. Costos en la fase de multiplicación *in vitro* del cedro. Lab. de Biotecnología, UTEQ, Quevedo 2011.

RUBRO	TRATAMIENTOS				TOTAL USD
	1	2	3	4	
COSTOS VARIABLES					
Materiales directos					
Reactivos					
Medio de cultivo Murashige skoog	23	23	23	23	92
Brotos	1,40	1,40	1,40	1,40	5,60
BAP	0,06	0,13	0,19	0,25	0,63
SUBTOTAL					98,23

MATERIALES INDIRECTOS					
Agua destilada	0,10	0,10	0,10	0,10	0,40
Guantes	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
Mascarilla	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
Tween 80	0,07	0,07	0,07	0,07	0,28
Alcohol	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Otros gastos indirectos	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
SUBTOTAL					2,68
SUMINISTROS					
Energía eléctrica	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Agua potable	0,03	0,03	0,03	0,03	0,12
SUBTOTAL					0,32
COSTOS FIJOS					
MANO DE OBRA DIRECTA					
Desinfección de Siembra y Control de Calidad	0,35	0,35	0,35	0,35	1,40
MANO DE OBRA INDIRECTA	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
DEPRECIACION Y MANTANIMIENTO					
Tubos de ensayo	1,10	1,10	1,10	1,10	4,40
Cajas petri	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Matraces	0,08	0,08	0,08	0,08	0,32
Pipetas	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Vasos de precipitación	0,27	0,27	0,27	0,27	1,08
Pinzas	0,04	0,04	0,04	0,04	0,16
Bisturí	0,25	0,25	0,25	0,25	1,00
Autoclave	0,74	0,74	0,74	0,74	2,96
Cámara de flujo laminar	3,20	3,20	3,20	3,20	12,80
Balanza	0,49	0,49	0,49	0,49	1,96
Agitador calentador	0,17	0,17	0,17	0,17	0,68
Peachímetro	0,44	0,44	0,44	0,44	1,76
Probetas	0,07	0,07	0,07	0,07	0,28
Edificio	0,80	0,80	0,80	0,80	3,20
SUBTOTAL					31,00
GASTOS ADMINISTRATIVOS					
Papelería	0,11	0,11	0,11	0,11	0,44
TOTAL DE INVERSIÓN					134,27

Anexo 19. Costos en la fase de enraizamiento *in vitro* del cedro. Lab. de Biotecnología, UTEQ, Quevedo 2011.

RUBRO	TRATAMIENTOS				TOTAL USD
	1	2	3	4	
COSTOS VARIABLES					
Materiales directos					
Reactivos					
Medio de cultivo W P M	23	23	23	23	92
Explantos	2,40	2,40	2,40	2,40	9,6
AIB	0,12	0,12	0,18	0,18	0,60
ANA	0,06	0,12	0,06	0,12	0,36
SUBTOTAL					102,56
MATERIALES INDIRECTOS					
Agua destilada	0,10	0,10	0,10	0,10	0,40
Guantes	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
Mascarilla	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
Tween 80	0,07	0,07	0,07	0,07	0,28
Alcohol	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Otros gastos indirectos	0,15	0,15	0,15	0,15	0,60
SUBTOTAL					2,68
SUMINISTROS					
Energía eléctrica	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Agua potable	0,03	0,03	0,03	0,03	0,12
SUBTOTAL					0,32
COSTOS FIJOS					
MANO DE OBRA DIRECTA					
Desinfección de Siembra y Control de Calidad	0,35	0,35	0,35	0,35	1,40
MANO DE OBRA INDIRECTA	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
DEPRECIACION Y MANTENIMIENTO					
Tubos de ensayo	1,10	1,10	1,10	1,10	4,40
Cajas petri	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Matraces	0,08	0,08	0,08	0,08	0,32
Pipetas	0,05	0,05	0,05	0,05	0,20
Vasos de precipitación	0,27	0,27	0,27	0,27	1,08
Pinzas	0,04	0,04	0,04	0,04	0,16
Bisturí	0,25	0,25	0,25	0,25	1,00

Autoclave	0,74	0,74	0,74	0,74	2,96
Cámara de flujo laminar	3,20	3,20	3,20	3,20	12,80
Balanza	0,49	0,49	0,49	0,49	1,96
Agitador calentador	0,17	0,17	0,17	0,17	0,68
Peachímetro	0,44	0,44	0,44	0,44	1,76
Probetas	0,07	0,07	0,07	0,07	0,28
Edificio	0,80	0,80	0,80	0,80	3,20
SUBTOTAL					31,00
GASTOS ADMINISTRATIVOS					
Papelería	0,11	0,11	0,11	0,11	0,44
TOTAL DE INVERSIÓN					138,60