

AGRADECIMIENTOS

Dejo en constancia mi agradecimiento a las instituciones y personas que me ayudaron a la realización de la presente tesis:

- A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo
- Ing. Zootecnista Roque Vivas Moreira, M.Sc. Rector de la UTEQ.
- Ing. For. Antonio Véliz Mendoza, Decano de la Facultad de Ciencias Ambientales.
- Ing. For. Gary Ramírez Huila, Subdecano de la Facultad de Ciencias Ambientales.
- Ing. Fidel Troya Zambrano, Presidente del Tribunal de Tesis.
- Ing. Enrique Nieto Rodríguez, Ph, D. Miembro del Tribunal de Tesis.
- Ing. Gomezcoello Zúñiga, Miembro del Tribunal de Tesis.
- M.Sc. Mercedes Carranza Patiño, Director de Tesis, por impartir sus conocimientos, en el trabajo de investigación.
- Ing. Washington Mora, encargado del Laboratorio de Microbiología.
- Ing. Oscar Prieto, Investigador del Laboratorio de Microbiología.
- Ing. Edwin Jiménez, Docente de la Facultad de Ciencias Ambientales.
- Egdo. Eduardo Solís, ayudante de Laboratorio de Biotecnología

- A todos los Docentes de la Facultad de Ciencias Ambientales por educarme y guiarme en nuestra preparación como futuro profesional.
- A Dios sobre todo porque sin él no se hace posible nada en nuestras vidas.
- A mis queridos padres a mis hermanos y mis adorables sobrinos que siempre los tengo presente en mi mente y mi corazón.
- Finalmente quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que de alguna forma colaboraron en la culminación de la presente investigación.

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico al ser más hermoso y sublime que existe para mí en la tierra que es mi adorada madrecita, a pesar que la tengo muy lejos de distancia le agradezco a ella por su apoyo constante e incondicional. A sus concejos, su esmero por hacer de mí un gran ser humano y un buen profesional a futuro, a su dedicación por enseñarme buenos valores desde el momento que nací. Por su fortaleza a las adversidades de la vida que en ciertos momentos nos tocó vivir, donde a veces hizo tanto de padre y madre a la vez, supo guiarnos tanto a mí como a mi hermana.

Madre este trabajo va dedicado para Ud. Con mucho cariño por ser la persona que siempre ha estado conmigo y me ha iluminado por el buen camino ! Te amo madre querida ;

RESUMEN

Por el alto valor comercial del cedro (*Cedrela odorata* L.) ha llevado a taladores ilegales a extraer en forma masiva deforestando bosques poniendo en peligro la extinción de esta especie forestal, debido que en nuestro País no existen programas de mejora y conservación del cedro por tal razón nos ha motivado para realizar la presente investigación utilizando la biotecnología como una herramienta factible en cuanto a la propagación, considerando aspectos fenológicos y así contribuir al medio ambiente, especialmente al campo forestal.

En la actualidad la biotecnología es una ayuda de mucha importancia para mitigar los problemas con especies en peligro de extinción.

Esta investigación se la realizó en el laboratorio de biotecnología de la UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO, ubicado en la provincia de los Ríos, cantón Quevedo.

El objetivo de esta investigación fue establecer la metodología para la multiplicación *in vitro* vía organogénesis directa del cedro, así como determinar el mejor protocolo de desinfección de los explantes para la fase de establecimiento, encontrar la mejores concentraciones de hormonas del tipo citoquininas y auxinas, tanto para la proliferación de brotes, y enraizamiento respectivamente.

Los explantes fueron extraídos de yemas axilares de plantas jóvenes que se encuentran ubicadas en el invernadero de la UTEQ previamente seleccionadas por sus características fenológicas para luego ser establecidas, por medios de procesos físicos y después ser llevados a sus respectivos medios de cultivo.

En la fase de establecimiento se realizaron dos ensayos previos a la fase de multiplicación. En el primero se utilizó hipoclorito de calcio con las concentraciones de 2 y 2,5 g L⁻¹ más gentamicina en una concentración de 0 y 10 mg L⁻¹ en el medio de cultivo simple (Murashige y Skoog 1962).

En el segundo se utilizó bicloruro de mercurio al 25% en sus concentraciones con un tiempo de inmersión de los explantes de 8 y 15 minutos más gentamicina en una concentración de 0 y 10 mg L⁻¹. Los explantes fueron sembrados en el mismo medio del ensayo anterior.

El mejor tratamiento a los 21 días de haber sembrado los explantes en el medio de cultivo simple fue con la concentración de bicloruro de mercurio obteniendo un 100% de sobrevivencia libres de contaminación para ser transferido a la fase de multiplicación.

En la fase de multiplicación se utilizó el medio de cultivo (Murashige y Skoog 1962). Más la auxina BAP con diferentes concentraciones (0.25, 0.50, 0.75, 1 mg L⁻¹) donde obtuvimos el mayor número de brotes por explante, longitud y supervivencia en la concentración de 0.50 mgL⁻¹BAP.

Para la fase de enraizamiento se utilizó el medio de cultivo WPM con los nitratos al 50% más 30 g L⁻¹ de sacarosa. Transferimos a este medio los explantes procedentes de la fase anterior que contenía auxinas con sus respectivas concentraciones tanto para AIB (1 y 1,5 mg L⁻¹) y ANA (0,5 y 1 mg L⁻¹) donde se evaluó la inducción de callos, longitud de raíz y número de raíces por explante, a través de la interacción de las auxinas 1 mg L⁻¹AIB + 0,5 mg L⁻¹ANA.

ABSTRACT

Because of the high commercial value of the cedar (*Cedrela odorata* L.) has led to illegal loggers to extract massively deforested forests, threatening the extinction of this tree species, because in our country there are no programs for improvement and conservation of the cedar for that reason has motivated us to conduct this research using biotechnology as a possible tool in the spread, considering phenological aspects and contribute to the environment, especially in forestry.

Today biotechnology is a very important help to mitigate the problems with endangered species.

This research is performed in the laboratory of biotechnology QUEVEDO State Technical University, located in the province of Los Rios, Quevedo Canton.

The objective of this research was to establish the methodology for *in vitro* propagation via direct organogenesis cedar, as well as determine the best protocol for disinfection of explants for the establishment phase, finding the best concentrations of both hormones for shoot proliferation and rooting.

The explants were extracted from axillaries buds of young plants which are located in the greenhouse of the previously selected by UTEQ phenological characteristics and then be established by means of physical processes and then be taken to their respective culture media.

In the establishment phase two trials were conducted prior to the multiplication phase. The first used calcium hypochlorite with concentrations of 2 and 2.5 g L⁻¹ plus gentamicin at a concentration of 0 and 10 mg L⁻¹ in the simple culture medium (Murashige and Skoog 1962).

In the second bichloride of mercury was used to 25% in their concentrations with a time of immersion of the explants 8 and 15 minutes plus gentamicin at a concentration of 0 and 10 mg L⁻¹. The explants were planted in the same half of the previous test.

The best treatment at 21 days after seeding the explants in the culture medium was simple with the concentration of mercury bichloride of obtaining a 100% survival free of contamination to be transferred to the multiplication phase.

In the multiplication phase, we used the culture medium (Murashige and Skoog 1962) Auxin plus BAP at different concentrations (0.25, 0.50, 0.75, 1 mg L⁻¹) where we got the highest number of shoots per explants, length and survival in the concentration BAP 0.50 mg L⁻¹.

For the rooting phase was used WPM medium with nitrates 50% plus 30 g L⁻¹ sucrose. We transferred to this medium of explants from the previous phase containing their respective auxins both AIB concentrations (1 and 1.5 mg L⁻¹) and ANA (0.5 and 1 mg L⁻¹) that evaluate induction callus, root length and number of roots per explant, through the interaction of auxin 1 mg L⁻¹AIB + 0.5 mg L⁻¹ANA.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Justificación	2
B. Objetivos	2
1. General.....	2
2. Específicos	2
C. Hipótesis.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
A. Origen y distribución de <i>Cedrela odorata</i> L.....	4
B. Descripción dendrológica de <i>Cedrela odorata</i> L.....	5
C. Características botánicas de <i>Cedrela odorata</i> L.	6
1. Hojas	6
2. Flores	6
3. Frutos	7
4. Semillas.....	7
D. Métodos de propagación tradicional.....	8
E. Mejoramiento genético.....	9
F. Propagación clonal <i>in vitro</i> vía organogénesis	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
A. Localización del proyecto	12
B. Características del área experimental.....	12
C. Materiales y Reactivos	12
1. Materiales de laboratorio	12
2. Reactivos:.....	13
3. Material experimental (vegetativo).....	14
D. Metodología	14
E. Fases de la investigación	15
1. Fase de establecimiento	15
2. Fase de multiplicación	19
3. Fase de enraizamiento.....	22
IV. RESULTADOS	26

A. Fase de establecimiento (hipoclorito de calcio).....	26
1. Efecto simple del establecimiento en la variable contaminación por hongos en el “Desarrollo de protocolo de propagación <i>in vitro</i> para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”.	26
2. Efecto simple del establecimiento en la variable contaminación por bacteria en el “Desarrollo de protocolo de propagación <i>in vitro</i> para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”	27
3. Efecto simple del establecimiento en la variable clorótica en el “Desarrollo de protocolo de propagación <i>in vitro</i> para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”	29
4. Efecto simple del establecimiento en la variable vivos en el “Desarrollo de protocolo de propagación <i>in vitro</i> para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”	30
B. Fase de establecimiento (bicloruro de mercurio)	31
1. Efecto simple del establecimiento en la variable de contaminación por hongos en el “Desarrollo de protocolo de propagación <i>in vitro</i> para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”	31
2. Efecto simple del establecimiento en la variable de contaminación por bacteria en el “Desarrollo de protocolo de propagación <i>in vitro</i> para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”	32
3. Efecto simple del establecimiento en la variable clorótica en el “Desarrollo de protocolo de propagación <i>in vitro</i> para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”.	33
4. Efecto simple del establecimiento en la variable vivos en el “Desarrollo de protocolo de propagación <i>in vitro</i> para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”	34
C. Fase de multiplicación.....	36
1. Variable contaminación por hongos	36
2. Variable contaminación por bacterias.....	36
3. Variable clorótica.....	36
4. Variable vigor	36
5. Variable número de brotes	36
6. Variable longitud de brotes.....	36
7. Variable vivos.....	37
D. Fase de enraizamiento.....	37
1. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable callos en el “Desarrollo de protocolo de propagación <i>in vitro</i> para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”	37

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 <i>Cedrela odorata</i> L”.....	38
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 <i>Cedrela odorata</i> L”.....	40
4. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable clorótica en el “Desarrollo de protocolo de propagación in vitro para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”.....	41
5. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable vigor en el “Desarrollo de protocolo de propagación in vitro para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”.	42
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 <i>Cedrela odorata</i> L”.....	43
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 <i>Cedrela odorata</i> L”.....	45
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 <i>Cedrela odorata</i> L”.....	46
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 <i>Cedrela odorata</i> L”.....	47
10. Efecto simple de la fase de enraizamiento en la variable vivos en el “Desarrollo de protocolo de propagación in vitro para cedro <i>Cedrela odorata</i> L”.	49
E. Identificación de hongos	50
F. Análisis económico.....	50
V. DISCUSIÓN	51
VI. CONCLUSIONES.....	57
VII. RECOMENDACIONES	58
VIII. BIBLIOGRAFÍA	59
IX. ANEXOS	64

ÍNDICE DE CUADROS

1. Factores y niveles utilizados en el experimento 1 durante la fase de establecimiento.....	16
2. Combinaciones y tratamientos utilizados del experimento 1 durante la fase de establecimiento.....	16
3. Factores y niveles utilizados en el experimento 2 durante la fase de establecimiento.....	17
4. Combinaciones y tratamientos utilizados del experimento 2 durante la fase de establecimiento.....	17
5. Esquema del análisis de varianza de la fase de establecimiento.....	18
6. Concentración hormonal de los tratamientos aplicados en la fase de multiplicación.....	19
7. Esquema del análisis de varianza de la fase de multiplicación.....	20
8. Niveles y escala del vigor de los explantes de cedro.....	21
9. Factores y niveles utilizados durante la fase de enraizamiento.....	22
10. Combinaciones y tratamientos utilizados en la fase de enraizamiento.....	22
11. Esquema del análisis de varianza de la fase de enraizamiento.....	23
12. Niveles y escala del vigor de los explantes de cedro.....	24
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).....	27
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).....	28
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).....	29
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).	30

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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 21 días de establecidos los explantes” (UTEQ-2011).	31
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).	33
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).	34
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 21 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).	35
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).	38
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).	39
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).	40
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011).	42

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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011),.....	43
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011),.....	44
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011),.....	45
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011),.....	47
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011),.....	48
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 (<i>Cedrela odorata</i> L.)”, a los 30 días de establecidos los explantes (UTEQ-2011),.....	49

ÍNDICE DE ANEXOS

1. Interacción de los factores hipoclorito de calcio por gentamicina en la fase de establecimiento para el cultivo <i>in vitro</i> de cedro.....	64
2. Interacción de los factores bicloruro de mercurio por gentamicina en la fase de establecimiento para el cultivo <i>in vitro</i> de cedro.....	64
3. Tratamientos y variables evaluadas en la fase de multiplicación de cedro.....	65
4. Interacción de los factores Ácido indolbutírico (AIB) con el Ácido naftaleno acético. (ANA) en la fase de enraizamiento.....	65
5. Identificación de hongos presentes en medio de cultivos perteneciente a la fase de multiplicación.....	66
6. Análisis de varianza de la fase de establecimiento con hipoclorito de calcio.....	67
7. Análisis de varianza de la fase de establecimiento con bicloruro de mercurio.....	68
8. Análisis de varianza en la fase de multiplicación.....	69
9. Análisis de varianza de la fase de enraizamiento.....	70
10. Elementos que forman el medio de cultivo para especies leñosas.....	72
11. Plantas seleccionadas de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.) de seis meses de edad y cortes de yemas terminales del invernadero de la UTEQ.....	73
12. Fase de establecimiento desinfección de los explantes de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.).....	73
13. Siembra de los explantes de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.) al medio de cultivo simple (Murashige y Skoog).....	74
14. Fase de multiplicación transferencia de explantes al medio de cultivo con la citoquininas Bencilaminopurina (BAP).....	74
15. Fase de enraizamiento explante de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.) transferida al medio de cultivo con las Auxinas Ácido Indolbutírico (AIB) y el Ácido Naftaleno Acético (ANA).....	75
16. Costos en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> con hipoclorito de calcio del cedro. Lab. de Biotecnología, UTEQ, Quevedo 2011.	76
17. Costos en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> con bicloruro de mercurio del cedro. Lab. de Biotecnología, UTEQ, Quevedo 2011.....	77

18. Costos en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> del cedro. Lab. de Biotecnología, UTEQ, Quevedo 2011,.....	78
19. Costos en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> del cedro. Lab. de Biotecnología, UTEQ, Quevedo 2011.....	80