

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE CALLO
EMBRIOGÉNICO EN HOJAS DE CLONES DE LAUREL BLANCO (*Cordia
alliodora*)**

PAÚL SANTIAGO ORTIZ TIRADO

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN ESTRUCTURADO DE MANERA
INDEPENDIENTE PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CEVALLOS – ECUADOR

2012

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

La responsabilidad del presente trabajo de investigación, titulado “Evaluación de medios de cultivo para la inducción de callo embriogénico en hojas de clones de laurel blanco (*Cordia alliodora*)”, nos corresponde propiamente a: Paúl Santiago Ortiz Tirado, autor del trabajo de investigación y al Patrimonio Intelectual de la Universidad Técnica de Ambato.

Paúl Santiago Ortiz Tirado

Autor

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE CALLO
EMBRIOGÉNICO EN HOJAS DE CLONES DE LAUREL BLANCO (*Cordia
alliodora*)**

APROBADO POR:

Ing. Mg. Nelly Cherres Romo
TUTOR

Ing. Mg. Alberto Gutiérrez Albán
ASESOR DE BIOMETRÍA

TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN:

Ing. M. Sc. Julio Benítez Robalino
PRESIDENTE

Ing. Mg. Luciano Valle Velástegui
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Ing. Mg. Giovanni Velástegui Espín
MIEMBRO DE TRIBUNAL

DEDICATORIA

A Valentina, mi princesa, que con su amor y su dulzura me ha hecho crecer como persona y llenarme de voluntad y fuerza para así poder alcanzar esta meta y no decaer en mi lucha; a Martín y José Andrés mis sobrinos que me han brindado el cariño necesario para colmarme de fortaleza en los momentos más difíciles de la vida.

A mi madre, Rosario, el pilar fundamental en mi vida, quien con su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ella el gran ejemplo a seguir y destacar en mí, quien supo dedicarme lo mejor de su vida para ahora poder ser Ingeniero Agrónomo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida y haberme bendecido con una familia maravillosa y haberme guiado siempre por el camino de la felicidad.

A Cristina y María, mis hermanas, que han sido mi apoyo y siempre encontraron soluciones para los problemas que se me fueron presentando a través del tiempo.

A María Elena, Matilde y Enrique, mis abuelitos, que desde el cielo me han acompañado, quienes desde pequeño me enseñaron que la educación es la mejor herencia que podemos recibir, es por eso que los llevo en mi corazón.

A Andrea, mi novia, a la Ingeniera María Cristina Pazmiño, su madre, y a toda su familia, por su apoyo incondicional y su destreza para resolver los inconvenientes, por impulsarme para conseguir uno de mis objetivos.

A la Ing. Mg. Nelly Cherres, tutora de mi trabajo de investigación quien me ha guiado sabiamente durante el desarrollo de la misma, al Ing. Mg. Alberto Gutiérrez y al Ing. Mg. Eduardo Cruz, Asesor de Biometría y Redacción Técnica respectivamente que me han brindado aportes de gran importancia para culminar mi trabajo de investigación.

A mis profesores, que han sido mis amigos, amigos incondicionales que han sabido colmar con conocimientos todas las inquietudes que se me han presentado en mi vida estudiantil.

A mis compañeros, que más que eso han sido mis hermanos, principalmente a Franklin, Marco, Silvia, Anita, Fernanda, Alexandra, Santiago y Laura con quienes he pasado los mejores momentos de la vida estudiantil y si alguna vez he resbalado me han ayudado a no caer y poder culminar con éxito mi carrera.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN EJECUTIVO.....	1
CAPITULO 1.....	2
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1. PROBLEMA.....	2
1.2. ANÁLISIS CRÍTICO DEL PROBLEMA.....	3
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	4
1.4. OBJETIVOS.....	5
1.4.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
CAPITULO 2.....	6
MARCO TEÓRICO E HIPÓTESIS.....	6
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	6
2.2. MARCO CONCEPTUAL.....	7
2.2.1. BIOTECNOLOGIA VEGETAL.....	7
2.2.1.1. MEDIOS DE CULTIVO IN VITRO.....	7
2.2.1.1.1. MACROELEMENTOS.....	9
2.2.1.1.2. MICROELEMENTOS.....	11
2.2.1.1.3. VITAMINAS.....	11
2.2.1.1.4. REGULADORES DEL CRECIMIENTO.....	12
2.2.1.2. FACTORES FÍSICOS QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCIÓN IN VITRO.....	15
2.2.1.3. EMBRIGÉNESIS SOMÁTICA.....	15
2.2.1.4. FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN.....	18
2.2.1.4.1. ETAPA DE ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO.....	18
2.2.1.4.2. ETAPA DE PROLIFERACIÓN.....	18
2.2.1.4.3. ETAPA DE ELONGACIÓN.....	18
2.2.1.4.4. FASE DE ENRAIZAMIENTO IN VITRO.....	18
2.2.2. LAUREL BLANCO (<i>Cordia alliodora</i> , RUIZ Y PAVÓN).....	19
2.2.2.1. RAÍZ.....	19
2.2.2.2. TALLO.....	19
2.2.2.3. FOLLAJE.....	19
2.2.2.4. FLORES Y FRUTOS.....	20

2.2.2.5. DESCRIPCIÓN DE LA SEMILLA DE LAUREL.....	20
2.2.2.6. DESCRIPCIÓN DE LOS CLONES DE LAUREL.....	21
2.3. HIPÓTESIS.....	22
2.4. VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.....	22
2.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	23
CAPÍTULO 3	24
METODOLOGÍA.....	24
3.1. ENFOQUE, MODALIDAD Y TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	24
3.2. UBICACIÓN DEL ENSAYO.....	24
3.3. FACTORES DE ESTUDIO.....	24
3.3.1. CLONES DE LAUREL.....	24
3.3.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	25
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
3.5. TRATAMIENTOS.....	25
3.6. DISEÑO O ESQUEMA DE CAMPO.....	27
3.6.1. ESQUEMA DE LABORATORIO.....	27
3.7. DATOS TOMADOS.....	29
3.7.1. COLORACIÓN DEL EXPLANTE.....	29
3.7.2. DÍAS A LA FORMACIÓN DEL CALLO.....	29
3.7.3. COLOR DEL CALLO.....	29
3.7.4. NÚMERO DE CALLOS.....	29
3.7.5. PORCENTAJE DE CALLOS FORMADOS.....	29
3.8. MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN.....	29
3.8.1. OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS HOJAS DE LAUREL.....	29
3.8.2. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	30
3.8.3. TRASPASO DEL MEDIO (VERTER EN LOS FRASCOS).....	32
3.8.4. ESTERILIZACIÓN DE LA CÁMARA.....	32
3.8.5. USO DE LA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR.....	32
3.8.6. SIEMBRA DEL EXPLANTE.....	32
CAPÍTULO 4.....	33
RESULTADOS, ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. COLORACIÓN DEL EXPLANTE.....	33
4.2. DÍAS A LA FORMACIÓN DEL CALLO.....	34
4.2.1. DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLOS HASTA LOS 15 DÍAS.....	34

4.2.2. DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLOS DESDE LOS 15 HASTA LOS 30 DÍAS.....	39
4.2.3. DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLOS DESDE LOS 30 HASTA LOS 45 DÍAS.....	44
4.3. COLOR DEL CALLO.....	49
4.4. NÚMERO DE CALLOS FORMADOS.....	52
4.4.1. NÚMERO DE CALLOS FORMADOS HASTA LOS 15 DÍAS.....	52
4.4.2. NÚMERO DE CALLOS FORMADOS DESDE LOS 15 HASTA LOS 30 DÍAS.....	57
4.4.3. NÚMERO DE CALLOS FORMADOS DESDE LOS 30 HASTA LOS 45 DÍAS.....	62
4.4.4. TOTAL DE CALLOS FORMADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.....	67
4.5. PORCENTAJE DE CALLOS FORMADOS.....	70
CAPÍTULO 5.....	75
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	75
5.1. CONCLUSIONES.....	75
5.2. RECOMENDACIONES.....	76
CAPÍTULO 6.....	77
PROPUESTA.....	77
6.1. TÍTULO.....	77
6.2. FUNDAMENTACIÓN.....	77
6.3. OBJETIVOS.....	77
6.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	77
6.3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	78
6.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA.....	78
6.5. PROPUESTA.....	79
6.5.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	79
6.5.2. TRASPASO DEL MEDIO (VERTER EN LOS FRASCOS).....	80
6.5.3. ESTERILIZACIÓN DE LA CÁMARA.....	80
6.5.4. USO DE LA CÁMARA DE FLUJO LAMINAR.....	81
6.5.5. SIEMBRA DEL EXPLANTE.....	81
6.6. IMPLEMENTACIÓN / PLAN DE ACCIÓN.....	81
BIBLIOGRAFÍA.....	82
APÉNDICE.....	87

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. COMPOSICIÓN DE ALGUNOS MEDIOS DE CULTIVO.....	8
CUADRO 2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	23
CUADRO 3. TRATAMIENTOS.....	26
CUADRO 4. SALES DE LOS MEDIOS DKW Y MS.....	31
CUADRO 5. COLORACIÓN DEL EXPLANTE POR CADA CLON.....	33
CUADRO 6. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 15 DÍAS.....	34
CUADRO 7. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 15 DÍAS.....	35
CUADRO 8. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 15 DÍAS.....	36
CUADRO 9. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM) EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 15 DÍAS.....	37
CUADRO 10. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 30 DÍAS.....	39
CUADRO 11. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 30 DÍAS.....	39
CUADRO 12. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 30 DÍAS.....	40
CUADRO 13. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM) EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 30 DÍAS.....	42
CUADRO 14. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 45 DÍAS.....	44

CUADRO 15. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 45 DÍAS.....	44
CUADRO 16. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 45 DÍAS.....	45
CUADRO 17. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM) EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 45 DÍAS.....	47
CUADRO 18. COLOR DEL CALLO A LOS 15, 30 Y 45 DÍAS.....	49
CUADRO 19. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 15 DÍAS.....	52
CUADRO 20. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 15 DÍAS.....	53
CUADRO 21. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 15 DÍAS.....	54
CUADRO 22. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM) EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 15 DÍAS.....	55
CUADRO 23. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 30 DÍAS.....	57
CUADRO 24. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 30 DÍAS.....	57
CUADRO 25. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 30 DÍAS.....	58
CUADRO 26. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM) EN LA	

VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 30 DÍAS.....	58
CUADRO 27. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 45 DÍAS.....	62
CUADRO 28. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 45 DÍAS.....	62
CUADRO 29. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 45 DÍAS.....	63
CUADRO 30. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM) EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 45 DÍAS.....	65
CUADRO 31. NÚMERO TOTAL DE CALLOS FORMADOS HASTA LOS 45 DÍAS PARA CLONES.....	67
CUADRO 32. NÚMERO TOTAL DE CALLOS FORMADOS HASTA LOS 45 DÍAS PARA MEDIOS DE CULTIVO.....	67
CUADRO 33. NÚMERO TOTAL DE CALLOS FORMADOS HASTA LOS 45 DÍAS PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CxM).....	68
CUADRO 34. PORCENTAJE DE CALLOS FORMADOS HASTA LOS 45 DÍAS.....	70
CUADRO 35. FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MS (MURASHIGE AND SKOOG, 1962).....	79

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

GRÁFICO 1. ESQUEMA DE LABORATORIO.....	28
GRÁFICO 2. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 15 DÍAS.....	35
GRÁFICO 3. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 15 DÍAS.....	36
GRÁFICO 4. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM), EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 15 DÍAS.....	38
GRÁFICO 5. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 30 DÍAS.....	40
GRÁFICO 6. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 30 DÍAS.....	41
GRÁFICO 7. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM), EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 30 DÍAS.....	43
GRÁFICO 8. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 45 DÍAS.....	45
GRÁFICO 9. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 45 DÍAS.....	46
GRÁFICO 10. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM), EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO A LOS 45 DÍAS.....	48

GRÁFICO 11. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE NÚMEROS DE CALLOS FORMADOS A LOS 15 DÍAS.....	53
GRÁFICO 12. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE NÚMEROS DE CALLOS FORMADOS A LOS 15 DÍAS.....	54
GRÁFICO 13. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM) EN LA VARIABLE NÚMEROS DE CALLOS FORMADOS A LOS 15 DÍAS.....	56
GRÁFICO 14. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 30 DÍAS.....	58
GRÁFICO 15. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 30 DÍAS.....	59
GRÁFICO 16. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM), EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 30 DÍAS.....	61
GRÁFICO 17. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 45 DÍAS.....	63
GRÁFICO 18. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 45 DÍAS.....	64
GRÁFICO 19. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CXM), EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 45 DÍAS.....	66
GRÁFICO 20. PORCENTAJE DE CALLOS FORMADOS A LOS 15 DÍAS.....	71
GRÁFICO 21. PORCENTAJE DE CALLOS FORMADOS A LOS 30 DÍAS.....	71
GRÁFICO 22. PORCENTAJE DE CALLOS FORMADOS A LOS 45 DÍAS.....	71

RESUMEN EJECUTIVO

El presente ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de micropropagación de la empresa Bosques Tropicales S.A. (BOTROSA), localizada en el sector de Guajaló, al Sur de la ciudad de Quito, provincia de Pichincha.

La investigación tuvo por objeto poner a prueba dos soluciones madre (MS, DKW), distribuidas en ocho medios de cultivo, cada uno de ellos con adición de diferentes fitohormonas (2,4-D y BAP), y caseína hidrolizada, para evaluar el mejor tratamiento que induzca a la formación de callogénesis en hojas de laurel (*Cordia alliodora*).

Los factores de estudio fueron: ocho medios de cultivo; M1 (50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azúcar) ; M2 (50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azúcar + 2mg/l de 2,4-D); M3 (50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azúcar + 2mg/l de 2,4-D + 1mg/l de BAP); M4 (50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azúcar + 2mg/l de 2,4-D + 1mg/l de BAP + 100 mg/l de Caseína Hidrolizada); M5 (50% del medio Driver y Kuniyuki (DKW) + 30g/l de azúcar); M6 (50% del medio Driver y Kuniyuki (DKW)+ 30g/l de azúcar + 2mg/l de 2,4-D); M7 (50% del medio Driver y Kuniyuki (DKW) + 30g/l de azúcar + 2mg/l de 2,4-D + 1mg/l de BAP) ; M8 (50% del medio Driver y Kuniyuki (DKW) + 30g/l de azúcar + 2mg/l de 2,4-D + 1mg/l de BAP + 100 mg/l de Caseína Hidrolizada), y cuatro clones; C1 (S27B); C2 (R162A3); C3 (R162A9); C4 (P402C). Se utilizó un diseño de parcelas divididas, donde la parcela grande fueron los clones y las subparcelas los medios de cultivo, con cinco repeticiones. Se realizó análisis de varianza y pruebas de Tukey al 5% para los tratamientos

En el ensayo se observó que el mejor resultado, al obtener un mayor número de callos formados hasta los 45 días, fue el medio de cultivo (M4), mostrando una media de 15,40; 16,80 y 17,20 callos formados a los 15, 30 y 45 días respectivamente; conjuntamente el clon (C4) fue el que presentó la mejor respuesta frente al estímulo del medio de cultivo.

CAPITULO 1

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. PROBLEMA.

La semilla de Laurel (*Cordia alliodora*), se obtiene una sola vez al año, y debido a la baja viabilidad de la misma no se la puede almacenar, por tal motivo se dificulta la producción constante de plántulas de esta especie para la industria con características deseables.

Según Herbaria.plants.ox.ac.uk. (2010), Siempre hay mucha semilla, pero la época de recolección es crítica. Con el periodo extendido de floración hay que retrasar la recolección para maximizar la cantidad de semilla madura. Lo primero en caer del árbol son mayormente flores no fertilizadas (parecen vanas) y no semilla. El tiempo óptimo de recolección es aproximadamente siete semanas después del momento en que las flores han abierto y los pétalos están blancos. Como regla general, la recolección de un árbol debe retrasarse hasta dos semanas después de que las últimas flores hayan abierto en ese árbol. La semilla está madura cuando el embrión está duro, como un grano de arroz, e inmadura si el embrión todavía está suave y translúcido

De acuerdo con Conabio.gob.mx. (2010), en décadas pasadas se establecieron plantaciones forestales en Centroamérica, América del Sur y Nigeria. Ahora la especie ha comenzado a ser importante en los programas de reforestación de varios países como: Brasil, Congo, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Costa de Marfil, Puerto Rico, Sierra Leona, Trinidad, Uganda y Venezuela. *Cordia alliodora* se ha empleado en plantaciones permanentes junto con café, cacao, coco, guayaba, poró y cedro. En temporales con plátano, arroz y yuca. No existen sistemas silviculturales a gran escala para el manejo de las masas naturales de árboles de *Cordia*.

1.2. ANÁLISIS CRÍTICO DEL PROBLEMA.

El proceso común utilizado para la producción de plántulas de Laurel blanco (*Cordia alliodora*) para la comercialización, es por medio de semillas lo cual disminuye la calidad de los vegetales debido a la variabilidad genética que se produce de un individuo a otro con descendencia vertical, lo que no ocurre cuando se producen clones exactos de un individuo con características óptimas de la madera para la industrialización, lo cual se puede lograr mediante cultivos in vitro.

Liegel, L.H. y Stead J.W. (1990), de acuerdo a la experiencia del Instituto de Dasonomía de Oxford, menciona que se debe recolectar las frutas cuando hayan cambiado de un color verde a un color pardo, posteriormente se debe reducir el contenido de humedad de las semillas a un 10 por ciento o menos mediante el secado en hornos de aire forzado a una temperatura de alrededor de 70 °C.

Herbaria.plants.ox.ac.uk. (2010), manifiesta que las semillas se pueden almacenar por 3 meses secándolas hasta un 25 % de humedad y refrigerándolas a 5 °C. Se aconseja secarlas en hornos de aire forzado a 70 °C hasta lograr una humedad del 8 al 10 %. Dicho método parece no afectar el proceso de postmaduración del embrión. El secamiento al sol puede ser nocivo para las semillas.

Rodríguez, L. (2010), señala que la semilla es predada (hasta 50% de semilla) por gorgojos (*Amblycerus spp.*). La semilla atacada es obvia por el hoyo de deja al salir el gorgojo adulto y el grado de ataque varía entre años. Hay que secar la semilla durante 4-5 días bajo sombra y remover los gorgojos y la semilla atacada por ellos durante el venteo. Cierta semilla dañada puede permanecer después de este proceso y si el ataque es severo, se puede utilizar un insecticida persistente para almacenamiento, para matar cualquier gorgojo de emergencia tardía.

Herbaria.plants.ox.ac.uk. (2010), expresa que el tiempo promedio de germinación es de 18 a 25 días. La semilla es fotoblástica. Posee un porcentaje de germinación del 55 a 85%, en 2 ó 3 semanas se obtiene un 80 % de germinación cuando las semillas frescas se siembran rápidamente (sin pretratamiento).

J.W. Stead. (s.f), indica que *C. alliodora* es muy común en Ecuador y toda América Latina, donde es muy apreciado como árbol maderero. Lo que demanda estudiar más su botánica. Esta situación se refleja en la evaluación de la especie efectuada por la FAO (1977). *C. alliodora* requiere medidas urgentes de conservación pero, debido a su importancia maderera, resulta prioritaria la labor de exploración botánico-ecológica y de evaluación.

1.3. JUSTIFICACIÓN.

Las plantaciones forestales tienen una función creciente en el abastecimiento de madera para la industria forestal mundial, el aporte de las innovaciones en genética y biotecnología permite obtener árboles de buen crecimiento y características deseadas; entre las especies con potencialidad de uso comercial, rápido crecimiento, calidad y uso de la madera es el Laurel (*Cordia alliodora*). La producción de material seleccionado de especies forestales requiere, por una parte, un mayor conocimiento de la biología reproductiva así como de los condicionamientos fisiológicos que influyen en la capacidad morfogenética en relación con la juvenilidad de los materiales. Así mismo, no es frecuente encontrar en la naturaleza estados juveniles en árboles adultos como fuente de material para propagación, aunque para algunas especies puede ser resuelto a través de la obtención de rebrotes de tocón, brotes epicórnicos, podas a ras de suelo, enraizamiento seriado de estacas, injertos y etiolación. Ante este panorama la biotecnología se presenta como una alternativa para la producción y mejoramiento de especies forestales.

Baquero O; et al. (2005), manifiesta que en la silvicultura mundial, la aplicación de técnicas de micropropagación en especies forestales de uso maderable ha constituido una alternativa muy útil para aumentar el número de plantas requeridas para el establecimiento de plantaciones en los programas de propagación masiva, forestación, reforestación, protección y aprovechamiento. Así mismo para aquellas en que su comportamiento es más recalcitrante, el desarrollo de sistemas de propagación vegetativa mediante micropropagación y embriogénesis somática in vitro, permite la obtención de clones de genotipos seleccionados. Bajo estas condiciones es posible producir material vegetal en cualquier época del año y entregarlo de acuerdo con el programa de siembra establecido por el reforestador.

Ecuadorforestal.org. (2011), expresa que el laurel es una especie forestal muy popular en el Ecuador debido a su alta calidad, a la dureza de su madera y a su rápido crecimiento, teniendo gran demanda para la industria, la ebanistería y la agroforestería. Debido a sus propiedades estéticas como: color, brillo, y vetado; y por sus propiedades de fácil trabajabilidad, es ampliamente demandada por distintas industrias, por empresas de muebles, para la elaboración de puertas, ventanas, artesanías y para la ebanistería fina. La importancia de la propagación vegetativa, es la reproducción de características fenotípicas deseadas y adicionalmente constituyen una ventaja en un ambiente más o menos constante, al cual la especie ya está bien adaptada. Entre las ventajas que ofrece esta técnica está la de brindar ganancias genéticas rápidas, adecuadas para programas de mejoramiento genético.

1.4. OBJETIVOS.

1.4.1. Objetivo General.

Establecer la metodología apropiada de micropropagación para inducir callo embriogénico en hojas de clones de laurel (*Cordia alliodora*).

1.4.2. Objetivos Específicos.

Evaluar diferentes medios de cultivo en la formación de callo embriogénico a partir de explantes de hojas de clones de laurel (*Cordia alliodora*).

Determinar la solución madre del medio de cultivo que permita el desarrollo de callogénesis en hojas de clones de laurel.

Establecer la respuesta de los clones de laurel a los medios de cultivo en la formación de callo embriogénico.

CAPITULO 2

MARCO TEÓRICO E HIPÓTESIS

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.

Gómez, C. et al. (2010), en su trabajo de investigación sobre el estudio de la inducción de callo embriogénico a partir de tres explantos provenientes de semillas maduras (embriones cigóticos maduros, hipocótilos y cotiledones) en Eucalipto. Los resultados obtenidos luego de la investigación indicaron que el medio “I3 (B5 + ANA 0,5mg·l⁻¹ + BAP 1,0mg·l⁻¹)” produjo los mayores porcentajes de formación de callo en todos los explantes.

Vidales-Fernández, I. et al. (2010), manifiestan que el cultivo *in vitro* de tejido nucelar de aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass) y la subsecuente inducción de la embriogénesis somática fue desarrollada. Segmentos de tejido nucelar fueron colocados sobre un medio de cultivo con sales minerales MS, auxinas (picloram, AIB y 2,4-D) y suplementado con caseína hidrolizada. Ácido ascórbico y L-cisteína fueron probados para reducir necrosis en obscuridad y con baja intensidad de luz. La necrosis se redujo en un 100% con la inmersión del tejido nucelar en ácido ascórbico (400 mg/l) antes del cultivo *in vitro*. Un 20% de callo embriogénico desarrollo sobre medio de inducción con 2,4-D (1 mg/l) después de 50 días a 25°C en obscuridad. Sin embargo, los callos embriogénicos desarrollaron mejor en un medio adicionado con picloram (4 mg/l) y AIB (0.4 mg/l). La multiplicación del callo embriogénico fue obtenida en baja intensidad de luz y cultivado sobre medio sin reguladores por 4 semanas; los embriones maduraron sobre un medio endurecido con agar-agar 20 g/l y germinaron en un 10% bajo cultivo de dos fases: primero en un medio bajo en nitratos y sin reguladores, y posteriormente en medio MS con 0.3 mg/l de BA.

2.2. MARCO CONCEPTUAL.

2.2.1. Biotecnología vegetal.

Según CIAT. (1991), el cultivo de tejidos vegetales es una técnica que consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana.

Botti, C. (1992), manifiesta que la técnica de cultivo de tejidos se basa en tres objetivos fundamentales:

- a. “La parte de la planta o explante, sea órgano, tejido o célula, debe aislarse del resto de la planta. Esto, efectivamente, altera las interacciones intercelulares de los tejidos o de órganos que pueden estar ocurriendo en la planta intacta.
- b. “El explante debe ser mantenido en un medio definido y controlado. Las características genéticas fisiológicas y bioquímicas del tejido, la composición química del medio y las condiciones físicas del ambiente, van a determinar el potencial de respuesta del explante”
- c. “Debe mantenerse asepsia. La mayoría de los medios de cultivo favorecen el desarrollo de algas, hongos o bacterias que producen metabolitos tóxicos para el explante y, finalmente, lo destruyen. Es esta necesidad de asepsia la que, primordialmente, influye en la organización y en las técnicas a emplear de un laboratorio dedicado al cultivo in vitro”

2.2.1.1. Medios de cultivo in vitro.

Sakai.udl.es. (2010), expresa que de entre la gran diversidad de medios de cultivo *in vitro* utilizados habitualmente, el medio Murashige y Skoog (MS) es el medio más conocido. Se elaboró tomando el cultivo *in vitro* de tabaco como modelo y siguiendo un procedimiento cuantitativo se determinaron las concentraciones más adecuadas de todos

los nutrientes. El medio MS es apto para la mayoría de las especies, por lo que es de amplia utilización, excepto para las más sensibles a la salinidad ya que se caracteriza por tener una elevada concentración salina. En esos casos puede recurrirse a otros medios o simplemente utilizarlo diluido (1/2 MS, 1/4 MS). En la práctica los distintos medios se caracterizan por presentar también diferente composición química, como se señala en el cuadro 1.

CUADRO 1. COMPOSICION DE ALGUNOS MEDIOS DE CULTIVO

Constituyentes Inorgánicos	Medios (mg l ⁻¹)							
	White's	Heller's	MS	ER	B5	Nitsch's	NT	WPM
NH ₄ NO ₃	-	-	1.650,0	1.200,0	-	720,0	825,0	400,0
KNO ₃	80,0	-	1.900,0	1.900,0	2.527,50	950,0	950,0	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	75,0	440,0	440,0	150,0	-	220,0	96,0
CaCl ₂	-	-	-	-	-	166,0	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	720,0	250,0	370,0	370,0	246,50	185,0	1.233,0	370,0
KH ₂ PO ₄	-	-	170,0	340,0	-	68,0	680,0	170,0
K ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	-	990,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	134,0	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	300,0	-	-	-	-	-	-	556,0
NaNO ₃	-	600,0	-	-	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	200,0	-	-	-	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₂ .H ₂ O	19,0	125,0	-	-	150,0	-	-	-
KCl	65,0	750,0	-	-	-	-	-	-
KI	0,75	0,01	0,83	-	0,75	-	0,83	-
H ₃ BO ₃	1,30	1,0	6,20	0,63	3,0	10,0	6,20	6,20
MnSO ₄ .4H ₂ O	7,0	0,10	22,30	2,23	-	25,0	22,30	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	-	-	-	3,0	-	-	16,90
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,0	1,0	8,60	-	2,0	10,0	-	8,60
ZnSO ₄ .4H ₂ O	-	-	-	-	-	-	8,60	-
Zn.Na ₂ .EDTA	-	-	-	15,0	-	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	-	0,25	0,0025	0,25	0,25	0,25	0,25
MoO ₃	0,0001	-	-	-	-	-	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,001	0,03	0,025	0,0025	0,025	0,025	0,025	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	-	0,025	0,0025	0,025	-	-	-
CoSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	-	-	-	0,03	-
AlCl ₃	-	0,03	-	-	-	-	-	-
NiCl ₂ .6H ₂ O	-	0,03	-	-	-	-	-	-

2.2.1.1.1. Macroelementos.

Uam.es. (2010), expresa que los elementos esenciales se clasifican según un criterio de cantidad, en macronutrientes y micronutrientes. La diferencia se encuentra en las concentraciones relativas que presentan unos y otros en los tejidos vegetales. Consideramos macronutrientes minerales a los que están presentes en el tejido por encima del 0.1%, y son: N, S, P, K, Ca y Mg. Los elementos C, H y O, aunque son nutrientes, no se incluyen en estos fundamentos de la nutrición mineral, por no ser objeto de adición como fertilizantes de los cultivos. El N, S y P, junto con C, H y O, son los constituyentes mayoritarios de las moléculas estructurales de las plantas, mientras que K, Ca y Mg, desempeñan funciones que tiene que ver con el agua y la conformación de proteínas. Todos participan también en otras funciones básicas en el metabolismo de las plantas.

Nitrógeno.

Uam.es. (2010), expresa que es un nutriente de gran importancia debido a su presencia en las principales biomoléculas de la materia vegetal; si añadimos que los suelos suelen soportar un déficit de este elemento, tendremos que, junto al potasio y el fósforo, es uno de los elementos claves en la nutrición mineral.

Fosforo.

Según Uam.es. (2010), es un nutriente de baja disponibilidad en el suelo, a pesar de ser relativamente abundante. Después del nitrógeno, es el que más gasto supone como abono de los cultivos. El fósforo forma parte de moléculas de carácter energético como puede ser el adenosín trifosfato (ATP) o la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). En este último caso forma un enlace éster fosfórico con grupos hidroxilos y en el otro, en el ATP, forma enlaces tipo anhídrido de ácido ricos en energía. Realiza una función clave en la fotosíntesis, la respiración celular y todo el metabolismo energético. También tiene un papel estructural como enlace fosfodiéster presente en los ácidos nucleicos y en los fosfolípidos. Tiene una función metabólica, en la regulación de la síntesis y transporte de hidratos de carbono y favorece el desarrollo de las raíces al comienzo de la vegetación.

Potasio.

Uam.es. (2010), indica que el potasio es el elemento relativamente abundante en la naturaleza. Es junto a N y P, de los más utilizados como fertilizantes inorgánicos. Su principal función es la de osmorregulador e interviene en el mantenimiento del turgor de la célula, en la apertura y cierre estomático, así como en las nastias y tactismos. El potasio también actúa como activador enzimático en más de 50 sistemas enzimáticos, que requieren una concentración elevada de K^+ en el medio, para alcanzar una actividad óptima. Así, el potasio interviene en distintos procesos metabólicos fundamentales como la respiración, la fotosíntesis, y la síntesis de clorofilas. Estimula la formación de flores y frutos y aumenta la eficiencia del nitrógeno.

Azufre.

Uam.es. (2010), expresa que el azufre es el nutriente relativamente menos investigado debido a la falta aparente de carencias de S en los cultivos, dificultades analíticas y el aporte indirecto de S como acompañante de otros abonos y plaguicidas. El azufre se encuentra en los aminoácidos azufrados cisteína y metionina. También se integra en diversas coenzimas (coenzima A, biotina, ácido lipóico, etc.), forma parte de sulfolípidos de membrana y heteropolisacáridos. El azufre juega un papel destacado en la regulación redox de citoplasma y cloroplasto, sobre todo a través del glutatión, tripéptido que incluye cisteína.

Calcio.

El mismo autor señala que el calcio es un elemento relativamente abundante en la corteza terrestre. En la célula vegetal se encuentra fuera del citoplasma. Juega, entre otros, un papel hormonal o de segundo mensajero. Se adiciona en el encalado de suelos ácidos. La mayor parte del calcio que se absorbe se localiza extracelularmente en la pared celular (en los pectatos), y en las membranas, ayuda a la estructuración de la lámina media de la pared celular, aumenta la resistencia mecánica de los frutos, es un mensajero citoplasmático para algunas hormonas, normaliza la actividad en la fosforilización de algunas proteínas, es un activador y regulador de algunas enzimas, actúa sobre la

permeabilidad diferencial de la membrana plasmática, estimula el desarrollo de hojas y raíces, promueve a formación de núcleo y mitocondrias.

Magnesio.

Uam.es. (2010), expresa que es un elemento relativamente abundante en la corteza terrestre, y se estudia asociado al calcio, potasio y sodio. En planta es significativo su papel como constituyente de la molécula de clorofila. Una parte del Mg soluble se encuentra en el espacio intratilacoidal y actuará como activador enzimático al iluminarse el cloroplasto. También interviene en el metabolismo energético de la planta, ya que participa como catión puente en reacciones importantes con el ATP, en la transferencia del grupo fosforilo. Activador de enzimas del metabolismo glucídico y síntesis de ácidos nucleicos.

2.2.1.1.2. Microelementos.

Botti, C. (1992), manifiesta que los componentes esenciales son: Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu), Cobalto (Co) y Molibdeno (Mo). Al menos cinco son esenciales para la síntesis de clorofila y funcionamiento de cloroplastos: (Fe, Mn, Mo, Zn, Cu). Zn y Cu están relacionados con enzimas que intervienen en la oxidación de fenoles y ácido abscísico. Cu es componente de la vitamina B₁₂ relacionada con la síntesis de ácidos nucleicos. El B es necesario para aumentar la actividad meristemática (participa en la síntesis de bases nitrogenadas). Varios micronutrientes tienen relación con la síntesis y la actividad de los reguladores de crecimiento (Zn, B, Mn y Cu). El yodo (I) se agrega, generalmente, porque se ha visto que mejora el crecimiento de los tejidos cultivados y en algunos casos previene la oxidación de los tejidos.

2.2.1.1.3. Vitaminas.

Ayerbe, L. (1990), expresa que una o varias de las siguientes vitaminas se utilizan algunas veces en el cultivo in vitro: inositol, vitamina B₁, Vitamina B₂, Vitamina B₆, Vitamina E, pantotenato de calcio o ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina, ácido ascórbico (Vitamina C), ácido nicotínico, biotina (Vitamina H), ácido para-aminobenzoico. A veces se utilizan altas concentraciones de ácido ascórbico, lo que no

quiere decir exactamente que la planta tenga necesidades elevadas, pero se utiliza la Vitamina C en altas concentraciones como antioxidante.

2.2.1.1.4. Reguladores del crecimiento.

Thorpe, (1994), referido por Wahby, I. (2007), señala que los principales reguladores de crecimiento son las auxinas, citoquininas y otros reguladores como las giberelinas, oligosacarinas, ácido abscísico y etileno. Las auxinas más importantes son el ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Esta clase de fitohormonas se conoce por su acción sobre la elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias. En cuanto a las citoquininas, las más comunes son la Kinetina, N⁶-bencilaminopurina (BA ó BAP), zeatina y 6-(γ,γ -dimetilamino) purina (2iP). Las citoquininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, disminuyen la dormancia apical por lo que promueven la formación de brotes axilares, retardan el envejecimiento y, en concentraciones elevadas, pueden inducir la formación de brotes adventicios e inhibir la formación de raíces.

Ayerbe, L. (1990), menciona que las hormonas son, por definición compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugares diferentes a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. A parte de estos productos naturales, se han desarrollado también otros de tipo sintético que pueden tener una actividad semejante a la de los primeros. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denomina reguladores y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta. Los reguladores del crecimiento son:

Auxinas.

Ayerbe, L. (1990), señala que las auxinas generalmente producen: elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y

adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. Con una baja concentración de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxinas no se producen raíces, y tiene lugar, en cambio, la formación de callo.

Hess y Carman, (1991), citados por Cadavid. (2006), reportan que los tejidos embriogénicos son muy ricos en Ácido abscísico (ABA), mientras que el contenido de Ácido 3-Indol Acético (AIA) varía considerablemente de una especie a otra. La adquisición de la capacidad embriogénica de los callos puede estar relacionada con el establecimiento de un balance específico entre diferentes hormonas de tipo endogénico.

Montoro, et ál, (1992), citado por Cadavid. (2006), establece que las auxinas juegan un papel muy importante en el desarrollo de embriones somáticos, pero igualmente manifiesta que las citoquininas interactúan con las auxinas en la regulación de la ontogénesis de los embriones.

CIAT. (1991), menciona que las auxinas se utilizan en concentraciones que varían de 0,001 a 10 mg/l, con un punto óptimo alrededor de 0,1 a 1 mg/l.

Hurtado y Merino. (1988), señalan las siguientes auxinas utilizadas en la preparación de medios de cultivo.

Ácido 3-indolacético (AIA)

Ácido 3-indolbutírico (AIB)

Ácido naftalenacético (ANA)

Ácido 4-clorofenoxiacético (CPA)

Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D)

Citoquininas.

Según Ayerbe, L. (1990), las citoquininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. En concentraciones altas puede inducir la formación de vástagos adventicios, sin embargo, se inhibe la formación de raíces, las

citoquininas promueven la formación de vastagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical, también retardan el envejecimiento.

Hurtado y Merino (1988), mencionan que las citoquininas se usan en concentraciones de 0,03 a 30 mg/l, y nos presentan las siguientes citoquininas utilizadas en la preparación de medios de cultivo.

N⁶ Bencil aminopurina (BA) ó (BAP)

N⁶ Dimetil alil aminopurina (2iP)

N⁶ Furfuril aminopurina (cinetina)

N⁶ (4-hidroxi, 3-metil, 2-butenil) adenina (zeatina)

Giberelinas.

Ayerbe, L. (1990), expresa que este grupo de compuestos generalmente no se utiliza en cultivos in vitro de plantas superiores, ya que en la mayoría de los casos no son sustancias esenciales. Las giberelinas inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas in vitro. Generalmente inhiben la formación de raíces adventicias y también la formación de vátagos adventicios.

Ácido abscísico.

Según, Pilet y Roland, (1971), citados por Ayerbe, L. (1990), en la mayor parte de los casos el ácido abscísico produce un efecto negativo en los cultivos in vitro, y las referencias a crecimiento de callo y embriogénesis son probablemente incidentales.

Etileno.

De acuerdo a Mele, et al., (1982), citados por Ayerbe, L. (1990), se sabe que tanto el cultivo de órganos como el de callos pueden producir etileno, una hormona gaseosa.

2.2.1.2. Factores físicos que intervienen en la producción in vitro.

Según, Murashige et al., (1968), citado por CIAT. (1991), la organogénesis puede estar afectada por una gran variedad de factores como la luminosidad que es un factor crítico para la iniciación de yemas en el cultivo de callos, la temperatura que generalmente para el cultivo de tejidos se mantiene a 25° Celsius, sin embargo, las temperaturas que estén dentro de los 18° y 28° Celsius son consideradas también efectivas, la consistencia del medio es también un factor muy importante ya que si se preparan medios con altas cantidades de agar producen un medio ambiente con mucho estrés para las plantas, lo cual reduce la formación de meristemoides, entre otros factores que afectan la organogénesis están el pH del medio, la polaridad del explante, la humedad relativa y la fase gaseosa del medio de cultivo.

Marín, (2010), manifiesta que los cultivos de tejidos vegetales deben conservarse en condiciones apropiadas para su mantenimiento, tratando de reproducir las condiciones naturales más favorables. La luz, temperatura y humedad relativa son los factores ambientales más importantes. La luz interesa en distintos aspectos: la intensidad, el fotoperíodo y la calidad espectral. La luz es importante no tanto para la fotosíntesis de los tejidos que, si se produce, en muy baja proporción, sino para que la fotomorfogénesis tenga lugar y se produzcan brotes de aspecto normal. La temperatura se regula en torno a los 22 y 25° Celsius, pero durante el período iluminado, en el interior de los frascos de cultivo es ligeramente superior (1-2 grados) debido al efecto invernadero. En el interior de los frascos se mantiene una alta humedad relativa, cercana a la saturación, debido a las condiciones de estanqueidad casi total necesaria para mantener la asepsia, y que solo permiten un pequeño intercambio gaseoso, creando un ambiente favorable para el crecimiento y la multiplicación de los brotes.

2.2.1.3. Embrigénesis somática.

Botti, C. (1992), manifiesta que existen dos tipos de embrigénesis; la directa, es poco común y normalmente se originan los embriones somáticos, de embriones cigóticos o de partes de las plantulas. La embrigénesis indirecta produce callo que adquiere potencial embrigénico en algunos sectores, ya que se pueden utilizar diversos explantes, éste puede ser un método muy eficiente de micropropagación.

Litz y Jarret, (1991), citado por Quintero, M. (2003), expresa que se considera a la embriogénesis somática (asexual o adventicia) como un proceso biológico mediante el cual se logra la inducción y desarrollo de embriones a partir de células somáticas, pero sin la fusión gamética, en otras palabras, es un proceso mediante el cual se produce una estructura bipolar (embrión) característico de embriogénesis cigótica, pero a partir de una célula somática.

Kole. (2007), en su trabajo de investigación argumenta que las primeras plantas de la embriogénesis somática se obtuvieron de forma simultánea en China y Malasia de la pared de la antera. Las fases sucesivas en la embriogénesis son callogénesis, diferenciación, multiplicación y regeneración de plantas. Esto se produce gracias a la sabia combinación de 2,4-D (Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético) y BAP (Bencil aminopurina) y un aumento en la concentración de sacarosa lo que promueve la estimulación de callogénesis en la oscuridad.

Estudios realizados por Carron, et ál. (1988), citado por Cadavid. (2006), indica que, a partir de integumento, en el medio para la inducción de callogénesis, la adición de sustancias tales como calcio, sacarosa y fitohormonas, permiten estimular la formación de lóbulos friables en los callos. Además, comenta el mismo autor, se deben relizar entre 4 a 6 subcultivos en el mismo medio de iniciación, para estimular la formación de callos friables e inhibir al mismo tiempo la manifestación temprana de la embriogénesis somática. Igualmente, establecieron que la calidad de tejido friable no es un carácter único y suficiente para definir una completa embriogénesis, también es preciso que el callo adquiriera una fuerte capacidad de proliferación.

Estudios posteriores realizados por el mismo autor, han demostrado que aunque la adición de kinetina y BAP en el medio de cultivo puede oscurecer el color de los callos en el medio de inducción de callogénesis, ambos reguladores promueven la inducción de la embriogénesis somática y la posterior conversión de los embriones a plántulas.

Estudios de tipo histológico realizados por Michaux - Ferriere y Carron (1989), citados por Cadavid. (2006), mostraron que entre los días 15 a 40, los callos son ricos en células polifenólicas lo cual reduce su potencial de multiplicación ocasionando dureza,

cambio de color y baja tasa de crecimiento del callo; a partir del día 40 los callos generalmente se vuelven necróticos debido al desbalance entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo.

Kamada, et ál., (1986), citado por Wahby, I. (2007), expresa que el cultivo *in vitro* es aplicado en la mejora agronómica, para realizar estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica, para la conservación de germoplasma, para la selección *in vitro* o hibridación somática, o para la introducción de nuevas características en las plantas mediante ingeniería genética (transformación genética). Finalmente, cabe mencionar que la importancia de disponer de un protocolo de cultivo y regeneración *in vitro* reside, igualmente, en su indispensabilidad como paso previo a la transformación de modo que de una o varias células transformadas sea posible obtener un individuo con las características deseadas

Flick, et ál, (1983) y Grattapaglia y Machado (1990), citados por Figueiredo y Esquivel, (1991), informaron que, en general, los medios de cultivo que contienen altas concentraciones de auxina y bajas concentraciones de citoquinina promover la proliferación celular que resulta en la formación de callos.

Pierik, 1990, citado por Daquinta, et ál., (2003), manifiesta que la mayor respuesta morfogénica puede ser atribuida a la mayor juvenilidad de las células del peciolo que las células de los segmentos distal.

El- Hadrami, and I. D`Auzac, (1992), citados por Cadavid. (2006), en su trabajo de investigación compararon diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP, y observaron que el suministro de estos reguladores de crecimiento mejora el potencial embriogénico comparado con el medio de control, en el cual no estaban presentes ambas hormonas.

2.2.1.4. Fases de la micropropagación.

2.2.1.4.1. Etapa de establecimiento del cultivo.

Ochoa, FAO. (1990), citado por Silva, L. (1998), manifiesta que para cultivar tejidos u órganos se sigue una serie de principios básicos. Para iniciar es necesario seleccionar y separar de la planta el material que se desea cultivar, posteriormente se procede a eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal, y por último se debe proporcionar a las células, tejidos u órganos un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuadas. Tanto la asepsia como la inoculación del material vegetal se deben realizar en un ambiente estéril.

2.2.1.4.2. Etapa de proliferación.

Botti, C. (1992), manifiesta que en esta etapa se observa un desarrollo de los meristemoides en los brotes o embriones inducidos en la etapa anterior, y una nueva inducción de yemas a partir de estos brotes, o nueva inducción de embriones a partir de los primeros.

2.2.1.4.3. Etapa de elongación.

Krikorian (1991), citado por Montero (1998), señala que en este estado, el explante se multiplica con la formación de callos o sin ella, según las condiciones del cultivo. La fase intermedia de la formación de callos se evita cuando se tienen fines de micropropagación debido al hecho ya ampliamente conocido, de que las plantas provenientes de callo pueden presentar diferentes grados de variación somaclonal.

2.2.1.4.4. Fase de enraizamiento in vitro.

Perea (1991), citado por Montero (1998), expresa que para el desarrollo de raíces, los brotes diferenciados requieren cambios en la composición del medio y en las condiciones de crecimiento.

2.2.2. Laurel Blanco (*Cordia alliodora* (Ruiz y Pavón) Oken)

2.2.2.1. Raíz.

Little, A. (1969), citado por INEFAN, (1995); CORMADERA – OIMT, (2001), expresa que el Laurel posee un sistema radicular grande y superficial, la raíz principal es amplia, profunda y fusiforme, que en pocos años se transforman en axonomorfias con lo que se convierte en un sistema radicular amplio y profundo con raíces laterales bien desarrolladas. Presenta raíces tablares bajas angostas.

2.2.2.2. Tallo.

CORMADERA – OIMT, (2001), menciona que cuando el laurel es joven el fuste es cilíndrico y recto y en su etapa madura algo acanalado y subcilíndrico. Puede presentar aletones pequeños sencibles al viento. La corteza es levemente de color café oscura cubierta de líquenes blancos. En su etapa de madurez es finamente fisurada longitudinalmente. La corteza interna (viva) es café –amarillenta clara, cambiando a pardo oscura muy rápidamente después de ser expuesta al aire, laminar y fibrosa, su grosor total es de ocho a quince milímetros.

Worldagroforestrycentre.org, (2010), expresa, “*Cordia alliodora* crece a más de 40 m. Fuste generalmente recto, cilíndrico, a menudo clara de ramas de hasta el 50-60% de la altura total del árbol. Puede o no puede ser reforzado, en suelos poco profundos, contrafuertes puede extenderse desde 1 hasta 1,5 m hasta el tronco. En los sitios buenos, *C. alliodora* normalmente alcanza un diámetro a la altura del pecho de 30 a 50 cm, aunque puede exceder de 1 m. Corteza lisa, de color verde cuando es joven, negro verdoso, lisa o con fisuras estrictamente al madurar. La delgada, oscurece duro, sin corteza pálida rápidamente sobre la exposición a la luz.”

2.2.2.3. Follaje.

Herbaria.plants.ox.ac.uk, (2010), expresa que el laurel tiene hojas simples, pecioladas y alternas, más o menos puntiagudas en la base, de hasta cinco centímetros de ancho y diez y ocho centímetros de longitud, con el envés cubierto de pelos estrellados.

CORMADERA – OIMT, (2001), señala que las hojas de laurel son simples, alternas, con peciolo peludos de dos a tres centímetros, oblongadas, enteras, acuminadas, dispuestas en espiral, agrupadas al final de las ramillas, no poseen estípulas, con una longitud de cinco hasta veinte centímetros y de dos a cinco centímetros de ancho; ásperas, de color verde oscuras y opacas por el haz; tomentosas y verdes más claras por el envés. Cubiertas por diminutos pelos estrellados.

2.2.2.4. Flores y frutos.

Little, A. (1969), citado por INEFAN. (1995), expresa que las flores en laurel son racimos florales (panículas grandes de diez a treinta centímetros de largo), las flores son blancas, fragantes, tubulares que se van tornando de color café. El fruto es una nuececilla de aproximadamente unos cinco milímetros de largo, con cáliz y corola persistentes, la que sirve como ala para la dispersión por el viento.

Según, Herbaria.plants.ox.ac.uk. (2010), las flores del laurel son de un centímetro de largo y ancho, con cinco pétalos blancos, se puede encontrar de cincuenta a tres mil flores por inflorescencia. Producen néctar y son polinizadas por abejas y otros insectos. Los pétalos se vuelven color café y actúan como un paracaídas para la dispersión por el viento. Aunque se utiliza el término semilla principalmente para describir la unidad de dispersión, técnicamente es un fruto seco. Generalmente se desarrolla solo un embrión por fruto.

2.2.2.5. Descripción de la semilla de laurel.

Little, A. (1969), citado por INEFAN, (1995), manifiesta que las semillas de *Cordia alliodora* pueden ser hasta cinco milímetros de longitud, llegando a existir de veinte mil a treinta mil semillas en un kilogramo. Con un 54% de humedad y hasta un 80% de poder germinativo.

Herbaria.plants.ox.ac.uk. (2010), menciona que el laurel produce mucha semilla, pero la época de recolección es crítica. Con el periodo extendido de floración hay que retrasar la recolección para maximizar la cantidad de semilla madura. Lo primero en caer del árbol son mayormente flores no fertilizadas (parecen vanas) y no semilla. El

tiempo óptimo de recolección es aproximadamente siete semanas después del momento en que las flores han abierto y los pétalos están blancos. Como regla general, la recolección de un árbol debe retrasarse hasta dos semanas después de que las últimas flores hayan abierto en ese árbol. La semilla está madura cuando el embrión está duro, como un grano de arroz, e inmadura si el embrión todavía está suave y translúcido. La semilla es predada (hasta 50% de semilla) por gorgojos brúchidos (*Amblycerus* spp.). La semilla atacada es obvia por el hoyo de deja al salir el gorgojo adulto y el grado de ataque varía entre años. Hay que secar la semilla durante 4-5 días bajo sombra y remover los gorgojos y la semilla atacada por ellos durante el venteo.

De acuerdo con Conabio.gob.mx, (2010), *Cordia alliodora* posee un porcentaje de germinación de 55 a 85 %. En 2 ó 3 semanas se obtiene un 80 % de germinación cuando las semillas frescas se siembran rápidamente (sin pretratamiento) y una viabilidad, latencia o longevidad a temperatura ambiente, la semilla pierde su viabilidad en un mes. Almacenadas en envases herméticamente sellados a 5 °C y 8 % de humedad se logra una viabilidad del 50 al 70 % por más de 14 meses.

Liegel, L.H. y Stead J.W. (1990), de acuerdo a la experiencia del Instituto de Dasonomía de Oxford, las semillas sin refrigerar pueden perder completamente su viabilidad en un período de 5 a 6 meses.

2.2.2.6. Descripción de los clones de laurel.

ENDESA y BOTROSA. (2011), explican que el Laurel (*Cordia alliodora*) es un árbol heliófito pionero del bosque neotropical. Endesa y Botrosa lo han plantado desde la década de los setenta. En ese material se han encontrado algunos árboles sobresalientes como para reproducir asexualmente. Este material genético superior y reproducir poblaciones con mejoramiento genético.

El mismo autor expresa que, en 1996 se inició un ensayo de reproducción asexual clonal mediante plántulas y estacas. En 1997 se inicia una producción de ensayo de varios individuos y en 1998 se establece el primer ensayo clonal de Laurel con 9 árboles al bulto. Actualmente el programa identifica 72 clones. Los árboles más grandes en una escala de cerca de 45 m de altura y 100 cm de DAP (diámetro a la altura del pecho, medido

a 1,30 m del suelo) en la edad adulta. El tallo es generalmente cilíndrico, recto, delgado y con frecuencia carecen de ramificaciones hasta en un 60% de la altura total del árbol, incluso en individuos que crecen aislados, la corteza de color blanco grisáceo a pardo. En 2007 se establece la primera plantación comercial que alcanza 80 hectáreas. Se establecieron 154 parcelas permanentes en la plantación de Laurel clonal, durante el 2008. Las parcelas son lineales de 25 individuos cada una. La secuencia de medición puede ser entre 1 y 3 años.

2.3. HIPÓTESIS.

La utilización de medios de cultivo in vitro determina un alto índice de formación de callo en hojas de laurel

2.4. VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.

Variable independiente: Medio de cultivo

Variable dependiente: Formación de callo

2.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

CUADRO 2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

CONCEPTO	INDICADORES	ÍNDICE
Variable dependiente		
<p align="center">Formación de callo</p> <p>Es el proceso por el cual las células vegetales crecidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse dando una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos.</p>	<p>Número de callos</p> <p>Días a la formación del callo</p> <p>Color del explante</p> <p>Color del callo</p> <p>Porcentaje de callos formados</p>	<p>Cantidad</p> <p>Número de días</p> <p>Matiz</p> <p>Matiz</p> <p>Porcentaje (%)</p>
Variable Independiente		
<p align="center">Medios de cultivo</p> <p>Un medio de cultivo consiste en una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir (bajo condiciones favorables de pH y temperatura) el crecimiento de organismos. Según qué se quiera hacer crecer, éste requerirá ciertas condiciones.</p>	<p align="center">Contenido</p> <p align="center">Químico</p>	<p align="center">Respuesta al estímulo del medio</p>

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3.1. ENFOQUE, MODALIDAD Y TIPO DE INVESTIGACIÓN.

Esta investigación es cualicuantitativa; cualitativa porque se analizó varias cualidades; cuantitativo, por cuanto todos los datos obtenidos se pudieron medir, procesar y ordenar en el transcurso de la investigación; modalidad de laboratorio, es decir, que la investigación se la realizó en el laboratorio de biotecnología de acuerdo al diseño experimental planteado

La investigación se realizó con un diseño experimental de acuerdo a los factores de estudio, este diseño fue apto a la investigación realizada y de fácil desarrollo; el tipo de investigación es experimental porque hace referencia al manejo de variables como son los medios de cultivo. Los resultados han sido enunciados en cuadros estadísticos tabulados, ordenados y explicados

3.2. UBICACIÓN DEL ENSAYO.

El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de micropropagación de la empresa Bosques Tropicales S.A. (BOTROSA), localizada en el sector de Guajaló, al Sur de la ciudad de Quito, provincia de Pichincha.

3.3. FACTORES DE ESTUDIO.

3.3.1. Clones de Laurel.

S27B	C1
R162A3	C2
R162A9	C3
P402C	C4

3.3.2. Medios de cultivo.

M1: 50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azucar

M2: 50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azucar + 2mg/l de 2,4-D

M3: 50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azucar + 2mg/l de 2,4-D + 1mg/l de BAP

M4: 50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azucar + 2mg/l de 2,4-D + 1mg/l de BAP + 100 mg/l de Caseína Hidrolizada

M5: 50% del medio Driver y Kuniyuki (DKW) + 30g/l de azucar

M6: 50% del medio Driver y Kuniyuki (DKW) + 30g/l de azúcar + 2mg/l de 2,4-D

M7: 50% del medio Driver y Kuniyuki (DKW) + 30g/l de azucar + 2mg/l de 2,4-D + 1mg/l de BAP

M8: 50% del medio Driver y Kuniyuki (DKW) + 30g/l de azucar + 2mg/l de 2,4-D + 1mg/l de BAP + 100 mg/l de Caseína Hidrolizada

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se utilizó un diseño de parcelas divididas, donde las parcelas fueron los clones y las subparcelas los medios de cultivo, con 5 repeticiones. Se realizó pruebas de significación de Tukey al 5% para las fuentes de variación que resultaron significativas.

3.5. TRATAMIENTOS.

Los tratamientos se detallan en el cuadro 3.

CUADRO 3. TRATAMIENTOS

TRATAMIENTOS		FACTORES DE ESTUDIO	
Nº	Símbolo	Clon	Medio de cultivo
1	C1M1	S27B	50% MS + 30g/l azúcar
2	C1M2	S27B	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D
3	C1M3	S27B	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP
4	C1M4	S27B	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP + 100 mg/l CH
5	C1M5	S27B	50% DKW + 30g/l azúcar
6	C1M6	S27B	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D
7	C1M7	S27B	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP
8	C1M8	S27B	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP + 100 mg/l CH
9	C2M1	R162A3	50% MS + 30g/l azúcar
10	C2M2	R162A3	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D
11	C2M3	R162A3	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP
12	C2M4	R162A3	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP + 100 mg/l CH
13	C2M5	R162A3	50% DKW + 30g/l azúcar
14	C2M6	R162A3	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D
15	C2M7	R162A3	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP
16	C2M8	R162A3	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP + 100 mg/l CH
17	C3M1	R162A9	50% MS + 30g/l azúcar
18	C3M2	R162A9	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D
19	C3M3	R162A9	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP
20	C3M4	R162A9	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP + 100 mg/l CH
21	C3M5	R162A9	50% DKW + 30g/l azúcar
22	C3M6	R162A9	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D
23	C3M7	R162A9	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP
24	C3M8	R162A9	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP + 100 mg/l CH
25	C4M1	P402C	50% MS + 30g/l azúcar
26	C4M2	P402C	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D
27	C4M3	P402C	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP
28	C4M4	P402C	50% MS + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP + 100 mg/l CH
29	C4M5	P402C	50% DKW + 30g/l azúcar
30	C4M6	P402C	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D
31	C4M7	P402C	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP
32	C4M8	P402C	50% DKW + 30g/l azúcar + 2mg/l 2,4-D + 1mg/l BAP + 100 mg/l CH

3.6. DISEÑO O ESQUEMA DE LABORATORIO.

3.6.1. Esquema de las unidades experimentales en el laboratorio.

CLON 1							
M1	M7	M5	M4	M6	M3	M2	M8
M4	M6	M7	M3	M8	M2	M5	M1
M6	M5	M8	M2	M4	M3	M1	M7
M7	M4	M2	M1	M5	M8	M3	M6
M3	M1	M6	M5	M7	M4	M8	M2

CLON 2							
M8	M2	M5	M3	M6	M4	M7	M1
M1	M5	M2	M8	M3	M7	M6	M4
M7	M1	M3	M4	M2	M8	M5	M6
M4	M7	M5	M8	M1	M2	M6	M3
M5	M6	M1	M3	M8	M4	M2	M7

CLON 3							
M3	M2	M6	M4	M8	M7	M1	M5
M1	M8	M6	M2	M5	M3	M4	M7
M2	M4	M8	M1	M3	M7	M6	M5
M6	M4	M1	M3	M7	M8	M5	M2
M1	M3	M2	M4	M5	M7	M6	M8

CLON 4							
M7	M3	M6	M8	M1	M2	M5	M4
M6	M3	M7	M2	M8	M5	M4	M1
M8	M2	M7	M3	M5	M1	M4	M6
M3	M8	M7	M4	M6	M1	M5	M2
M6	M1	M4	M8	M5	M2	M7	M3

GRÁFICO 1. Esquema de las unidades experimentales en el laboratorio

Características del ensayo experimental.

Número total de tratamientos:	32
Número de tratamientos para cada clon:	8
Número de repeticiones para cada tratamiento	5
Número total de unidades experimentales:	160
Número total de unidades experimentales/clon:	40
Volúmen de medio por unidad experimental:	50 ml
Volúmen total de medio de cultivo:	8 litros

3.7. DATOS TOMADOS.

3.7.1. Coloración del explante.

Esta variable se tomó considerando el color del explante, al momento de la introducción. El color del explante se comparó con la tabla Munsell para vegetales.

3.7.2. Días a la formación del callo.

Se contabilizó el número de días desde la siembra del explante hasta que se produzca la formación de callo hasta los 45 días.

3.7.3. Color del callo.

La variación de color del callo, se observó a los 15, 30 y 45 días. Esta variable se comparó con las tablas de Munsell para vegetales.

3.7.4. Número de callos.

Del total del tratamiento y las repeticiones de los explantes se contabilizó el número de callos formados desde la siembra hasta los 15, desde los 15 hasta los 30 y desde los 30 hasta los 45 días.

3.7.5. Porcentaje de callos formados.

El número de callos formados se expresaron en porcentaje.

3.8. MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN.

3.8.1. Obtención y almacenamiento de las hojas de laurel.

La obtención de las hojas de laurel se realizó de las plántulas existentes en el vivero del laboratorio de la empresa BOTROSA de aproximadamente un año de edad, las

mismas que se mantubieron en condiciones adecuadas de humedad y temperatura durante toda la fase de desarrollo de la investigación.

3.8.2. Preparación de los medios de cultivo.

Se prepararon los medios DKW y MS con las sales y en las cantidades que se expresan en el cuadro 3, con un pH de 5,5. Posteriormente de realizados los cálculos de las necesidades de sales minerales se añadió a cada uno de los medios de cultivo azúcar, 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), BAP (benzilaminopurina) y Caseína Hidrolizada en las concentraciones establecidas anteriormente, teniendo en cuenta los protocolos de los medios a utilizarse.

- Una vez escogida la formulación del medio de cultivo, se procedió a su preparación.
- Se preparon las soluciones stock concentradas de las distintas sales minerales, agrupados de forma que no se produzcan fenómenos de precipitación. Para esto se trabaja con una solución stock de macronutrientes, una de micronutrientes, una de hierro con un agente quelante, otra de vitaminas, así como con soluciones específicas para los demás componentes del medio.
- Una vez obtenido el volumen de medio deseado se procedió a ajustar su pH al valor prefijado mediante la adición de NaOH y/o HCl 0.1-1 N.
- A continuación, se añadió el agente solidificante, se disolvió por calentamiento breve para, finalmente, ser dosificado en los contenedores adecuados. Como se señala en el cuadro 4.

CUADRO 4. SALES DE LOS MEDIOS DKW Y MS.

Sales minerales	(Murashige and Skoog, 1962)	DKW modificado
	g/l	
$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	1.650	1.416
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$		1.811
KNO_3	1.900	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.440	0.147 (1.960 si es 4 H_2O)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.370	0.74
KH_2PO_4	0.170	0.258
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0278	0.00676
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0372	0.0908
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0169	0.0338
K_2SO_4		1.56
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0086	0.0212
H_3BO_3	0.0062	0.0124
KI	0.00083	0.00166
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00025	0.0005
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.000025	0.00005
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.000025	0.00005
Mioinositol	0.100	0.1
Tiamina HCl	0.0001	0.001
Acido nicotínico	0.0005	0.001
Piridoxina HCl	0.0005	0.001
Glicina	0.002	
Biotina D(+)		0.00001
Glutamina (base libre)		0.001
L-Cysteína H Cl		0.001
Pantotenato de Ca		0.1

3.8.3. Traspaso del medio (verter en los frascos).

El medio se vertió en cajas Petri esterilizadas, aproximadamente 50 ml por caja, esto se realizó dentro de la cámara de flujo laminar.

Fue mejor verter el medio cuando éste no se encontraba muy caliente, así se evitó una alta condensación.

Por último se tapó la caja Petri teniendo en cuenta que no exista ingreso de aire, y evitar la contaminación del medio.

3.8.4. Esterilización de la cámara.

Es muy importante que para realizar una práctica de laboratorio éste se encuentre completamente desinfectado desde el inicio hasta el final de la práctica, al igual que los medios de cultivo, frascos o cajas y los explantos vegetales. La esterilización de los medios y los frascos se la realizó en el autoclave por 15 minutos a 120° C y 15 atm de presión

3.8.5. Uso de la cámara de flujo laminar

Primero se la desinfectó completamente con alcohol (etanol) al 90% de concentración. La dispersión del alcohol se la realizó con un atomizador y un paño de algodón para limpiar los alrededores de la cámara, la desinfección se realizó antes y después de utilizar la cámara.

3.8.6. Siembra del explante

Antes de extraer los explantes se hizo una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se mantuvo en condiciones de asepsia. Ya en condiciones de asepsia, en la cámara de flujo laminar, se extrajeron los explantes del material vegetal y se colocaron en un medio de iniciación dentro de una caja Petri, para poder controlar la sanidad y la viabilidad de los explantes. Se sembraron los fragmentos de hojas de 1 cm largo por 1cm de ancho, es decir, de 1x1, en número de 5 en forma de cruz por tratamiento.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS, ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISCUSIÓN

4.1. Coloración del explante

Los datos de coloración del explante se presentan en el anexo 1. Luego de haber comparado los diferentes colores en los respectivos clones se puede mencionar que cada uno de ellos presenta un color característico y existe una variación entre ellos.

CUADRO 5. COLORACIÓN DEL EXPLANTE POR CADA CLON

Clon	Color
C1	5 GY 1/6
C2	5 GY 4/6
C3	5 GY 7/8
C4	2,5 G 1/8

En el cuadro 5 se detallan los datos de color del explante, característica fenológica del laurel, en el cual se determinó que el clon S27B (C1), presenta el color 5GY 1/6, es decir, GY, tejido color verde amarillento, tonalidad 5, valor 1 y saturación 6. El clon R162A3 (C2), tiene el color 5GY 4/6, lo que representa, GY, tejido color verde amarillento, tonalidad 5, valor 4 y saturación 6. El clon R162A9 (C3), muestra el color 5GY 7/8, lo que simboliza, GY, tejido color verde amarillento, tonalidad 5, valor 7 y saturación 8. El clon P402C (C4), posee el color 2,5G 1/8, lo que representa, G, tejido color verde, tonalidad 2,5, valor 1 y saturación 8.

4.2. Días a la formación del callo.

4.2.1. Días a la formación de callos hasta los 15 días.

CUADRO 6. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO HASTA LOS 15 DÍAS.

F.V.	SC	GL	CM	F
Repeticiones	21,46	4	5,37	2,32 n.s
Clones (C)	171,32	3	57,11	24,67 **
Error A	40,09	12	3,34	
Medios de cultivo (M)	438,99	7	62,71	27,09 **
C x M	131,13	21	6,24	2,70 **
Error B	259,25	112	2,31	
Total	1062,24	159		

Coefficiente de variación = 11,82%

Media = 12,87 días

ns = no significativo

** = Altamente significativo

En base a los datos del anexo 2 se realizó el análisis de varianza (cuadro 6), en el que se registraron diferencias estadísticas al 1%, para las fuentes de variación: clones, medios de cultivo y la interacción de ambos; y la no significación para repeticiones. El coeficiente de variación fue de 11,82% demostrando que el experimento se llevó adecuadamente. El promedio de días a la formación del callo fue de 12,87.

CUADRO 7. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO HASTA LOS 15 DÍAS.

Clones	Medias	Rangos
C4	11,33	a
C3	12,53	b
C2	13,80	c
C1	13,83	c

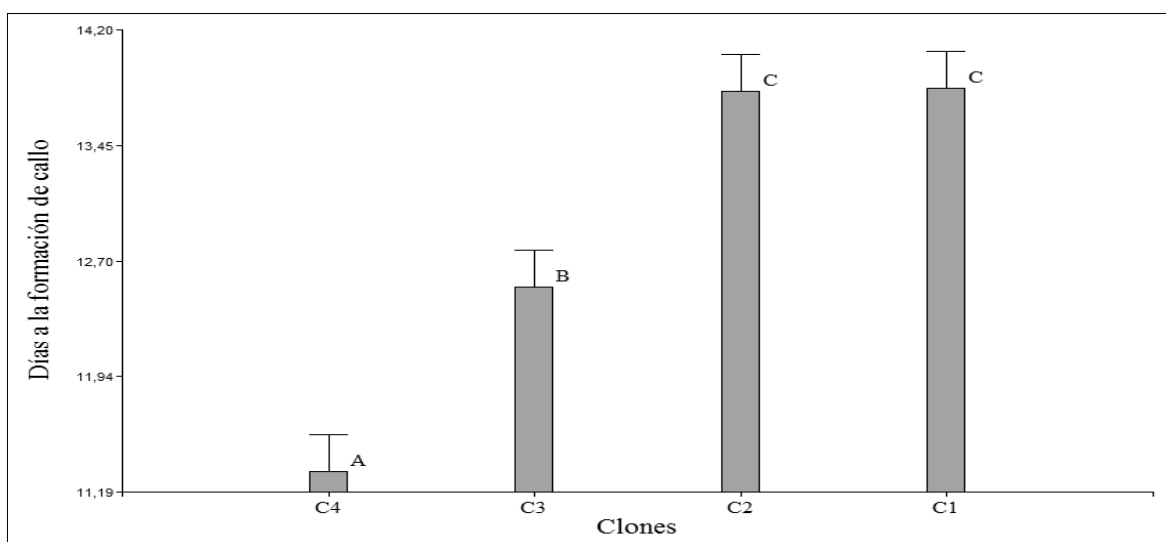


GRÁFICO 2. Prueba de significación de Tukey al 5% para clones en la variable días a la formación de callo hasta los 15 días.

La prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Clones (cuadro 7 y gráfico 2), detecta tres rangos de significación. En el primer rango se ubica el Clon 4 con una media de 11,33 días a la formación de callo y en el último rango aparecen los Clones C2 y C1, con una media de 13,80 y 13,83 días a la formación de callo respectivamente.

CUADRO 8. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO HASTA LOS 15 DÍAS.

Medios de cultivo	Medias	Rangos
M3	10,55	a
M4	11,20	a
M8	11,60	a
M7	11,85	a
M6	13,75	b
M2	14,00	b
M1	-	-
M5	-	-

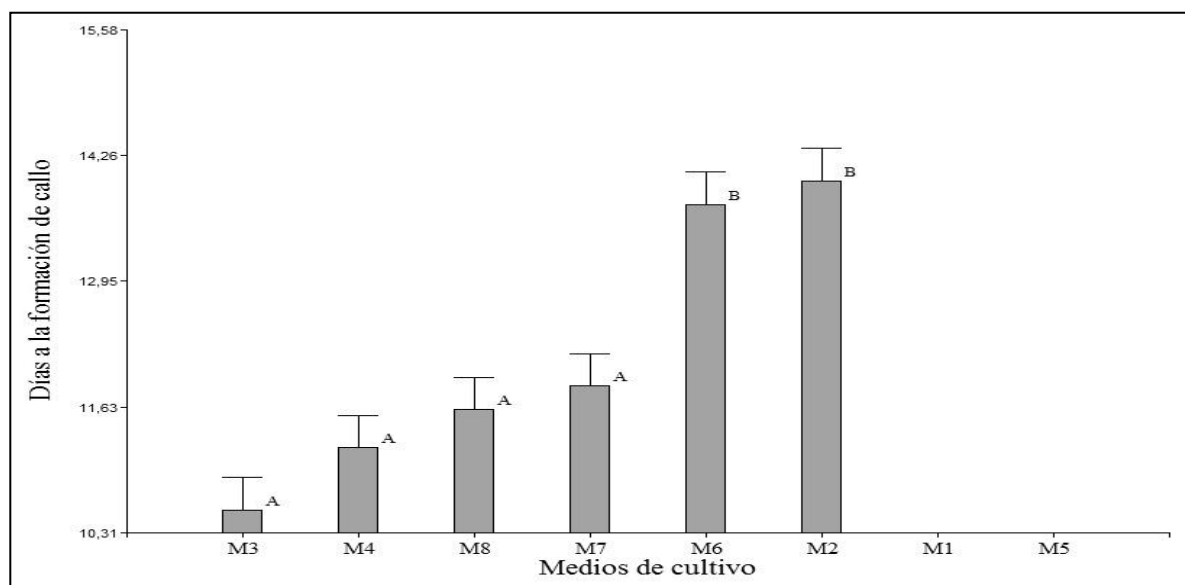


GRÁFICO 3. Prueba de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo en la variable días a la formación de callo hasta los 15 días.

Aplicando la prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Medios de cultivo (cuadro 8 y gráfico 3), revela dos rangos de significación. En el primer rango se sitúan los medios M3, M4, M8 y M7. Sobresaliendo el medio M3 con una media de 10,55 días a la formación de callo. En el segundo rango se presentan los medios M6, M2 y

finalmente los medios M1 y M5, éstos dos últimos llegando hasta los 15,00 días sin haber formado callo.

CUADRO 9. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CxM) EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO HASTA LOS 15 DÍAS.

Tratamientos	Medias	Rangos
C4M3	8,40	a
C4M8	8,40	a
C4M4	8,80	a b
C4M7	9,20	a b c
C3M7	9,60	a b c d
C3M4	10,80	a b c d e
C3M3	11,00	a b c d e
C1M3	11,00	a b c d e
C2M3	11,80	a b c d e f
C3M8	12,00	a b c d e f
C2M4	12,40	b c d e f
C4M6	12,60	c d e f
C1M8	12,60	c d e f
C1M4	12,80	c d e f
C4M2	13,20	d e f
C3M2	13,40	e f
C3M6	13,40	e f
C2M8	13,40	e f
C2M6	14,00	e f
C1M7	14,20	e f
C2M7	14,40	e f
C2M2	14,40	e f
C4M5	-	-
C1M2	-	-
C4M1	-	-
C3M1	-	-
C3M5	-	-
C1M1	-	-
C2M1	-	-
C1M5	-	-
C2M5	-	-
C1M6	-	-

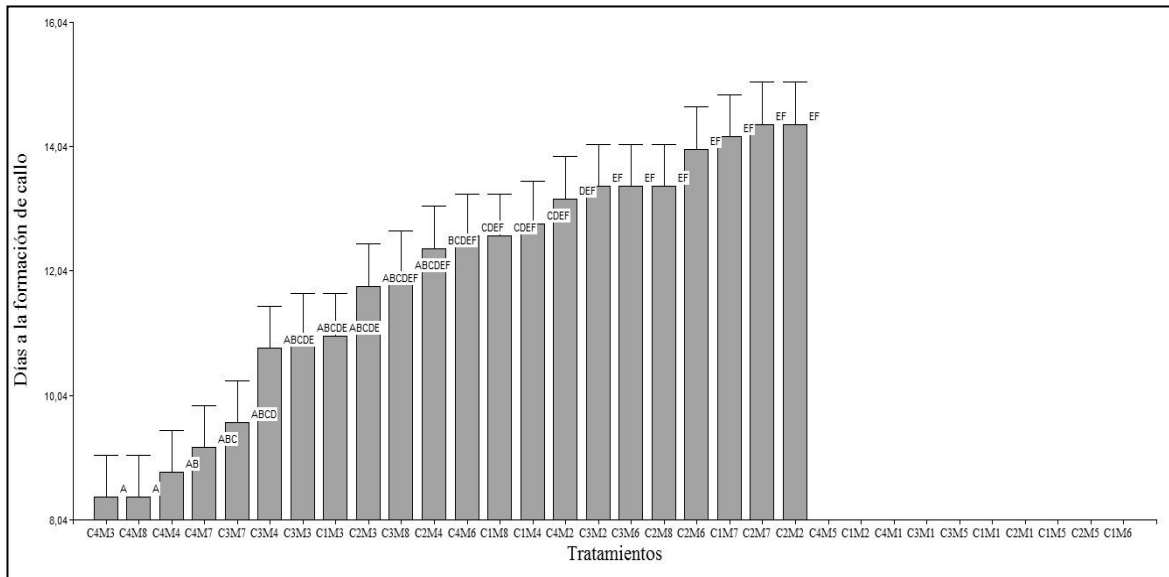


GRÁFICO 4. Prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción clones por medios de cultivo (CxM), en la variable días a la formación de callo hasta los 15 días.

Realizando la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción Clones por Medios de cultivo (cuadro 9 y gráfico 4), muestra seis rangos de significación. Sobresaliendo en el primer rango el tratamiento que incluye al Clon C4 y al medio de cultivo M3 y el tratamiento que envuelve al Clon C4 y al medio de cultivo M8, ambos tratamientos presentan una media de 8,40 días a la formación de callo. Y por último se ubican los tratamientos C4M5, C1M2, C4M1, C3M1, C3M5, C1M1, C2M1, C1M5, C2M5 y C1M6, todos ellos llegando al día 15,00 sin haber formado callo.

Es probable que la adición de una adecuada concentración de 2,4-D en el medio de inducción haya incrementado la formación de callos en los explantes de las hojas de laurel, como sucedió en la presente investigación, lo que se puede consolidar con lo mencionado por Ayerbe, L. (1990), que las auxinas generalmente producen elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. Mientras que las citoquininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina.

4.2.2. Días a la formación de callos desde los 15 hasta los 30 días.

CUADRO 10. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO DESDE LOS 15 HASTA LOS 30 DÍAS.

F.V.	SC	GL	CM	F
Repeticiones	126,66	4	31,67	3,82 n.s
Clones	258,52	3	86,17	10,39 **
Error A	132,64	12	11,05	
Medios de cultivo	1310,29	7	187,18	22,56 **
C x M	381,23	21	18,15	2,19 **
Error B	929,10	112	8,30	
Total	3138,44	159		

Coefficiente de variación = 11,50%

Media = 25,83 días

ns = no significativo

** = Altamente significativo

En base a los datos del anexo 3 se efectuó el análisis de varianza (cuadro 10), en el que se obtuvieron diferencias estadísticas al 1%, para las fuentes de variación: clones, medios de cultivo y la interacción de ambos; y la no significación para repeticiones. El coeficiente de variación fue de 11,50% demostrando que la investigación se realizó adecuadamente. El promedio de días a la formación del callo fue de 25,83.

CUADRO 11. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO DESDE LOS 15 HASTA LOS 30 DÍAS.

Clones	Medias	Rangos
C4	24,08	a
C3	25,18	a
C1	26,90	b
C2	27,18	b

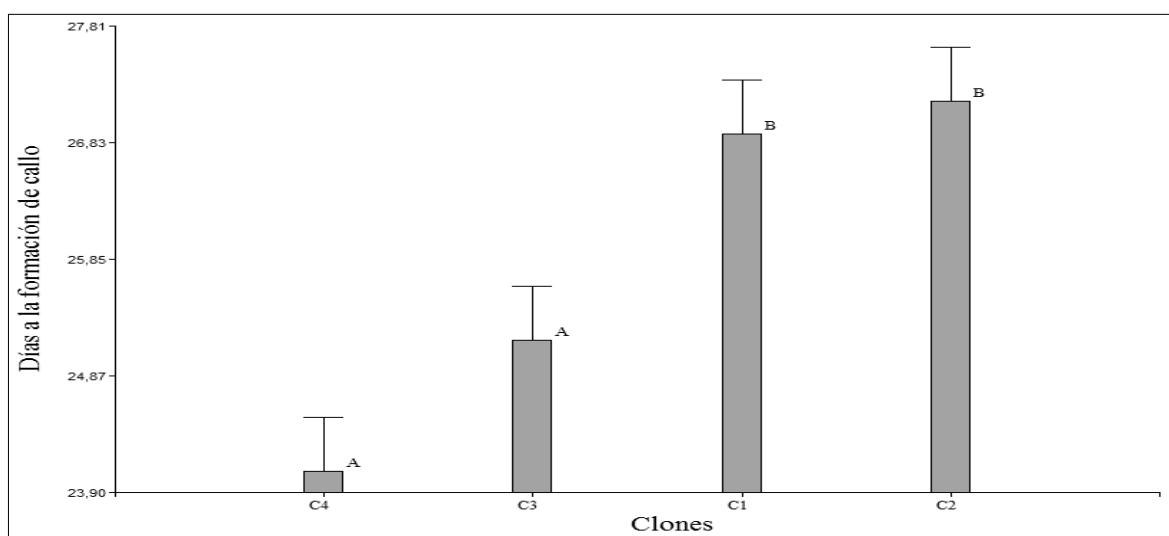


GRÁFICO 5. Prueba de significación de Tukey al 5% para clones en la variable días a la formación de callo desde los 15 hasta los 30 días.

La prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Clones (cuadro 11 y gráfico 5), muestra dos rangos de significación. En el primer rango se ubica el Clon 4 con una media de 24,08 días a la formación de callo y en el último rango aparecen los Clones C1 y C2, con una media de 26,90 y 27,18 días a la formación de callo respectivamente.

CUADRO 12. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO DESDE LOS 15 HASTA LOS 30 DÍAS.

Medios de cultivo	Medias	Rangos
M3	21,70	a
M8	23,40	a b
M4	23,60	a b
M7	24,65	b c
M6	26,10	b c
M2	27,30	c d
M1	29,90	d
M5	-	-

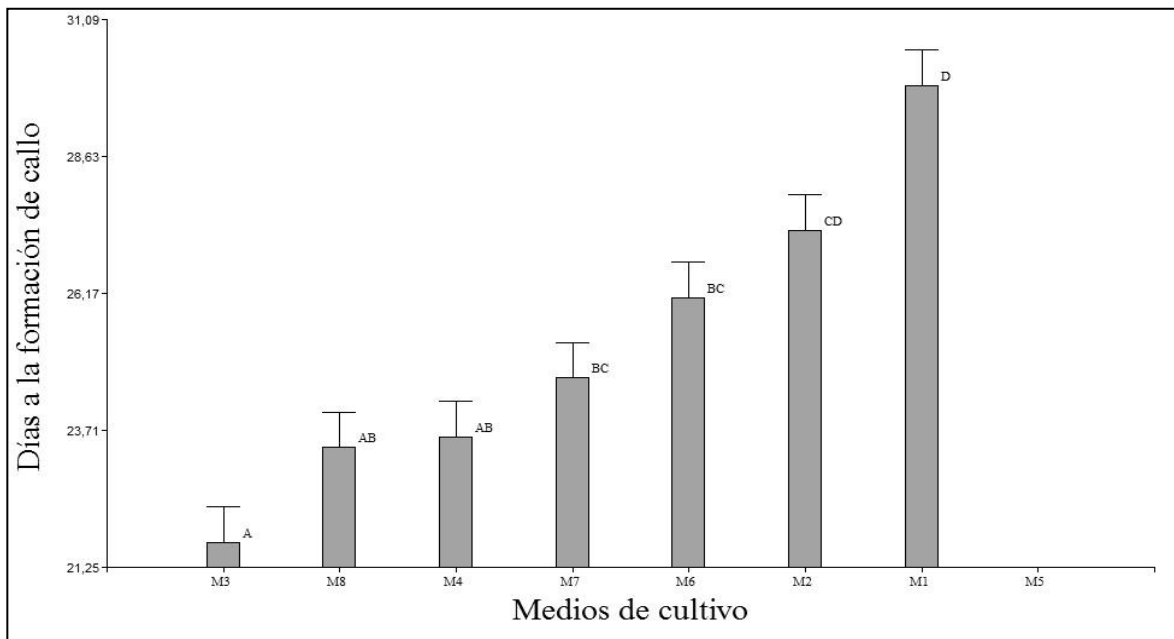


GRÁFICO 6. Prueba de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo en la variable días a la formación de callo desde los 15 hasta los 30 días.

Realizando la prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Medios de cultivo (cuadro 12 y gráfico 6), se determina cuatro rangos de significación. En el primer rango se sitúan los medios M3, M8, M4, sobresaliendo el medio M3 con una media de 21,70 días a la formación de callo. Mientras que en el último rango se presentan el medio M1 y finalmente el medio M5 alcanzando los 30,00 días sin haber formado callo.

CUADRO 13. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CxM) EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO DESDE LOS 15 HASTA LOS 30 DÍAS.

Tratamientos	Medias	Rangos
C4M3	17,40	a
C4M8	19,60	a b
C3M8	20,40	a b c
C3M4	22,20	a b c d
C3M3	22,40	a b c d
C1M3	22,40	a b c d
C3M7	22,40	a b c d
C4M7	22,80	a b c d e
C4M4	23,20	a b c d e f
C4M6	24,00	a b c d e f
C1M4	24,40	a b c d e f
C1M8	24,40	a b c d e f
C2M6	24,60	b c d e f
C2M3	24,80	b c d e f
C1M7	25,00	b c d e f
C4M2	25,60	b c d e f
C2M2	26,40	b c d e f
C2M4	26,40	b c d e f
C3M6	26,80	c d e f
C2M8	27,20	c d e f
C3M2	27,20	c d e f
C2M7	28,40	d e f
C1M6	29,00	d e f
C2M1	29,60	e f
C1M2	-	-
C1M1	-	-
C3M1	-	-
C3M5	-	-
C2M5	-	-
C1M5	-	-
C4M5	-	-
C4M1	-	-

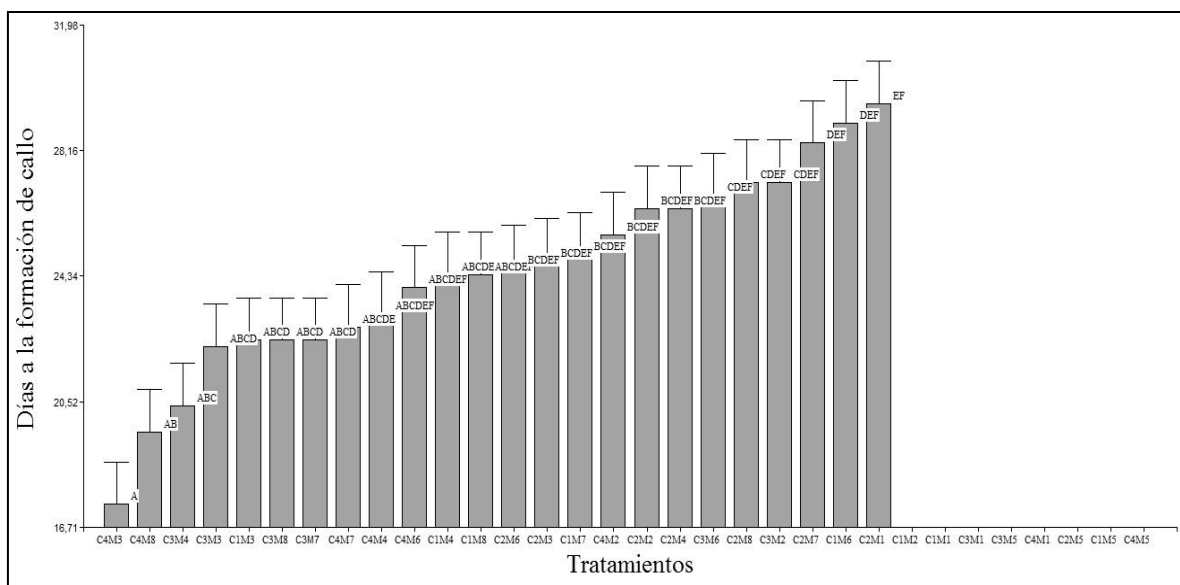


GRÁFICO 7. Prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción clones por medios de cultivo (CxM) en la variable días a la formación de callo desde los 15 hasta los 30 días.

Aplicando la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción Clones por Medios de cultivo (cuadro 13 y gráfico 7), muestra seis rangos de significación. Resaltando en el primer rango el tratamiento que incluye al Clon C4 y al medio de cultivo M3, dicho tratamiento presenta una media de 17,40 días a la formación de callo. Mientras que los tratamientos C1M2, C1M1, C3M1, C3M5, C2M5, C1M5, C4M5, C4M1, llegando al día 30,00 sin haber formado callo a partir del día 15,00.

Seguramente la combinación de 2,4-D y BAP en el medio de inducción de callo en concentraciones apropiadas haya estimulado la división celular provocando la formación de callos en los medios que contienen estas hormonas, lo cual se puede aseverar con lo argumentado por Kole. (2007), las fases sucesivas en la embriogénesis son callogénesis, diferenciación, multiplicación y regeneración de plantas. Esto se produce gracias a la sabia combinación de 2,4-D (Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético) y BAP (Bencil aminopurina) y un aumento en la concentración de sacarosa lo que promueve la estimulación de callogénesis en la oscuridad.

4.2.3. Días a la formación de callos desde los 30 hasta los 45 días.

CUADRO 14. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO DESDE LOS 30 HASTA LOS 45 DÍAS.

F.V.	SC	GL	CM	F
Repeticiones	52,84	4	13,21	1,69 n.s
Clones	127,87	3	42,62	5,45*
Error A	93,91	12	7,83	
Medios de cultivo	1155,54	7	165,08	21,92 **
C x M	584,18	21	27,82	3,69 **
Error B	843,65	112	7,53	
Total	2857,99	159		

Coefficiente de variación = 6,64%

Media = 41,31 días

ns = no significativo

* = significativo

** = altamente significativo

De los datos del anexo 4 se realizó el análisis de varianza (cuadro 14), del cual se obtuvo diferencias estadísticas al 5%, para la fuente de variación: clones, al 1% para medios de cultivo e interacción (CxM); y la no significación para repeticiones. El coeficiente de variación llegó a ser de 6,64%. La media fue de 41,31 días.

CUADRO 15. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO DESDE LOS 30 HASTA LOS 45 DÍAS.

Clones	Medias	Rangos
C4	40,53	a
C3	40,73	a
C1	41,18	a
C2	42,80	b

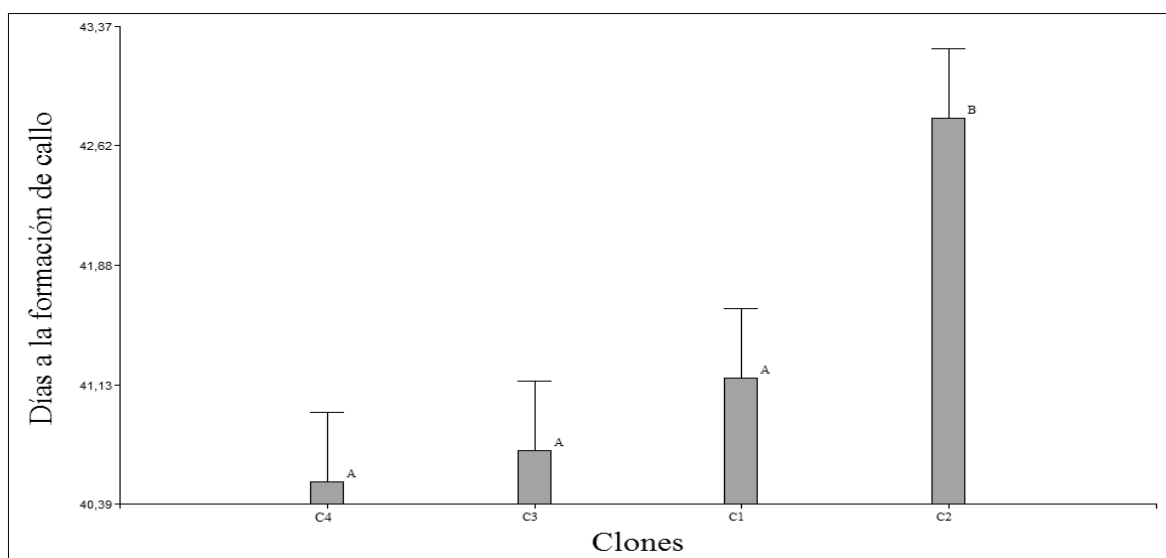


GRÁFICO 8. Prueba de significación de Tukey al 5% para clones en la variable días a la formación de callo desde los 30 hasta los 45 días.

Realizando la prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Clones (cuadro 15 y gráfico 8), se observa dos rangos de significación. En el primer rango se ubican los clones C4, C3 y C1, destacando de ellos el Clon 4 con un promedio de 40,53 días a la formación de callo y en el último rango aparece el Clon C2, con una media de 42,80 días.

CUADRO 16. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO DESDE LOS 30 HASTA LOS 45 DÍAS.

Medios de cultivo	Medias	Rangos
M7	37,60	a
M8	38,85	a
M3	39,25	a
M4	39,60	a b
M2	42,15	b c
M6	43,00	c d
M5	-	-
M1	-	-

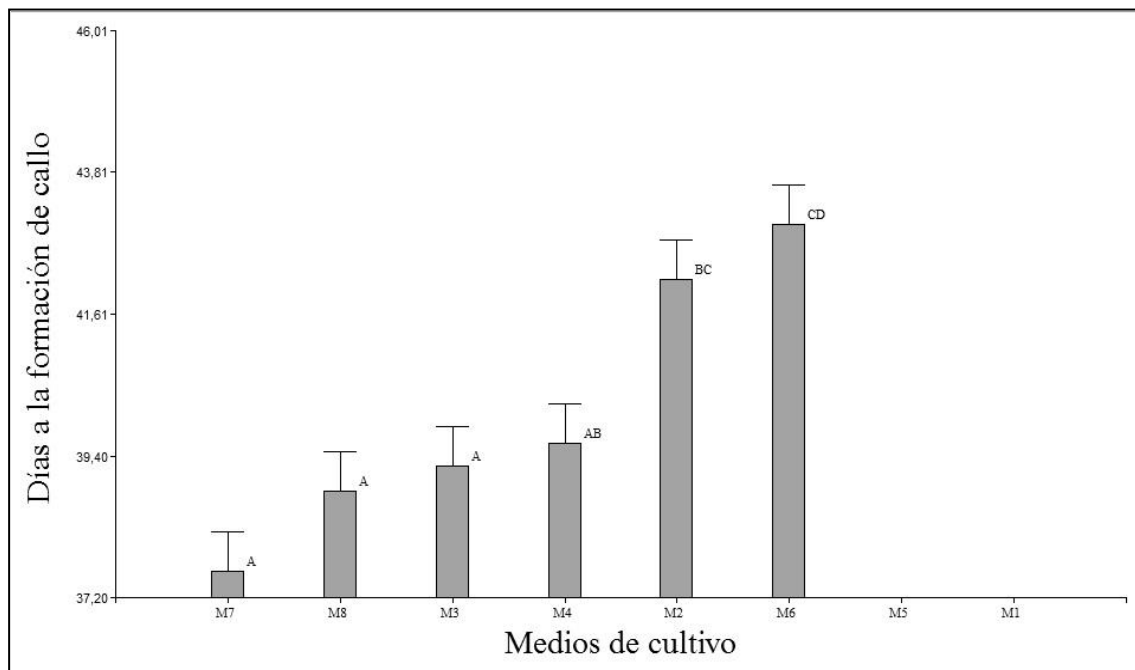


GRÁFICO 9. Prueba de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo en la variable días a la formación de callo desde los 30 hasta los 45 días.

Utilizando la prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Medios de cultivo (cuadro 16 y gráfico 9), muestra cuatro rangos de significación. En el primer rango se sitúan los medios M7, M8, M3 y M4. Sobresaliendo el medio M7 con una media de 37,60 días a la formación de callo. En el segundo y tercer rango se presentan los medios M2, M6 y finalmente los medios M5 y M1 alcanzando los 45,00 días sin haber formado callo desde el día 30,00.

CUADRO 17. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CxM) EN LA VARIABLE DÍAS A LA FORMACIÓN DE CALLO DESDE LOS 30 HASTA LOS 45 DÍAS.

Tratamientos	Medias	Rangos
C1 M7	34,00	a
C4 M8	35,20	a b
C3 M7	36,80	a b c
C4 M7	36,80	a b c
C3 M8	37,40	a b c
C3 M4	37,40	a b c
C1 M8	37,80	a b c
C4 M3	38,00	a b c
C1 M3	38,20	a b c
C4 M4	38,40	a b c d
C1 M4	39,40	a b c d
C2 M2	39,80	a b c d
C3 M3	40,40	a b c d
C2 M3	40,40	a b c d
C3 M2	41,20	b c d
C2 M6	41,20	b c d
C3 M6	42,60	c d
C4 M2	42,60	c d
C2 M7	42,80	c d
C2 M4	43,20	c d
C4 M6	43,20	c d
C4 M5	-	-
C4 M1	-	-
C1 M6	-	-
C1 M5	-	-
C1 M2	-	-
C1 M1	-	-
C2 M1	-	-
C3 M5	-	-
C3 M1	-	-
C2 M8	-	-
C2 M5	-	-

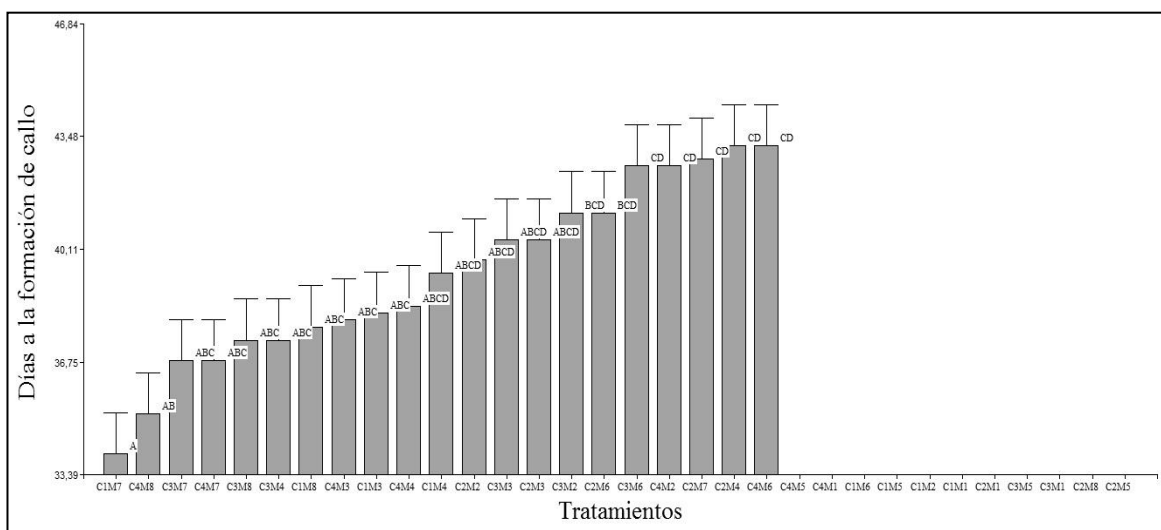


GRÁFICO 10. Prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción clones por medios de cultivo (CxM), en la variable días a la formación de callo desde los 30 hasta los 45 días.

Usando la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción Clones por Medios de cultivo (cuadro 17 y gráfico 10), revela cuatro rangos de significación. Sobresaliendo en el primer rango el tratamiento que incluye al Clon C1 y al medio de cultivo M7, dicho tratamiento presenta una media de 34,00 días a la formación de callo. Mientras que los tratamientos C4M5, C4M1, C1M6, C1M5, C1M2, C1M1, C2M1, C3M5, C3M1, C2M8, C2M5 se ubican al final de la tabla, sin haber formado callo desde los 30 días hasta el final de la investigación.

Probablemente la adición de fitohormonas en los medios de cultivo actuó sobre los tejidos meristemáticos de los explantes de laurel induciendo la proliferación de células somáticas y por lo tanto reduciendo el tiempo en formación de callo en hojas de laurel de acuerdo a los estudios de tipo histológico realizados por Michaux - Ferriere (1989), citados por Cadavid. (2006), mostrando que entre los 15 a 40 días, los callos son ricos en células polifenólicas lo cual reduce su potencial de multiplicación ocasionando dureza, cambio de color y baja tasa de crecimiento del callo; a partir del día 40 los callos generalmente se vuelven necróticos debido al desbalance entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo.

4.3. Color del callo.

CUADRO 18. COLOR DEL CALLO A LOS 15, 30 y 45 DÍAS.

Tratamientos		Color predominante a los 15	Color predominante a los 30	Color predominante a los 45
		días	días	días
Nº	Símbolo			
1	C1M1	N.C	N.C	N.C
2	C1M2	N.C	N.C	N.C
3	C1M3	5 GY 2/6	7,5 YR 9/2	7,5 YR 7/2
4	C1M4	5 GY 2/6	5 Y 2/4	5 Y 2/6
5	C1M5	N.C	N.C	N.C
6	C1M6	7,5Y 9/2	5 GY 2/6	5 GY 2/6
7	C1M7	7,5 YR 9/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 7/2
8	C1M8	7,5 YR 9/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 7/4
9	C2M1	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	7,5 YR 8/6
10	C2M2	7,5 YR 9/4	7,5 Y 6/8	5 Y 2/6
11	C2M3	7,5 YR 9/4	5 GY 2/6	5 Y 2/6
12	C2M4	7,5 YR 8/2	5 Y 2/4	7,5 YR 7/2
13	C2M5	N.C	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/6
14	C2M6	7,5 Y 6/4	5 GY 2/6	5 Y 2/6
15	C2M7	7,5 YR 9/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 7/2
16	C2M8	5 YR 4/6	5 Y 2/4	5 YR 4/6
17	C3M1	5 Y 3/6	5 Y 3/6	5 Y 2/6
18	C3M2	5 GY 2/6	7,5 Y 6/8	7,5 Y 6/8
19	C3M3	5 GY 2/6	7,5 YR 8/4	7,5 YR 7/2
20	C3M4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 9/2	7,5 YR 7/2
21	C3M5	N.C	N.C	N.C
22	C3M6	5 Y 2/4	5 YR 2/6	7,5 Y 7/6
23	C3M7	7,5 YR 9/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 7/2
24	C3M8	7,5 YR 9/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 7/4
25	C4M1	5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4
26	C4M2	5 GY 2/6	5 GY 2/6	7,5 YR 7/4
27	C4M3	7,5 YR 6/4	5 GY 2/6	5 Y 2/6
28	C4M4	7,5 YR 7/4	5 GY 2/6	7,5 YR 7/2
29	C4M5	N.C	N.C	N.C
30	C4M6	7,5 Y 6/4	7,5 Y 7/6	7,5 YR 7/4
31	C4M7	7,5 YR 9/4	5 GY 2/6	7,5 YR 7/2
32	C4M8	7,5 YR 9/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 7/2

N.C., no existe formación de callo.

Los datos obtenidos de color de callo hasta los 15, 30 y 45 días se presentan en los anexos 5, 6 y 7 respectivamente. Luego de haber analizado los mismos con la información de la tabla de colores de Munsell para tejidos vegetales se muestra en el cuadro 18 los resultados de colores que predominan para cada tratamiento.

Los resultados de coloración muestran que, entre los tratamientos más representativos a la formación de callo, el tratamiento 7, C1M7 presenta a los 15 días la coloración 7,5 YR 9/4 lo que significa, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 9 y saturación 4, a los 30 días el color varió a 7,5 YR 8/4, es decir, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 8 y saturación 4, finalmente a los 45 días el color llegó a ser 7,5 YR 7/2 lo que figura, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 7 y saturación 2. En consecuencia se puede decir que el color del callo varió en valor y saturación, siendo a los 15 días más claro y llegando a los 45 días un color más oscuro.

El tratamiento 20, C3M4 presenta a los 15 días la coloración 7,5 YR 7/4 lo que significa, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 7 y saturación 4; a los 30 días el color varió a 7,5 YR 9/2, es decir, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 9 y saturación 2 y finalmente a los 45 días el color llegó a ser 7,5 YR 7/2 lo que figura, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 7 y saturación 2. De lo que se puede manifestar que el color del callo en éste tratamiento varió en valor y saturación, siendo a los 15 días más claro y llegando a los 45 días un color más oscuro.

El tratamiento 23, C3M7 exhibe a los 15 días la coloración 7,5 YR 9/4 lo que significa, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 9 y saturación 4; a los 30 días el color varió a 7,5 YR 8/4, es decir, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 8 y saturación 4 y finalmente a los 45 días el color fue 7,5 YR 7/2 lo que es, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 7 y saturación 2. Por lo tanto se expresa que el color del callo en éste tratamiento se alteró en valor y saturación, siendo a los 15 días más claro y alcanzando a los 45 días un color más opaco.

El tratamiento 24, C3M8 muestra a los 15 días la coloración 7,5 YR 9/4 lo que figura, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 9 y saturación 4; a los 30 días el color varió a 7,5 YR 8/4, lo que se refiere, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 8 y saturación 4 y finalmente a los 45 días el color fue 7,5 YR 7/4 lo que

significa, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 7 y saturación 2. Por lo tanto se expresa que el color del callo en éste tratamiento se alteró en valor y saturación, siendo a los 15 días más claro y alcanzando a los 45 días un color más oscuro.

El tratamiento 27, C4M3 muestra a los 15 días la coloración 7,5 YR 6/4 lo que figura, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 6 y saturación 4; a los 30 días el color cambió a 5 GY 2/6, lo que se refiere, GY, tejido color verde amarillento, tonalidad 5, valor 2 y saturación 6 y finalmente a los 45 días el color fue 5 Y 2/6 lo que es, Y, tejido color amarillento, tonalidad 5, valor 2 y saturación 6. Por lo tanto se expresa que el color del callo en éste tratamiento varió, siendo a los 15 días amarillo rojizo y llegando a modificarse a los 45 días a color amarillo.

El tratamiento 28, C4M4 a los 15 días presenta la coloración 7,5 YR 7/4 lo que significa, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 7 y saturación 4; a los 30 días el color se modificó a 5 GY 2/6, lo que se refiere, GY, tejido color verde amarillento, tonalidad 5, valor 2 y saturación 6 y finalmente a los 45 días el color fue 7,5 YR 7/2 lo que es, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 5, valor 27 y saturación 6. Por lo tanto se puede indicar que el color del callo en éste tratamiento cambió, siendo a los 15 días amarillo rojizo, más claro que a los 45 días.

El tratamiento 31, C4M7 a los 15 días muestra la coloración 7,5 YR 9/4 lo que significa, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 9 y saturación 4; a los 30 días el color varió a 5 GY 2/6, lo que es, GY, tejido color verde amarillento, tonalidad 5, valor 2 y saturación 6, por último a los 45 días el color fue 7,5 YR 7/2 lo que es, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 7 y saturación 2. De acuerdo a lo mencionado anteriormente se puede decir que el color del callo en éste tratamiento cambió, siendo a los 15 días amarillo rojizo, de una tonalidad menos oscuro que a los 45 días.

El tratamiento 32, C4M8 a los 15 días manifiesta una coloración 7,5 YR 9/4 lo que significa, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 9 y saturación 4; a los 30 días el color cambió a 7,5 YR 8/4, lo que es, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 8 y saturación 4, y, finalmente a los 45 días el color fue 7,5 YR 7/2 lo que es, YR, tejido color amarillo rojizo, tonalidad 7,5, valor 7 y saturación 2. Conforme a lo indicado anteriormente se puede decir que el color del callo en éste tratamiento cambió, siendo a los

15 días amarillo rojizo, de una tonalidad clara comparándola con la presentada a los 45 días.

Seguramente al agregar 2,4-D y BAP en los medios de inducción de callo y con tiempo de incubación empleado haya estimulado el desarrollo del callo y el cambio de color, haciéndolos más oscuros durante el tiempo que duró el trabajo de investigación, lo que se aprueba con los estudios realizados por Carron, et ál, (1988), citados por Cadavid, (2006), que han demostrado que la adición de kinetina y BAP en el medio de cultivo puede oscurecer el color de los callos en el medio de inducción de callogénesis.

4.4. Número de callos formados.

4.4.1. Número de callos formados hasta los 15 días.

CUADRO 19. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 15 DÍAS.

F.V.	SC	GL	CM	F
Repeticiones	62,84	4	15,71	1,85 n.s
Clones (C)	648,97	3	216,32	25,45 **
Error A	199,31	12	16,61	
Medios de cultivo (M)	2253,74	7	321,96	37,88 **
C x M	679,28	21	32,35	3,81 **
Error B	951,85	112	8,50	
Total	4795,99	159		

Coefficiente de variación = 62,11%

Media = 4,69 callos

ns = no significativo

** = Altamente significativo

En base a los datos del anexo 8 se ejecutó el análisis de varianza (cuadro 19), en el que se encontraron diferencias estadísticas al 1%, para las fuentes de variación: clones,

medios de cultivo y la interacción de ambos; y la no significación para repeticiones. El coeficiente de variación fue de 61,11%, debido a la baja y nula formación de callos en los tratamientos. El promedio de números de callos formados fue de 4,87.

CUADRO 20. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 15 DÍAS.

Clones	Medias	Rangos
C4	7,33	a
C3	5,78	a
C2	3,63	b
C1	2,05	b

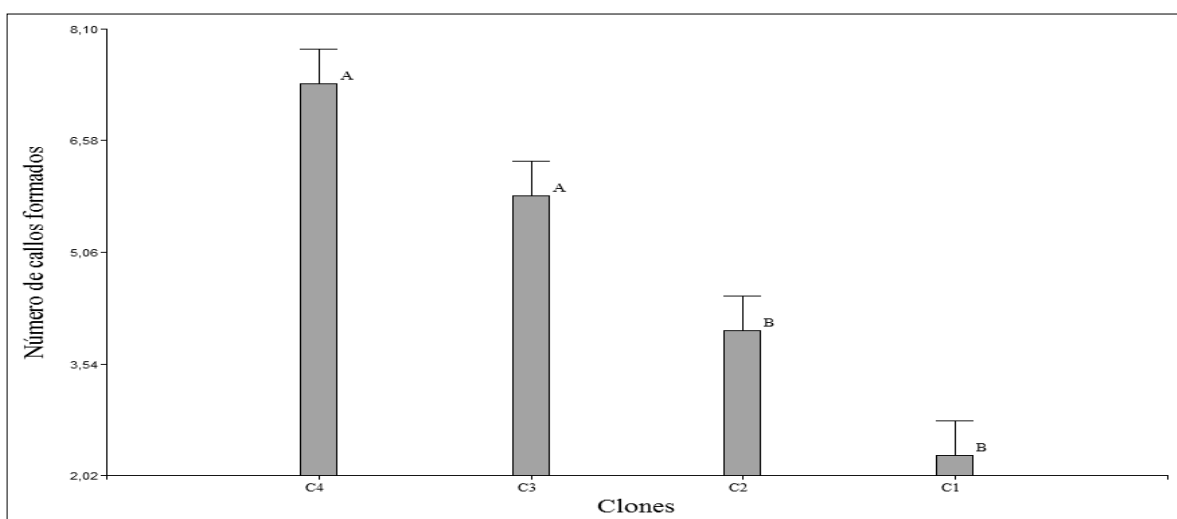


GRÁFICO 11. Prueba de significación de Tukey al 5% para clones en la variable números de callos formados a los 15 días.

La prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Clones en la variable número de callos formados hasta los 15 días (cuadro 20 y gráfico 11), revela dos rangos de significación. En el primer rango se ubica el Clon C4 con una media de 7,33 callos formados y en el último rango aparece el Clon C1, con una media de 2,05 callos formados.

CUADRO 21. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS A LOS 15 DÍAS.

Medios de cultivo	Medias	Rangos
M4	10,05	a
M3	8,90	a b
M8	7,10	b
M7	6,90	b
M6	2,55	c
M2	2,05	c
M1	0,00	c
M5	0,00	c

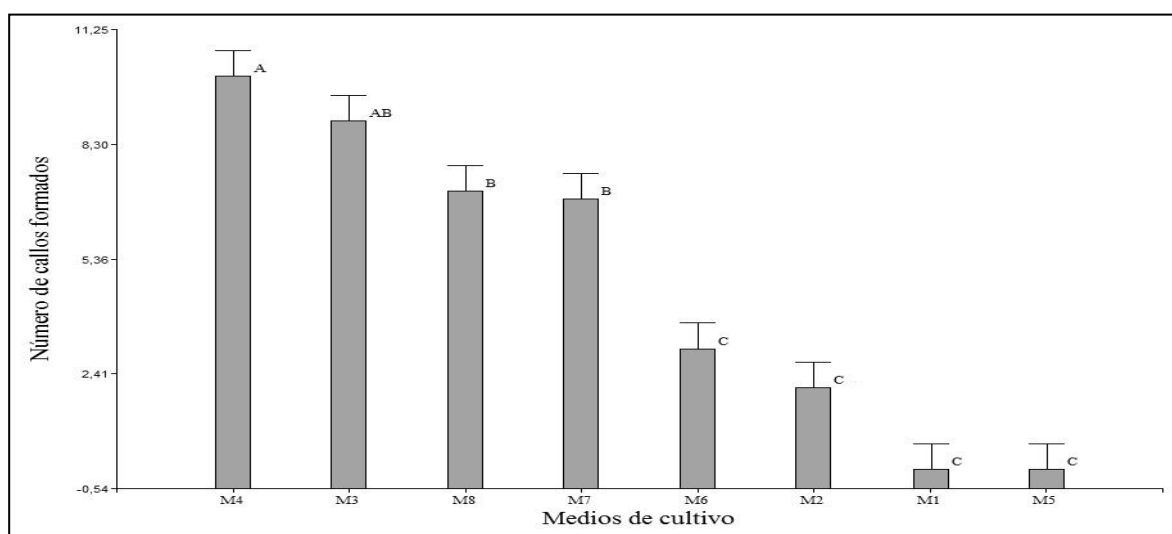


GRÁFICO 12. Prueba de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo en la variable números de callos formados a los 15 días.

En la prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Medios de cultivo (cuadro 21 y gráfico 12), muestra tres rangos de significación. En el primer rango se sitúa el medio M4, con una media de 10,05 callos formados. En tanto que en rango final se presenta los medios M1 y M5, los cuales no formaron callos hasta los 15 días.

CUADRO 22. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CxM) EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS HASTA LOS 15 DÍAS.

Tratamientos	Medias	Rangos																					
C4 M4	15,40	a																					
C4 M3	14,20	a	b																				
C4 M7	13,20	a	b																				
C3 M4	12,80	a	b	c																			
C3 M7	11,00	a	b	c	d																		
C4 M8	9,40	a	b	c	d	e																	
C2 M3	9,00	a	b	c	d	e	f																
C3 M8	8,80	a	b	c	d	e	f	g															
C3 M3	8,40	a	b	c	d	e	f	g															
C2 M4	7,00		b	c	d	e	f	g	h														
C1 M8	5,60			c	d	e	f	g	h														
C1 M4	5,00				d	e	f	g	h														
C2 M8	4,60				d	e	f	g	h														
C1 M3	4,00				d	e	f	g	h														
C2 M6	3,80				d	e	f	g	h														
C4 M6	3,60					e	f	g	h														
C2 M2	3,00						e	f	g	h													
C4 M2	2,80							e	f	g	h												
C3 M6	2,80								e	f	g	h											
C3 M2	2,40									e	f	g	h										
C1 M7	1,80										f	g	h										
C2 M7	1,60											g	h										
C2 M1	0,00													h									
C1 M6	0,00														h								
C3 M1	0,00															h							
C4 M1	0,00																h						
C1 M1	0,00																	h					
C1 M2	0,00																		h				
C1 M5	0,00																			h			
C2 M5	0,00																				h		
C4 M5	0,00																					h	
C3 M5	0,00																						h

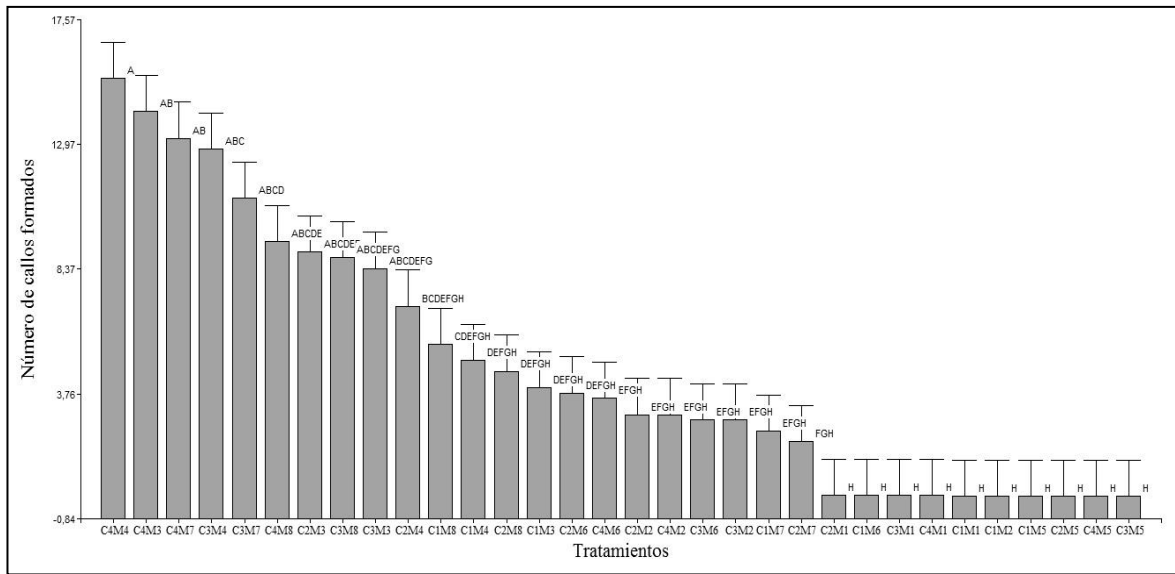


GRÁFICO 13. Prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción clones por medios de cultivo (CxM) en la variable números de callos formados hasta los 15 días.

Mediante la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción clones por medios de cultivo (cuadro 22 y gráfico 12) se muestra ocho rangos de significación, apareciendo en el primer rango el tratamiento C4M4 con un promedio de 15,40 callos formados hasta los 15 días, mientras que en el último rango aparecen los tratamientos C1M1, C1M2, C1M5, C2M5, C4M5, C3M5, siendo éstos los que no han formado callo en éste período.

Es probable que la adición de fitohormonas en el medio de cultivo promueva la rápida formación de callos en explantes de hojas de laurel lo que se puede afirmar con los estudios realizados por Carron, et ál. (1988), citado por Cadavid. (2006), que han demostrado que ambos reguladores (auxina y citoquinina), promueven la inducción de la embriogénesis somática y la posterior conversión de los embriones a plántulas.

4.4.2. Número de callos formados desde los 15 hasta los 30 días

CUADRO 23. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS DESDE LOS 15 HASTA LOS 30 DÍAS.

F.V.	SC	gl	CM	F
Repeticiones	226,66	4	56,67	1,90 n.s
Clones	418,62	3	139,54	4,67 **
Error A	358,79	12	29,90	1,21
Medios de cultivo	2864,99	7	409,28	16,59 **
C x M	1106,13	21	52,67	2,13 **
Error B	2763,75	112	24,68	
Total	7738,94	159		

Coefficiente de variación = 99,72%

Media = 4,98 días

ns = no significativo

** = Altamente significativo

De acuerdo a los datos del anexo 9 se realizó el análisis de varianza (cuadro 23), en el que se registraron diferencias estadísticas al 1%, para las fuentes de variación: clones, medios de cultivo y la interacción de ambos; y la no significación para repeticiones. El coeficiente de variación fue de 99,72%. El promedio de número de callos formados fue de 4,98.

CUADRO 24. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS DESDE LOS 15 HASTA LOS 30 DÍAS.

Clones	Medias	Rangos
C4	6,93	a
C3	6,18	a b
C1	3,83	b c
C2	3,00	c

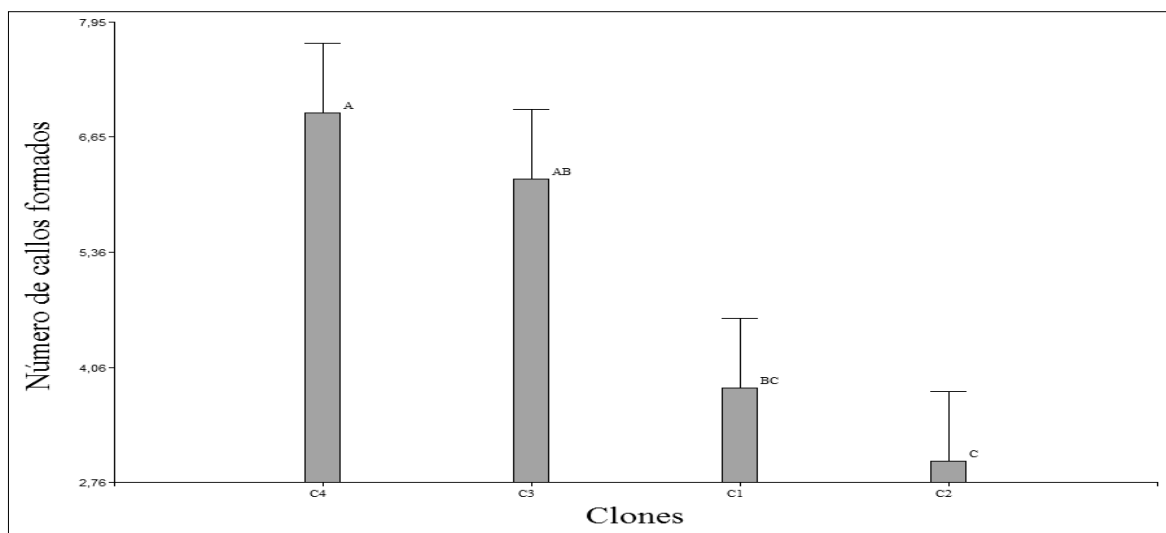


GRÁFICO 14. Prueba de significación de Tukey al 5% para clones en la variable número de callos formados desde los 15 hasta los 30 días.

La prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Clones en la variable número de callos formados hasta los 30 días (cuadro 24 y gráfico 14), muestra tres rangos de significación. En el primer rango se ubica el Clon C4 con una media de 6,93 callos formados y en el último rango aparece el clon C2, con una media de 3,00 callos formados.

CUADRO 25. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS DESDE LOS 15 HASTA LOS 30 DÍAS.

Medios de cultivo	Medias	Rangos
M8	10,40	a
M4	10,05	a
M3	8,65	a
M7	7,20	a
M6	1,95	b
M2	1,45	b
M1	0,15	b
M5	0,00	b

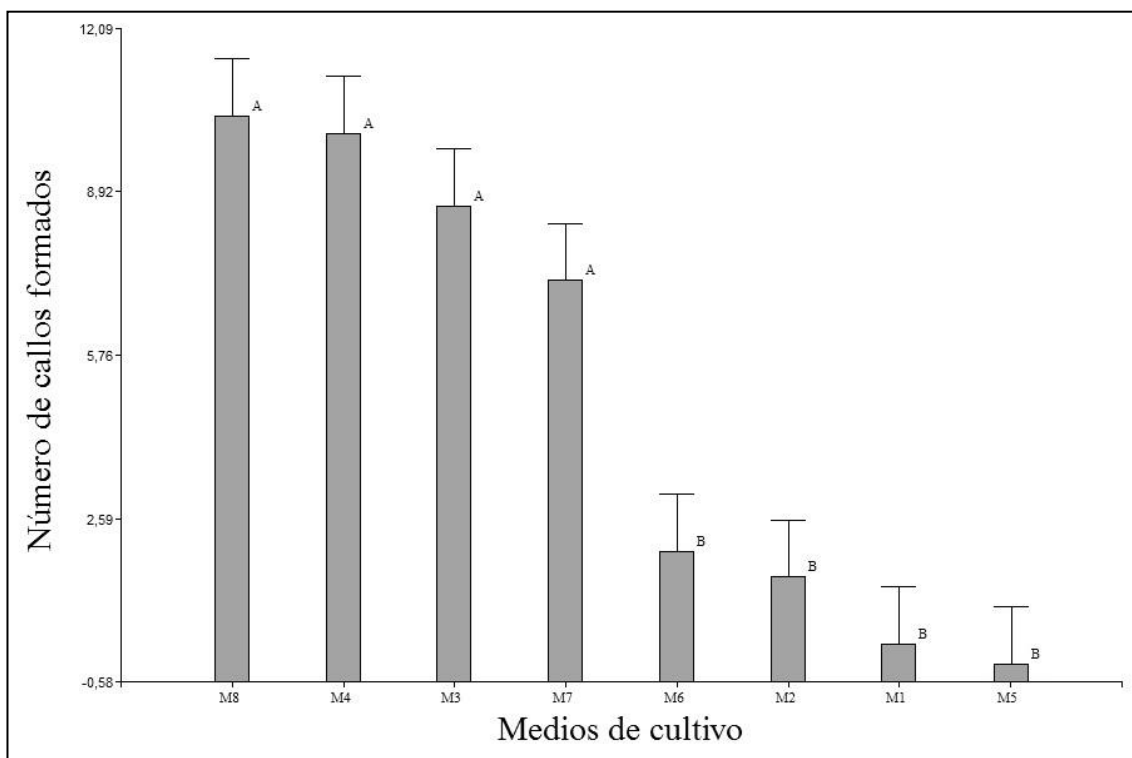


GRÁFICO 15. Prueba de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo en la variable número de callos formados desde los 15 hasta los 30 días.

Aplicando la prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Medios de cultivo (cuadro 25 y gráfico 15), se determina dos rangos de significación. En el primer rango se sitúa el medio M8, con una media de 10,40 callos formados. En tanto que en último rango se presenta el medio M5 sin haber formado callos hasta los 30 días.

CUADRO 26. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CxM) EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS DESDE LOS 15 HASTA LOS 30 DÍAS.

Tratamientos	Medias	Rangos
C4 M8	16,80	a
C3 M4	16,80	a
C4 M7	13,60	a b
C4 M3	12,60	a b c
C1 M4	11,40	a b c d
C3 M8	11,20	a b c d
C4 M4	9,80	a b c d
C3 M7	9,20	a b c d
C1 M3	8,60	a b c d
C3 M3	8,40	a b c d
C2 M8	8,20	a b c d
C1 M8	5,40	a b c d
C2 M3	5,00	a b c d
C1 M7	4,60	a b c d
C2 M6	3,80	b c d
C2 M2	2,80	b c d
C2 M4	2,20	b c d
C3 M2	2,00	b c d
C3 M6	1,80	b c d
C4 M6	1,60	b c d
C2 M7	1,40	b c d
C4 M2	1,00	c d
C2 M1	0,60	c d
C1 M6	0,60	c d
C3 M5	0,00	d
C3 M1	0,00	d
C2 M5	0,00	d
C1 M1	0,00	d
C4 M5	0,00	d
C1 M5	0,00	d
C4 M1	0,00	d
C1 M2	0,00	d

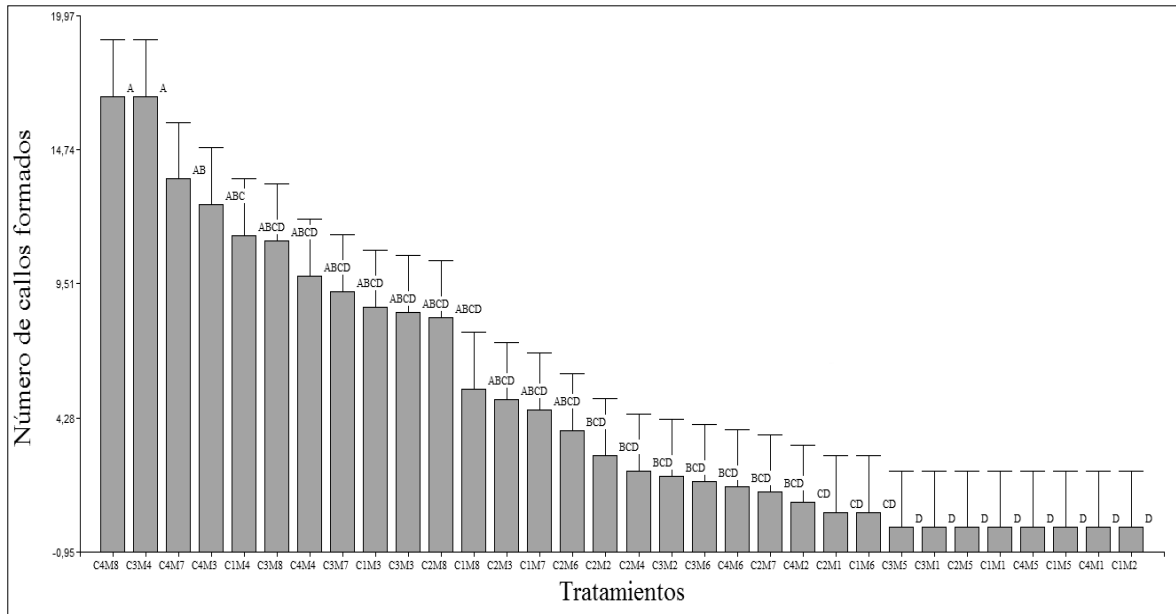


GRÁFICO 16. Prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción clones por medios de cultivo (CxM), en la variable número de callos formados desde los 15 hasta los 30 días.

Usando la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción clones por medios de cultivo (cuadro 26 y gráfico 16) se muestra cuatro rangos de significación, apareciendo en el primer rango el tratamiento C4M8 con un promedio de 16,80 callos formados, mientras que en el último rango aparecen los tratamientos C3M5, C3M1, C2M5, C1M1, C4M5, C1M5, C4M1 y C1M2, indicando que aquellos son los que no han formado callo a partir de los 15 hasta los 30 días.

Hess y Carman, (1991), citados por Cadavid. (2006), reportan que los tejidos embriogénicos son muy ricos en Ácido abscísico (ABA), mientras que el contenido de Ácido 3-Indol Acético (AIA) varía considerablemente de una especie a otra. La adquisición de la capacidad embriogénica de los callos puede estar relacionada con el establecimiento de un balance específico entre diferentes hormonas de tipo endógeno. Lo cual nos lleva a considerar que la adición de 2,4-D y BAP incrementó la capacidad de desarrollo embriogénico.

4.4.3. Número de callos formados desde los 30 hasta los 45 días

CUADRO 27. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS DESDE LOS 30 HASTA LOS 45 DÍAS.

F.V.	SC	Gl	CM	F
Repeticiones	175,75	4	43,94	3,31 n.s
Clones	333,65	3	111,22	8,38 **
Error A	159,35	12	13,28	0,49
Medios de cultivo	2631,90	7	375,99	13,91 **
C x M	1728,05	21	82,29	3,04 **
Error B	3027,30	112	27,03	
Total	8056,00	159		

Coefficiente de variación = 99,03%

Media = 5,25 días

ns = no significativo

** = Altamente significativo

Basándose en los datos del anexo 10 se realizó el análisis de varianza, en el que se registraron diferencias estadísticas al 1%, para las fuentes de variación: clones, medios de cultivo y la interacción de ambos; y la no significación para repeticiones. El coeficiente de variación fue de 99,03%. El promedio de número de callos formados fue de 5,25.

CUADRO 28. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA CLONES EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS DESDE LOS 30 HASTA LOS 45 DÍAS.

Clones	Medias	Rangos
C4	7,03	a
C3	6,25	a b
C2	4,28	a b
C1	3,45	b

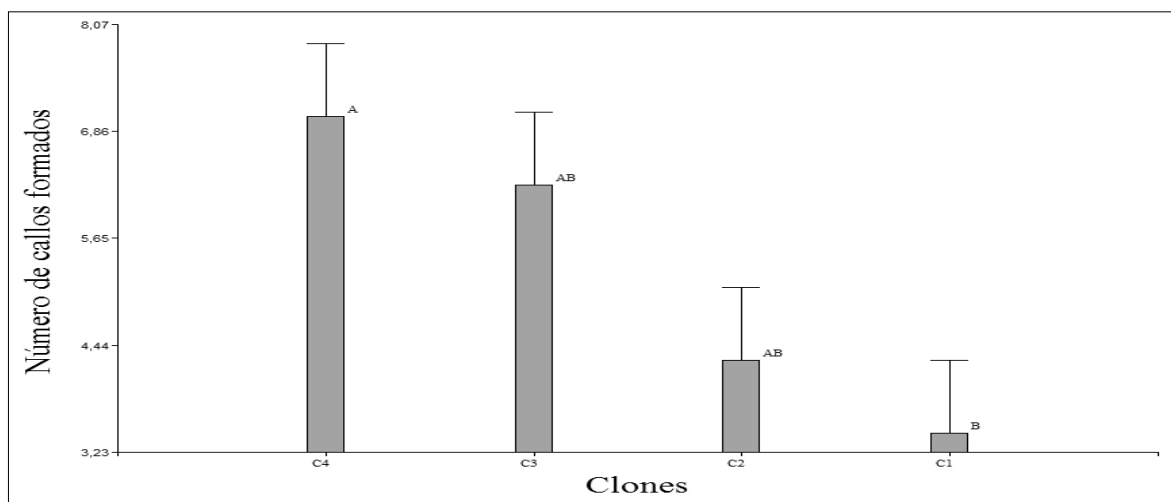


GRÁFICO 17. Prueba de significación de Tukey al 5% para clones en la variable número de callos formados desde los 30 hasta los 45 días.

La prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Clones en la variable número de callos formados hasta los 45 días (cuadro 28 y gráfico 17), muestra dos rangos de significación. En el primer rango se ubica el Clon C4 con una media de 7,03 callos formados y en el último rango aparece el clon C1, con una media de 3,45 callos formados.

CUADRO 29. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA MEDIOS DE CULTIVO EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS DESDE LOS 30 HASTA LOS 45 DÍAS.

Medios de cultivo	Medias	Rangos
M4	10,60	a
M3	9,60	a b
M7	7,75	a b
M8	7,75	a b
M2	5,10	b c
M6	1,20	c
M5	0,00	c
M1	0,00	c

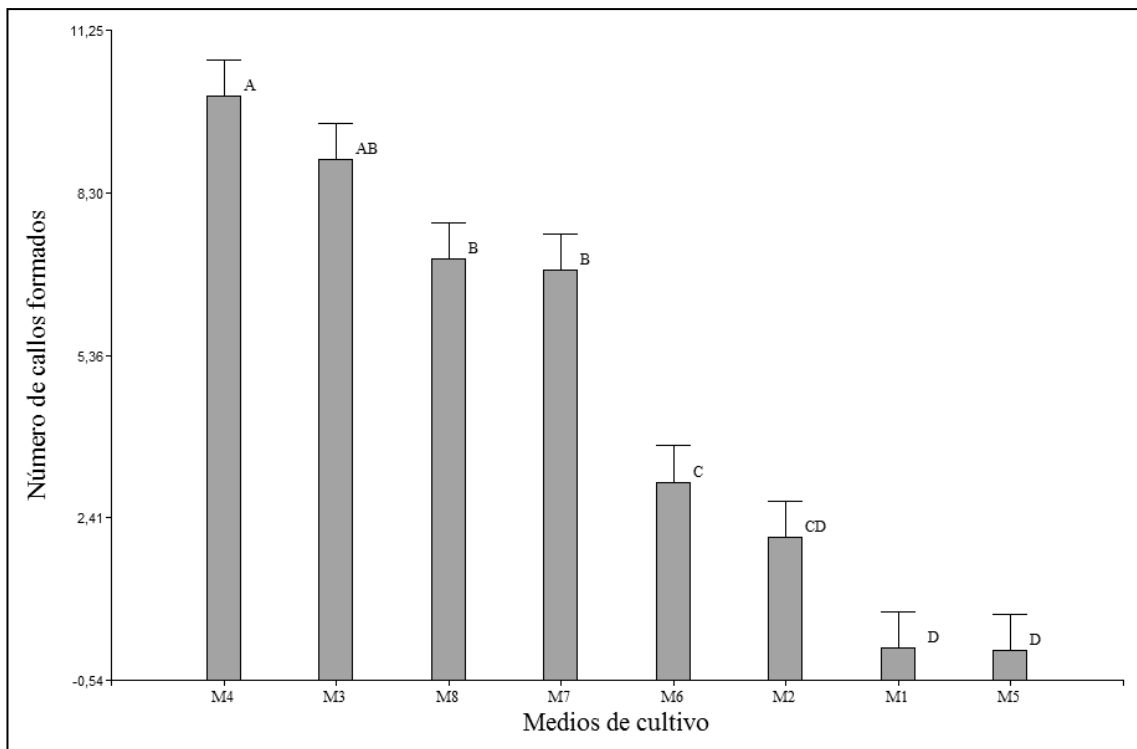


GRÁFICO 18. Prueba de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo en la variable número de callos formados desde los 30 hasta los 45 días.

Aplicando la prueba de significación de Tukey al 5% para el factor Medios de cultivo (cuadro 29 y gráfico 18), muestra tres rangos de significación. En el primer rango se sitúa el medio M4, con una media de 10,60 callos formados. En tanto que en último rango se presenta el medio M1 sin haber formado callos desde los 30 hasta los 45 días.

CUADRO 30. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO (CxM) EN LA VARIABLE NÚMERO DE CALLOS FORMADOS DESDE LOS 30 HASTA LOS 45 DÍAS.

Tratamientos	Medias	Rangos
C4 M4	17,20	a
C2 M2	14,20	a b
C4 M3	13,40	a b c
C3 M8	12,20	a B c d
C4 M7	11,80	a b c d
C3 M4	11,80	a b c d
C3 M7	11,80	a b c d
C4 M8	11,60	a b c d
C2 M3	11,00	a b c d
C1 M4	9,00	a b c d
C3 M3	8,20	a b c d
C1 M8	7,20	a b c d
C1 M3	5,80	a b c d
C1 M7	5,60	a b c d
C3 M2	4,60	a b c d
C2 M4	4,40	a b c d
C2 M6	2,80	b c d
C2 M7	1,80	b c d
C4 M2	1,60	b c d
C3 M6	1,40	b c d
C4 M6	0,60	c d
C4 M1	0,00	d
C1 M1	0,00	d
C3 M1	0,00	d
C4 M5	0,00	d
C3 M5	0,00	d
C1 M5	0,00	d
C1 M2	0,00	d
C2 M1	0,00	d
C2 M5	0,00	d
C1 M6	0,00	d
C2 M8	0,00	d

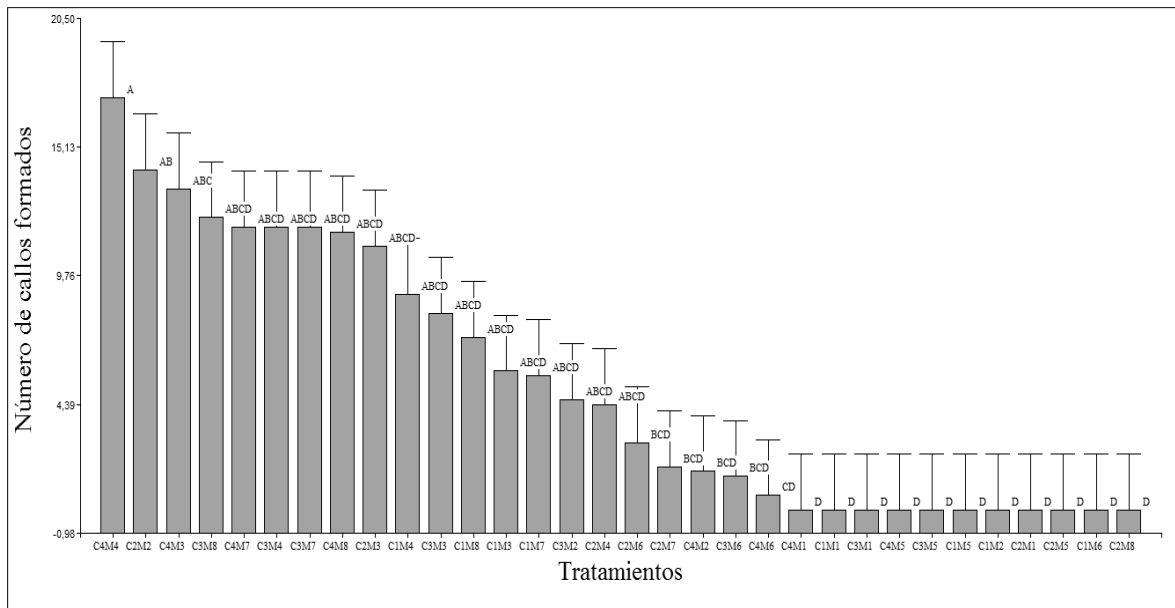


GRÁFICO 19. Prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción clones por medios de cultivo (CxM), en la variable número de callos formados desde los 30 hasta los 45 días.

Empleando la prueba de significación de Tukey al 5% para la interacción clones por medios de cultivo (cuadro 30 y gráfico 19) se muestra cuatro rangos de significación, apareciendo en el primer rango el tratamiento C4M4 con un promedio de 17,20 callos formados, mientras que en el último rango aparecen los tratamientos C4M1, C1M1, C3M1, C4M5, C3M5, C1M5, C1M2, C2M1, C2M5, C1M6 y C2M8 revelando que éstos tratamientos no han formado callo a partir del día 30 hasta el 45.

El- Hadrami, and I. D`Auzac, (1992), citados por Cadavid, (2006), en su trabajo de investigación compararon diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP, y observaron que el suministro de estos reguladores de crecimiento mejora el potencial embriogénico comparado con el medio de control, en el cual no estaban presentes ambas hormonas, con lo que creemos que posiblemente las hormonas usadas en el experimento no son endógenos en los clones de laurel y ayudaron a acelerar y mejorar la formación de callos.

4.4.4. Total de callos formados durante la investigación

CUADRO 31. NÚMERO TOTAL DE CALLOS FORMADOS HASTA LOS 45 DÍAS PARA CLONES.

Clones	Total de callos
C4	21,29
C3	18,21
C2	10,91
C1	9,33

Tomando los resultados obtenidos en las pruebas de significación de Tukey al 5% para clones (cuadros 20, 24 y 28) en la variable número de callos formados, se realizó la sumatoria de dichos valores, lo que determina que el clon C4 fue el que mejor resultado presentó hasta los 45 días, mostrando un total de 21,29 callos formados; mientras que el clon C1 fue el que menor efecto obtuvo en los tratamientos, con un total de 9,33 callos formados en la investigación.

CUADRO 32. NÚMERO TOTAL DE CALLOS FORMADOS HASTA LOS 45 DÍAS PARA MEDIOS DE CULTIVO.

Medios de cultivo	Total de callos
M4	30,70
M3	27,15
M8	25,25
M7	21,85
M2	8,60
M6	5,70
M1	0,15
M5	0,00

De los valores obtenidos en las pruebas de significación de Tukey al 5% para medios de cultivo (cuadros 21, 25 y 29) en la variable número de callos formados, se realizó la suma de los mismos, determinando que el medio de cultivo M4 fue el que mayor

cantidad de callos formó, presentando un total de 30,70 callos; mientras que el medio M5 no indujo la formación de los mismos, dando un total de 0,00.

CUADRO 33. NÚMERO TOTAL DE CALLOS FORMADOS HASTA LOS 45 DÍAS PARA LA INTERACCIÓN DE CLONES POR MEDIOS DE CULTIVO.

Tratamientos	Total de callos
C4M4	42,40
C3 M4	41,40
C4 M3	40,20
C4 M7	38,60
C4 M8	37,80
C3 M8	32,20
C3 M7	32,00
C1 M4	25,40
C2 M3	25,00
C3 M3	25,00
C2 M2	20,00
C1 M3	18,40
C1 M8	18,20
C2 M4	13,60
C2 M8	12,80
C1 M7	12,00
C2 M6	10,40
C3 M2	9,00
C3 M6	6,00
C4 M6	5,80
C4 M2	5,40
C2 M7	4,80
C1 M6	0,60
C2 M1	0,60
C1 M1	0,00
C1 M2	0,00
C1 M5	0,00
C2 M5	0,00
C3 M1	0,00
C3 M5	0,00
C4 M1	0,00
C4 M5	0,00

Utilizando los datos obtenidos en las pruebas de significación de Tukey al 5% para la interacción clones por medios de cultivo (cuadros 22, 26 y 30) en la variable número de callos formados, se efectuó la sumatoria de los mismos, determinando que el tratamiento que comprende al clon C4 y al medio de cultivo M4 fue el que presentó el más alto número de callos formados, con un total de 42,40 callos, seguido por el tratamiento C3M4 presentando un total de 41,40 callos; mientras que los tratamientos C1M1,C1M2, C1M5, C2M5,C3M1,C3M5,C4M1 y C4M5 no formaron callos durante la investigación.

Es probable que la adecuada adición de 2,4-D en los medios de cultivo haya elevado la eficacia de los medios de cultivo para la inducción de callo en hojas de clones de laurel, lo que se puede justificar con lo mencionado por Thorpe, (1994), referido por Wahby, I. (2007), que las auxinas tienen acción sobre la elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias.

4.5. Porcentaje de callos formados

CUADRO 34. PORCENTAJE DE CALLOS FORMADOS HASTA LOS 45 DÍAS.

Tratamientos		Porcentaje hasta	Porcentaje hasta	Porcentaje hasta
Nº	Símbolo	los 15 días (%)	los 30 días (%)	los 45 días (%)
1	C1M1	0,00	0,00	0,00
2	C1M2	0,00	0,00	0,00
3	C1M3	44,44	43,00	39,19
4	C1M4	55,56	57,00	60,81
5	C1M5	0,00	0,00	0,00
6	C1M6	0,00	5,66	0,00
7	C1M7	24,32	43,40	43,75
8	C1M8	75,68	50,94	56,25
9	C2M1	0,00	5,66	0,00
10	C2M2	15,79	26,42	47,97
11	C2M3	47,37	47,17	37,16
12	C2M4	36,84	20,75	14,86
13	C2M5	0,00	0,00	0,00
14	C2M6	38,00	28,36	60,87
15	C2M7	16,00	10,45	39,13
16	C2M8	46,00	61,19	0,00
17	C3M1	0,00	0,00	0,00
18	C3M2	10,17	7,35	18,70
19	C3M3	35,59	30,88	33,33
20	C3M4	54,24	61,76	47,97
21	C3M5	0,00	0,00	0,00
22	C3M6	12,39	8,11	5,51
23	C3M7	48,67	41,44	46,46
24	C3M8	38,94	50,45	48,03
25	C4M1	0,00	0,00	0,00
26	C4M2	8,64	4,27	4,97
27	C4M3	43,83	53,85	41,61
28	C4M4	47,53	41,88	53,42
29	C4M5	0,00	0,00	0,00
30	C4M6	13,74	5,00	2,50
31	C4M7	50,38	42,50	49,17
32	C4M8	35,88	52,50	48,33

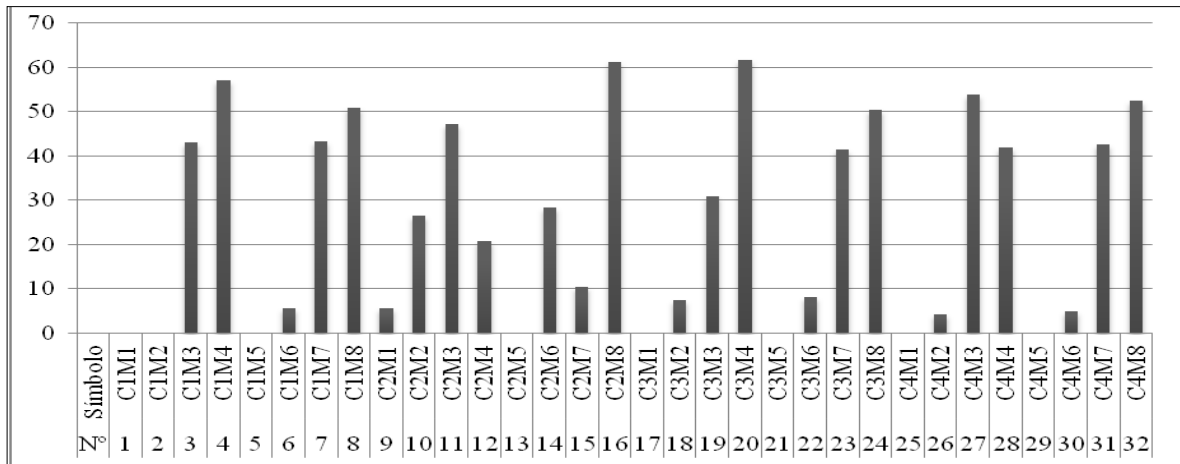


GRÁFICO 20. Porcentaje de callos formados hasta los 15 días.

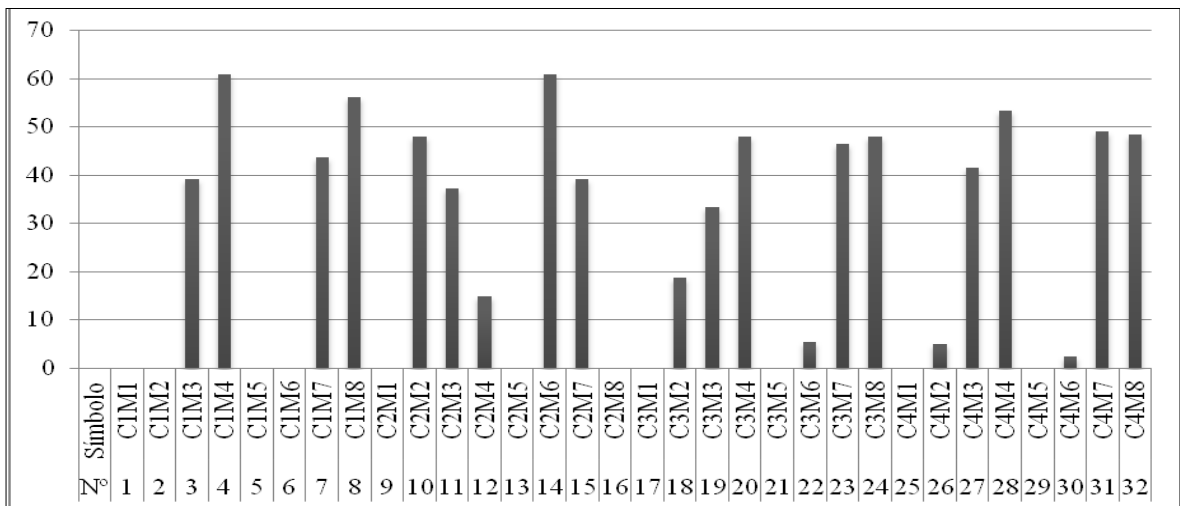


GRÁFICO 21. Porcentaje de callos formados desde los 15 hasta los 30 días.

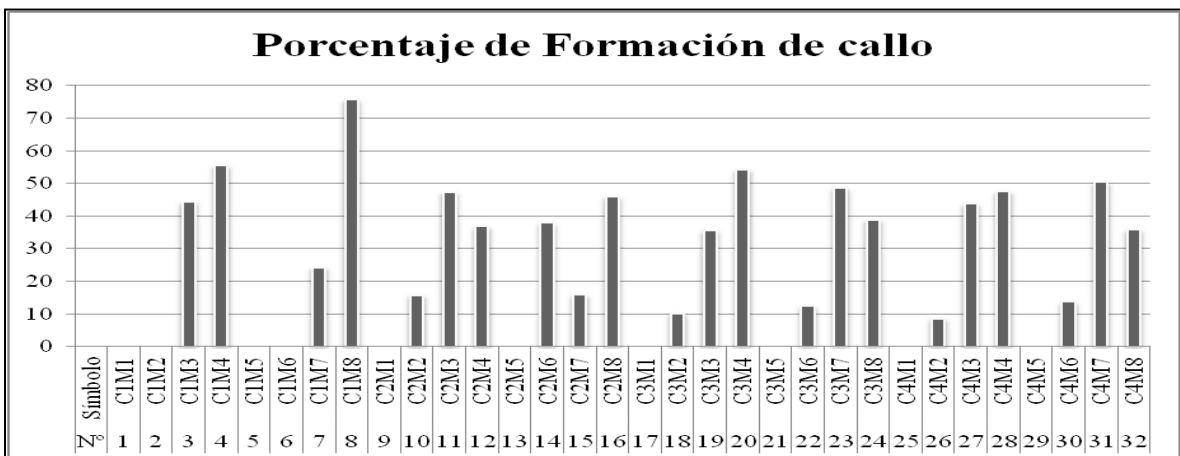


GRÁFICO 22. Porcentaje de callos formados desde los 30 hasta los 45 días.

Los datos de porcentaje de callos formados hasta los 15, 30 y 45 días se presentan en los anexos 11, 12 y 13 respectivamente. Luego de haber analizado los mismos en base a los datos de número de callos formados y tomando en cuenta la composición química de las sales madre (MS y DKW), se obtiene un alto grado de importancia para cada tratamiento (cuadro 31).

La variación de porcentajes se presenta en los treinta y dos tratamientos utilizados. De los cuales el tratamiento 3, C1M3 muestra un porcentaje de callos formados del 44,44% a los 15 días, mientras que a los 30 días presenta un 43,00% y finalmente a los 45 días aparece un 39,19%. Indicando que la formación de callos se produjo de manera semejante entre los tres períodos para este tratamiento.

En el tratamiento 4, C1M4 a los 15 días revela un porcentaje de formación de callo del 55,56%, a los 30 días se nota un 57,00% y por último a los 45 días presenta un 60,81% de formación de callo. Demostrando que existió una formación equivalente en los tres intervalos en este proceso.

El tratamiento 7, C1M7 a los 15 días presenta 24,32% de porcentaje de formación de callo, a los 30 días un 43,40% y a los 45 días un 43,75%. Mostrando que el proceso de formación de callo a los 15 días fue bajo, mientras que a los 30 y 45 días aumentó considerablemente.

En el tratamiento 8, C1M8 a los 15 días existe un 75,68% de formación de callo, mientras que a los 30 días fue de 50,94% y finalmente a los 45 días alcanzó un 56,25% de formación de callo, revelando que la formación del callo en este tratamiento se produjo de forma semejante.

El tratamiento 11, C2M3 muestra un porcentaje de callos formados del 47,37% a los 15 días, a los 30 días presenta un 47,17% y finalmente a los 45 días revela un 37,16%. Indicando que la formación de callos se produjo de manera semejante entre los tres períodos para este tratamiento.

El tratamiento 15, C2M7 a los 15 días presenta 16,00% de porcentaje de formación de callo, a los 30 días un 10,45% y a los 45 días un 39,13%. Mostrando que el proceso de

formación de callo a los 15 y 30 días fue bajo, mientras que a los 45 días aumentó considerablemente.

En el tratamiento 20, C3M4 a los 15 días revela un porcentaje de formación de callo del 54,24%, a los 30 días se observa un 61,76% y por último a los 45 días presenta un 47,97% de formación de callo. Demostrando que en el proceso existió una formación superior a los 30 días.

El tratamiento 23, C3M7 a los 15 días presenta 48,67% de porcentaje de formación de callo, a los 30 días un 41,44% y a los 45 días un 46,46%. Mostrando que el proceso de formación de callo se mantuvo regular durante el ensayo.

En el tratamiento 24, C3M8 a los 15 días existe un 38,94% de formación de callo, mientras que a los 30 días fue de 50,45% y finalmente a los 45 días alcanzó un 48,03% de formación de callo, indicando que la formación del callo en este tratamiento se mantuvo de forma semejante a partir del día 30.

El tratamiento 27, C4M3 muestra un porcentaje de callos formados del 43,83% a los 15 días, a los 30 días presenta un 53,85% y finalmente a los 45 días revela un 41,61%. Indicando que la formación de callos se produjo de manera irregular, siendo a los 30 días donde existió mayor porcentaje de formación de callo.

En el tratamiento 28, C4M4 a los 15 días mantiene porcentaje de formación de callo del 47,53%, a los 30 días se observa un 41,88% y por último a los 45 días presenta un 53,42% de formación de callo. Demostrando que en el proceso existió una formación superior a los 30 días.

El tratamiento 31, C4M7 a los 15 días presenta 50,38% de porcentaje de formación de callo, a los 30 días un 42,50% y a los 45 días un 49,17%. Mostrando que en el proceso de formación de callo la tendencia de formación fue regular.

En el tratamiento 32, C4M8 a los 15 días existe un 35,88% de formación de callo, mientras que a los 30 días fue de 52,50% y finalmente a los 45 días alcanzó un 48,33% de

formación de callo, indicando que la formación del callo en este tratamiento tuvo una tendencia de incremento a partir del día 30.

Es probable que el medio de cultivo de inducción de callo al contener una suficiente cantidad de 2,4-D y BAP permitió incrementar el porcentaje de formación de callo en explantes de hojas de laurel de acuerdo a lo manifestado por Flick et ál., (1983) y Grattapaglia y Machado, (1990), citados por Figueiredo y Esquivel, (1991), quienes informaron que, en general, los medios de cultivo que contienen altas concentraciones de auxinas y bajas concentraciones de citoquininas promueven la proliferación celular lo que resulta en la formación de callos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

La adición de fitohormonas (2,4-D y BAP) y caseína hidrolizada en el medio de cultivo para la inducción de callos como metodología de reproducción asexual, permitió obtener un alto porcentaje de formación de callogénesis en hojas de clones de laurel (*Cordia alliodora*).

El medio de cultivo (M4), cuyos componentes son (50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azúcar + 2mg/l de 2,4-D + 1mg/l de BAP + 100 mg/l de Caseína Hidrolizada), es el que produjo el mejor resultado, al obtener un mayor número de callos formados hasta los 45 días de desarrollado el ensayo, mostrando una media de 15,40; 16,80 y finalmente 17,20 callos formados a los 15, 30 y 45 días respectivamente.

El clon (C4) fue el que respondió mejor frente al estímulo del medio de cultivo, lo que se demuestra mediante los resultados obtenidos en la variable número de callos formados.

Al comparar las soluciones madre (MS y DKW), utilizadas en la preparación de los medios de cultivo influyó en la variable número de callos formados presentando diferencias estadísticas, en cuanto a número de callos formados, el clon C4 en el medio M4 que esta formado por la solución madre 50% del medio MS permitió obtener los mejores resultados.

El tratamiento C4M3 que corresponde al clon (C4) en el medio tres (M3) (50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azúcar + 2mg/l de 2,4-D + 1mg/l de BAP), presentó los mejores resultados en la variable días a la formación de callo hasta los 30 días.

5.2. RECOMENDACIONES

Utilizar el medio de cultivo (M4) preparado con (50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azúcar + 2mg/l de 2,4-D + 1mg/l de BAP + 100 mg/l de Caseína Hidrolizada) y el clon C4, para inducir la formación de callogénesis en hojas de clones de laurel.

Continuar con investigaciones de inducción de callogénesis, utilizando el medio de cultivo M4 y variando las dosis de fitohormonas establecidas en éste ensayo.

Efectuar ensayos de inducción de callogénesis, utilizando el medio de cultivo M3, incrementando la concentración de la fitohormona auxina (2,4-D), ya que ésta fue la que influyó directamente en la producción de callo, presentando un buen resultado en la variable días a la formación de callo.

CAPÍTULO 6

PROPUESTA

6.1. TÍTULO

Inducción de callogénesis en hojas de clones del laurel blanco (*Cordia alliodora*) in vitro.

6.2. FUNDAMENTACIÓN

El proceso común utilizado para la producción de plántulas de Laurel Blanco (*Cordia alliodora*) para la comercialización, es por medio de semillas lo cual disminuye la calidad de los vegetales debido a la variabilidad genética que se produce de un individuo a otro con descendencia vertical, lo que no ocurre cuando se producen clones exactos de un individuo con características óptimas de la madera para la industrialización, lo cual se puede lograr mediante cultivos in vitro.

El presente ensayo se fundamenta en los resultados obtenidos al evaluar ocho medios de cultivo para inducir callogénesis en hojas de clones de laurel, donde se concluyó que con la utilización del medio M4 conformado por (50% del medio Murashige y Skoog + 30g/l de azúcar + 2mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de BAP + 100 mg/l de Caseína Hidrolizada) que dio el mejor resultado obteniendo una media de 15,40; 16,80 y 17,20 callos formados a los 15, 30 y 45 días respectivamente, en donde el clon C4 fue el que mejor respondió al estímulo del medio. Basándose en los resultados obtenidos se propone utilizar el medio M4 para la inducción de callogénesis en hojas de laurel (*Cordia alliodora*).

6.3. OBJETIVOS

6.3.1. Objetivo General

Producir mayor cantidad de callo embriogénico en hojas de clones de Laurel blanco (*Cordia alliodora*) mediante técnicas de micropropagación.

6.3.2. Objetivo Específico

Utilizar el medio de cultivo que permitió el mayor desarrollo de calogénesis en hojas de clones de laurel.

Establecer el protocolo del medio de cultivo que permita el desarrollo de calogénesis en hojas de clones de laurel.

6.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Las plantaciones forestales tienen una función creciente en el abastecimiento de madera para la industria forestal mundial, el aporte de las innovaciones en genética y biotecnología permite obtener árboles de buen crecimiento y características deseadas; entre las especies con potencialidad de uso comercial, rápido crecimiento, calidad y uso de la madera es el Laurel (*Cordia alliodora*). La producción de material seleccionado de especies forestales requiere, por una parte, un mayor conocimiento de la biología reproductiva así como de los condicionamientos fisiológicos que influyen en la capacidad morfogenética en relación con la juvenilidad de los materiales. Así mismo, no es frecuente encontrar en la naturaleza estados juveniles en árboles adultos como fuente de material para propagación, aunque para algunas especies puede ser resuelto a través de la obtención de rebrotes de tocón, brotes epicornicos, podas a ras de suelo, enraizamiento seriado de estacas, injertos y etiolación. Ante este panorama la biotecnología se presenta como una alternativa para la producción y mejoramiento de especies forestales.

En la silvicultura mundial, la aplicación de técnicas de micropropagación en especies forestales de uso maderable ha constituido una alternativa muy útil para aumentar el número de plantas requeridas para el establecimiento de plantaciones en los programas de propagación masiva, forestación, reforestación, protección y aprovechamiento. Así mismo para aquellas en que su comportamiento es más recalcitrante, el desarrollo de sistemas de propagación vegetativa mediante micropropagación y embriogénesis somática in vitro, permite la obtención de clones de genotipos seleccionados. Bajo estas condiciones es posible producir material vegetal en cualquier época del año y entregarlo de acuerdo con el programa de siembra establecido por el reforestador.

6.5. PROPUESTA

6.5.1. Preparación del medio de cultivo.

CUADRO 35. FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MS (Murashige and Skoog, 1962)

Sales minerales	(Murashige and Skoog, 1962)
	g/l
$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	1.650
KNO_3	1.900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.370
KH_2PO_4	0.170
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0278
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0372
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0169
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0086
H_3BO_3	0.0062
KI	0.00083
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.000025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.000025
Mioinositol	0.100
Tiamina HCl	0.0001
Acido nicotínico	0.0005
Piridoxina HCl	0.0005
Glicina	0.002

Se prepara el medio MS con los elementos y cantidades detallados anteriormente con un pH de 5,5. Posteriormente de realizados los cálculos de las necesidades de sales minerales se añade al medio de cultivo azúcar, 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), BAP

(Benzil aminopurina) y Caseína Hidrolizada en las concentraciones establecidas anteriormente.

- Una vez escogida la formulación del medio de cultivo, se procede a su preparación.
- Se prepara la solución stock concentradas de los distintos componentes, agrupados de forma que no se produzcan fenómenos de precipitación. Para esto se trabaja con una solución stock de macronutrientes, una de micronutrientes, una de hierro con un agente quelante, otra de vitaminas, así como con soluciones específicas para los demás componentes del medio.
- Se diluye la solución stock a la mitad de su concentración.
- Una vez obtenido el volumen de medio deseado se procede a ajustar su pH al valor prefijado mediante la adición de NaOH y/o HCl 0.1-1 N.
- A continuación, se añade el agente solidificante, se funde por calentamiento breve para, finalmente, ser dosificado en los contenedores adecuados.

6.5.2. Traspaso del medio (verter en los frascos).

El medio se vierte en cajas Petri esterilizadas, aproximadamente 50 ml por caja, esto se realiza dentro de la cámara de flujo laminar. Es mejor verter el medio cuando éste no se encuentre muy caliente, ya que si se vierte el agar muy caliente puede ocasionar una alta condensación. Por último se tapa la caja Petri teniendo en cuenta que no exista ingreso de aire, de lo contrario se produciría una contaminación del medio.

6.5.3. Esterilización de la cámara.

Es muy importante que para realizar una práctica de laboratorio éste se encuentre completamente desinfectado desde el inicio hasta el final de la práctica, al igual que los medios de cultivo, frascos o cajas y los explantes vegetales. La esterilización de los medios y los frascos se la realiza en el autoclave por 15 minutos a 120° C y 15 atm de presión

6.5.4. Uso de la cámara de flujo laminar

Primero se la desinfecta completamente con alcohol (etanol) al 90% de concentración. La dispersión del alcohol se la realiza con un atomizador y un paño de algodón para limpiar los alrededores de la cámara, la desinfección se realiza antes y después de utilizar la cámara.

6.5.5. Siembra del explante

Antes de extraer los explantes se realiza una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se mantiene en condiciones de asepsia. Ya en condiciones de asepsia, en la cámara de flujo laminar, se extraen los explantes del material vegetal y se colocaron en el medio de iniciación dentro de una caja Petri, para poder controlar la sanidad y la viabilidad de los explantes.

Se siembran los fragmentos de hojas de 1 cm largo por 1 cm de ancho, es decir, de 1x1, en número de 5 en forma de cruz por tratamiento.

6.6. IMPLEMENTACIÓN / PLAN DE ACCIÓN.

Dar a conocer el protocolo de inducción de callogénesis mediante un artículo de interés en internet.

Capacitar a técnicos y/o encargados de laboratorios de micropropagación en la metodología de inducción de callogénesis en laurel.

BIBLIOGRAFÍAS

Ayerbe, L. 1990. Cultivo in vitro de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi – Prensa, Madrid – España. 226 p.

Baquero O; ét al. 2005. Propagación in vitro de material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken (Nogal Cafetero) (en línea). Revista colombiana de biotecnología. Consultado el 18 de octubre de 2010. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/484/858>

Botti, C. 1992. Producción de plantas in vitro, Memoria del Seminario realizado en agosto de 1992. Quito – Ecuador. 67 p.

Cadavid, S. et ál. 2006. Estudios preliminares en la estandarización de un protocolo para la obtención de callos embriogénicos en dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis mull*) de diferentes orígenes geográficos. Revista colombiana de biotecnología. Bogotá - Colombia.

Cccuenca.com.ec. 2010. Demanda de madera en el Ecuador (en línea). Consultado el 6 de octubre de 2010, Disponible en: <http://www.cccuenca.com.ec/descargas/indicadores/INDICADORESMADERA.pdf>.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Roca, W. M., Mroginski, L. (eds.). Cali – Colombia. 970 p.

Conabio.gob.mx. 2010. *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken (en línea). Consultado el 4 de octubre de 2010, (Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/16-borag1m.pdf)

CORMADERA – OIMT. 2001. Guías técnicas para el establecimiento y manejo de plantaciones forestales productivas en el litoral ecuatoriano. CORMADERA, 2001. Quito – Ecuador, 179 p.

Daquinta, et ál., (2003). Callogénesis en meliáceas exóticas (*Khaya nyasica* Stapf y *Toona ciliata*). Biotecnología vegetal 3v.

Ecuadorforestal.org. 2010. Demanda de madera en el Ecuador (en línea). Consultado el 6 de octubre de 2010, Disponible en: <http://ecuadorforestal.org/informacion-s-f-e/mercado-forestal/mercado-nacional/>.

Ecuadorforestal.org. 2010. Laurel. Consultado el 27 de enero de 2012, Disponible en: <http://www.ecuadorforestal.org/download/contenido/laurel.pdf>

ENDESA y BOTROSA. (2011), Programa de mejoramiento genético de laurel. ENDESA. Quito - Ecuador

Etsea2.udl.es. 2010. Medios de cultivo (en línea). Consultado el 6 de octubre de 2010, Disponible en: <http://www.etsea2.udl.es/invitro/medios.htm>

FAO.org. 2010. Situación Actual Forestal del Ecuador (en línea). Consultado el 6 de octubre de 2010. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/j4524s/j4524s07.htm>

Figueiredo y Esquivel. 1991. Callogenesis, organogenesis and micropropagation of *Datura insignis* Barb. Rodr., Revista brasileña de Fisiología Vegetal.

Fundación de Hogares Juveniles Campesinos. 2002. Manual Agropecuario. Limerín, Bogotá – Colombia. 1093 p.

Gómez, C.; ét. al. 2006. Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill (en línea). Consultado el 27 de septiembre de 2010. Disponible en: <http://smal.ly/facebookimgs26092010jpg>

Herbaria.plants.ox.ac.uk. 2010. *Cordia alliodora* (R. y P.) (en línea). Consultado el 4 de octubre de 2010, Disponible en: http://herbaria.plants.ox.ac.uk/adc/downloads/capitulos_especies_y_anexos/cordia_alliodora.pdf

Hurtado, D., Merino, M. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232p.

Infojardín.net. 2010. Macronutrientes (en línea). Consultado el 04 de noviembre de 2010. Disponible en: <http://www.infojardin.net/glosario/loam/macronutriente-macronutrientes.htm>

Instituto Ecuatoriano Forestal y de Áreas Naturales y de Vida Silvestre (INEFAN), 1995. Autoecología de la especie Laurel, Segunda Edición. Conocoto - Ecuador. 7 p.

J.W. Stead. s.f. Recursos Genéticos Forestales N° 9 (en línea). Consultado el 27 de enero de 2012. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/n2511s/N2511S07.htm>.

Kole, Chittaranjan (Ed). 2007. Genome mapping and molecular breeding in plants (technical crops) (en línea). Springer. Pennsylvania - United States. Consultado el 20 de diciembre de 2011. Disponible en: <http://books.google.com.ec/books?id=UYJcThvHy9IC&pg=PA170&dq=studies+on+vegetative+micropropagation+of+hevea+brasiliensis&hl=es&sa=X&ei=CUTyTpWUJMWhtwevn-nQBg&ved=0CC8Q6AEwAA#v=onepage&q=studies%20on%20vegetative%20micropropagation%20of%20hevea%20brasiliensis&f=false>

Liegel, L.H., Stead, J.W. 1990. *Cordia alliodora* (en línea). Consultado el 11 de octubre de 2010. Disponible en: www.fs.fed.us/global/iitf/Cordiaalliodora.pdf+semilla+cordia+alliodora&hl=es&gl=ec&pid=bl&srcid=ADGEESjtaVGAraAj64TGE GVdKIxfkA3xJUOv8XjAcAsHT602SewDIrCPs76K-FQUaWH-odLU4cO8FWQif2iMhfAQrdX8LupadURSbEZQPgZkQahARiVTgDrPxHJ43PWvDaOq_PmNzOWaU&sig=AHIEtbRsry2NHW-SLPbCyAVRmDHBGIE5Cg

López, C. y Perán R. 2010. Embriogénesis somática (en línea). Consultado 8 de octubre de 2010. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros39/embriogenesis.html>

Marín, J. 1997. La micropropagación de las especies frutales (en línea). Consultado el 08 de noviembre de 2010. Disponible en: <http://www.unizar.es/acz/02AcademicosNumerarios/Discursos/Marin.pdf+micropropagaci%C3%B3n+y+mejora+de+especies+frutales&hl=es&gl=ec&pid=bl&srcid=ADGEESiIpyzyXVHVDY6jOzr0sg9zw2v4fHHrvMxZ>

CvZLLLFb-lkAWk7LX3xcxfbYGTA4pmDIPjzQAcnkWWEMMqWVIzsla6RUL2LzgQr4-FKhCXaOI6t6DgEE7NGXGvwXhHNemf9DK6AM&sig=AHIEtbRE8mMLADz8y3XxoBeiMgc0Fa3OXg)

Mejía, R. 1992. Alternativas de equipamiento de laboratorio in vitro y técnicas de micropropagación de plantas. Lima – Perú. 101 p.

Montero, L. 1998. Micropropagación de dos líneas de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancrof). Tesis de Grado de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Ambato, Ambato – Ecuador. 95p.

Na.fs.fed.us. 2010. Laurel, Capá Prieto Laurel, Prieto capá (en línea). Consultado el 28 de septiembre de 2010. Disponible en: http://na.fs.fed.us/pubs/silvics_manual/volume_2/cordia/alliodora.htm&ei=HGqiTKn6CYKdlgeexbG8BA&sa=X&oi=translate&ct=result&resnum=1&ved=0CBoQ7gEwADgU&prev=/search%3Fq%3Dcordia%2Balliodora%26start%3D20%26hl%3Des%26sa%3DN%26biw%3D1024%26bih%3D578%26prmd%3Di

Orton.catie.ac.cr. 2010. Laurel (en línea). Consultado el 26 de octubre de 2010, Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/a0008s/a0008s07.pdf>

Perea, M. 2001. Biotecnología agrícola, Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas, Editora Guadalupe Ltda. Bogotá – Colombia. 407 p.

Quintero, M. (2003). Ajuste del sistema Rita® para la inducción de callo embriogénico y regeneración de plantas a partir del cultivo de anteras de arroz. 107 p. Consultado el 2 de octubre de 2010. Disponible en: <http://chasqui.ciat.cgiar.org:7777/pls/cvdp/docs/FOLDER/CVDP/CIATPROJECT/IP4/TESIS+PREGRADO+MANUE L+ALEXANDER+QUINTERO+MUQOZ.PDF>.

Rodríguez, L. 2010. Laurel (en línea). Consultado el 2 de octubre de 2010. Disponible en: http://www.fincaleola.com/laurel_espagnol.htm

Sakai.udl.es. 2010. Medios de Cultivo in vitro (en línea). Consultado el 8 de octubre de 2010. Disponible en: <http://sakai.udl.es/cursos/76304/lab/p1Medis.pdf>.

Silva, L. 1998. Micropropagación de dos variedades de duraznero (*Prunus pérsica*). Tesis de Grado de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Ambato, Cevallos – Ecuador. 62p.

Tabla Munsell para vegetales, s.f.

Uam.es. 2010. Macronutrientes (en línea). Consultado el 04 de noviembre de 2010, Disponible en: <http://www.uam.es/docencia/museovir/web/Museovirtual/fundamentos/nutricion%20mineral/macronutrientes.htm>

Unsa.edu.pe. 2010. Laboratorio de Biotecnología (en línea). Consultado el 8 de octubre de 2010. Disponible en http://www.unsa.edu.pe/index.php?option=com_content&view=article&id=259&Itemid=315.

Vidales-Fernández, I.; Salgado-Garciglia, R.; Gómez-Lim, M.A.; Ángel-Palomares, E.; y Guillén-Andrade, H. 2003, Embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass) (en línea). 95 p. Consultado el 2 de octubre de 2010. Disponible en: http://www.avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5_p089.pdf

Wahby, Imane. 2007. Aproximaciones Biotecnológicas tendentes a la mejora del cáñamo (*Cannabis sativa* L.): Obtención y cultivo de raíces transformadas, transformación genética y regeneración *in vitro*. Editorial de la Universidad de Granada. España.

Worldagroforestrycentre.org. 2010. *Cordia alliodora* (Ruiz y Pavón) Oken. Consultado el 2 de octubre de 2010. Disponible en: <http://www.worldagroforestrycentre.org/sea/Products/AFDbases/af/asp/SpeciesInfo.asp%3FSpID%3D589&ei=pHejTOyHM4LGIQfI2ZjsAw&sa=X&oi=translate&ct=result&resnum=4&ved=0CCIQ7gEwAzgy&prev=/search%3Fq%3Dlaurel%2Bcordia%2Balliodora%26start%3D50%26hl%3Des%26sa%3DN>.

APÉNDICE

ANEXO 1. Color del explante

Tratamientos		Repeticiones					Color predominante
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V	
1	C1M1	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6
2	C1M2	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6
3	C1M3	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6
4	C1M4	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6
5	C1M5	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6
6	C1M6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6
7	C1M7	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6
8	C1M8	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6	5 GY 1/6
9	C2M1	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6
10	C2M2	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6
11	C2M3	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6
12	C2M4	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6
13	C2M5	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6
14	C2M6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6
15	C2M7	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6
16	C2M8	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6	5 GY 4/6
17	C3M1	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8
18	C3M2	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8
19	C3M3	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8
20	C3M4	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8
21	C3M5	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8
22	C3M6	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8
23	C3M7	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8
24	C3M8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8	5 GY 7/8
25	C4M1	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8
26	C4M2	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8
27	C4M3	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8
28	C4M4	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8
29	C4M5	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8
30	C4M6	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8
31	C4M7	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8
32	C4M8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8	2,5 G 1/8

ANEXO 2. Días a la formación de callo hasta los 15 días

Tratamientos		Repeticiones					Total	Promedio
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V		
1	C1M1	15	15	15	15	15	75	15
2	C1M2	15	15	15	15	15	75	15
3	C1M3	10	12	10	8	15	55	11
4	C1M4	12	12	10	15	15	64	12,8
5	C1M5	15	15	15	15	15	75	15
6	C1M6	15	15	15	15	15	75	15
7	C1M7	12	14	15	15	15	71	14,2
8	C1M8	12	12	10	14	15	63	12,6
9	C2M1	15	15	15	15	15	75	15
10	C2M2	15	15	12	15	15	72	14,4
11	C2M3	15	12	10	12	10	59	11,8
12	C2M4	12	10	10	15	15	62	12,4
13	C2M5	15	15	15	15	15	75	15
14	C2M6	15	15	10	15	15	70	14
15	C2M7	15	12	15	15	15	72	14,4
16	C2M8	14	8	15	15	15	67	13,4
17	C3M1	15	15	15	15	15	75	15
18	C3M2	12	14	14	12	15	67	13,4
19	C3M3	12	12	8	8	15	55	11
20	C3M4	10	12	10	12	10	54	10,8
21	C3M5	15	15	15	15	15	75	15
22	C3M6	12	15	15	15	10	67	13,4
23	C3M7	10	10	8	10	10	48	9,6
24	C3M8	12	14	12	12	10	60	12
25	C4M1	15	15	15	15	15	75	15
26	C4M2	15	15	12	12	12	66	13,2
27	C4M3	8	8	8	8	10	42	8,4
28	C4M4	8	10	8	8	10	44	8,8
29	C4M5	15	15	15	15	15	75	15
30	C4M6	14	14	10	15	10	63	12,6
31	C4M7	12	8	10	8	8	46	9,2
32	C4M8	8	8	8	8	10	42	8,4

15: Indica que no se ha formado callo desde los 0 hasta los 15 días

ANEXO 3. Días a la formación de callos hasta los 30 días

Tratamientos		Repeticiones					Total	Promedio
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V		
1	C1M1	30	30	30	30	30	30	30
2	C1M2	30	30	30	30	30	30	30
3	C1M3	20	22	20	20	30	82	16,4
4	C1M4	22	22	22	26	30	92	18,4
5	C1M5	30	30	30	30	30	30	30
6	C1M6	30	30	30	25	30	25	5
7	C1M7	24	22	25	24	30	95	19
8	C1M8	22	22	24	24	30	92	18,4
9	C2M1	30	30	28	30	30	28	5,6
10	C2M2	26	24	22	30	30	72	14,4
11	C2M3	30	30	22	20	22	64	12,8
12	C2M4	22	30	20	30	30	42	8,4
13	C2M5	30	30	30	30	30	30	30
14	C2M6	25	24	20	24	30	93	18,6
15	C2M7	30	22	30	30	30	22	4,4
16	C2M8	26	20	30	30	30	46	9,2
17	C3M1	30	30	30	30	30	30	30
18	C3M2	22	30	24	30	30	46	9,2
19	C3M3	20	30	17	14	30	51	10,2
20	C3M4	20	20	22	22	18	102	20,4
21	C3M5	30	30	30	30	30	30	30
22	C3M6	22	30	30	22	30	44	8,8
23	C3M7	24	22	20	22	24	112	22,4
24	C3M8	22	22	24	22	22	112	22,4
25	C4M1	30	30	30	30	30	30	30
26	C4M2	30	30	20	24	24	68	13,6
27	C4M3	17	17	17	18	18	87	17,4
28	C4M4	24	22	22	24	24	116	23,2
29	C4M5	30	30	30	30	30	30	30
30	C4M6	24	24	20	30	22	90	18
31	C4M7	24	22	24	22	22	114	22,8
32	C4M8	20	20	18	18	22	98	19,6

30: Indica que no se ha formado callo desde los 15 hasta los 30 días

ANEXO 4. Días a la formación de callo hasta los 45 días

Tratamientos		Repeticiones					Total	Promedio
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V		
1	C1M1	45	45	45	45	45	225	45
2	C1M2	45	45	45	45	45	225	45
3	C1M3	36	36	38	36	45	191	38,2
4	C1M4	38	40	38	36	45	197	39,4
5	C1M5	45	45	45	45	45	225	45
6	C1M6	45	45	45	45	45	225	45
7	C1M7	34	34	34	34	34	170	34
8	C1M8	36	36	38	34	45	189	37,8
9	C2M1	45	45	45	45	45	225	45
10	C2M2	38	38	38	40	45	199	39,8
11	C2M3	45	45	38	38	36	202	40,4
12	C2M4	36	45	45	45	45	216	43,2
13	C2M5	45	45	45	45	45	225	45
14	C2M6	45	36	38	42	45	206	41,2
15	C2M7	45	34	45	45	45	214	42,8
16	C2M8	45	45	45	45	45	225	45
17	C3M1	45	45	45	45	45	225	45
18	C3M2	40	45	36	40	45	206	41,2
19	C3M3	36	45	38	38	45	202	40,4
20	C3M4	34	36	45	38	34	187	37,4
21	C3M5	45	45	45	45	45	225	45
22	C3M6	40	45	45	38	45	213	42,6
23	C3M7	36	40	36	36	36	184	36,8
24	C3M8	45	36	34	36	36	187	37,4
25	C4M1	45	45	45	45	45	225	45
26	C4M2	45	45	38	45	40	213	42,6
27	C4M3	38	38	38	38	38	190	38
28	C4M4	38	38	38	38	40	192	38,4
29	C4M5	45	45	45	45	45	225	45
30	C4M6	45	45	36	45	45	216	43,2
31	C4M7	36	38	36	38	36	184	36,8
32	C4M8	34	34	36	36	36	176	35,2

45: Indica que no se ha formado callo desde los 30 hasta los 45 días

ANEXO 5. Color del callo hasta los 15 días

Tratamientos		Repeticiones					Color
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V	Predominante
1	C1M1	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
2	C1M2	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
3	C1M3	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	N.C	5 GY 2/6
4	C1M4	5 GY 2/6	7,5 YR 9/4	5 GY 2/6	5 GY 2/6	N.C	5 GY 2/6
5	C1M5	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
6	C1M6	7,5Y 9/2	7,5Y 9/2	N.C	5 Y 6/4	N.C	7,5Y 9/2
7	C1M7	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 Y 6/4	7,5 YR 9/4	N.C	7,5 YR 9/4
8	C1M8	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	N.C	7,5 YR 9/4
9	C2M1	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	N.C	7,5 Y 6/4
10	C2M2	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	N.C	7,5 YR 9/4
11	C2M3	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4
12	C2M4	7,5 YR 8/2	7,5 YR 8/2	7,5 YR 8/2	N.C	N.C	7,5 YR 8/2
13	C2M5	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
14	C2M6	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	N.C	7,5 Y 6/4
15	C2M7	N.C	7,5 YR 9/4	N.C	N.C	N.C	7,5 YR 9/4
16	C2M8	5 YR 4/6	5 YR 4/6	N.C	N.C	N.C	5 YR 4/6
17	C3M1	N.C	5 Y 3/6	N.C	N.C	5 Y 3/6	5 Y 3/6
18	C3M2	5 Y 4/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	N.C	5 GY 2/6
19	C3M3	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	N.C	5 GY 2/6
20	C3M4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4
21	C3M5	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
22	C3M6	7,5 YR 9/4	5 Y 2/4	5 Y 2/4	5 Y 2/4	7,5 YR 9/4	5 Y 2/4
23	C3M7	7,5 YR 7/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4
24	C3M8	7,5 YR 9/4	5 Y 2/4	5 Y 2/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4
25	C4M1	5 Y 6/4	N.C	N.C	N.C	N.C	5 Y 6/4
26	C4M2	N.C	N.C	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6
27	C4M3	7,5 YR 6/4	5 YR 4/6	7,5 YR 6/4	7,5 YR 6/4	7,5 YR 6/4	7,5 YR 6/4
28	C4M4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4
29	C4M5	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
30	C4M6	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	7,5 YR 9/4	7,5 Y 7/6	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4
31	C4M7	5 Y 2/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4
32	C4M8	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 YR 9/4	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	7,5 YR 9/4

ANEXO 6. Color de callo hasta los 30 días

Tratamientos		Repeticiones					Color
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V	Predominante
1	C1M1	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
2	C1M2	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
3	C1M3	7,5 YR 9/2	7,5 YR 9/2	7,5 YR 8/4	7,5 YR 7/6	N.C	7,5 YR 9/2
4	C1M4	5 GY 2/6	5 Y 2/4	5 Y 2/4	5 Y 2/4	N.C	5 Y 2/4
5	C1M5	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
6	C1M6	5 GY 2/6	5 Y 2/4	N.C	5 GY 2/6	N.C	5 GY 2/6
7	C1M7	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	N.C	7,5 YR 8/4
8	C1M8	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	N.C	7,5 YR 8/4
9	C2M1	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	7,5 Y 6/4	7,5 YR 8/4	N.C	7,5 Y 6/4
10	C2M2	7,5 Y 6/8	5 Y 1/2	7,5 Y 6/8	7,5 Y 6/8	N.C	7,5 Y 6/8
11	C2M3	5 GY 2/6	5 GY 2/6	7,5 YR 8/4	5 GY 2/6	5 Y 2/4	5 GY 2/6
12	C2M4	5 Y 2/4	7,5 YR 9/2	5 Y 2/4	N.C	N.C	5 Y 2/4
13	C2M5	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	N.C	7,5 YR 8/4
14	C2M6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	N.C	5 GY 2/6
15	C2M7	N.C	7,5 YR 8/4	N.C	N.C	N.C	7,5 YR 8/4
16	C2M8	5 Y 2/4	5 Y 2/4	N.C	N.C	N.C	5 Y 2/4
17	C3M1	N.C	5 Y 3/6	N.C	N.C	5 Y 3/6	5 Y 3/6
18	C3M2	7,5 Y 6/8	7,5 Y 6/8	7,5 Y 6/8	5 Y 2/4	N.C	7,5 Y 6/8
19	C3M3	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	N.C	7,5 YR 8/4
20	C3M4	7,5 YR 9/2	7,5 YR 9/2	7,5 YR 9/2	7,5 YR 9/2	7,5 YR 9/2	7,5 YR 9/2
21	C3M5	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
22	C3M6	5 YR 2/6	5 YR 2/6	5 YR 2/6	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	5 YR 2/6
23	C3M7	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4
24	C3M8	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	5 Y 2/4	7,5 YR 8/4
25	C4M1	7,5 Y 6/4	N.C	N.C	N.C	N.C	7,5 Y 6/4
26	C4M2	N.C	N.C	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6
27	C4M3	5 GY 2/6	5 YR 2/6	5 GY 2/6	5 YR 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6
28	C4M4	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 YR 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6	5 GY 2/6
29	C4M5	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
30	C4M6	7,5 Y 7/6	7,5 Y 7/6	7,5 YR 8/4	7,5 Y 7/6	5 GY 2/6	7,5 Y 7/6
31	C4M7	5 GY 2/6	5 GY 2/6	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	5 GY 2/6	5 GY 2/6
32	C4M8	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	7,5 YR 8/4	5 Y 2/4	7,5 YR 8/4

ANEXO 7. Color de callo hasta los 45 días

Tratamientos		Repeticiones					Color
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V	Predominante
1	C1M1	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
2	C1M2	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
3	C1M3	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	5 Y 2/6	7,5 YR 7/2	N.C	7,5 YR 7/2
4	C1M4	5 Y 2/6	5 Y 2/6	5 Y 2/6	7,5 YR 7/2	N.C	5 Y 2/6
5	C1M5	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
6	C1M6	5 GY 2/6	5 Y 1/4	N.C	5 GY 2/6	N.C	5 GY 2/6
7	C1M7	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	N.C	7,5 YR 7/2
8	C1M8	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/4	5 YR 2/6	7,5 YR 7/4	N.C	7,5 YR 7/4
9	C2M1	7,5 Y 6/4	7,5 YR 8/6	7,5 YR 8/6	7,5 YR 8/6	N.C	7,5 YR 8/6
10	C2M2	5 Y 2/6	5 Y 2/6	7,5 YR 7/2	5 Y 2/6	N.C	5 Y 2/6
11	C2M3	5 Y 2/6	5 Y 2/6	7,5 YR 7/2	5 Y 2/6	7,5 YR 7/2	5 Y 2/6
12	C2M4	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	N.C	N.C	7,5 YR 7/2
13	C2M5	7,5 YR 8/6	7,5 YR 8/6	7,5 YR 8/6	7,5 YR 8/6	N.C	7,5 YR 8/6
14	C2M6	5 Y 2/6	7,5 YR 9/6	5 Y 2/6	5 Y 2/6	N.C	5 Y 2/6
15	C2M7	N.C	7,5 YR 7/2	N.C	N.C	N.C	7,5 YR 7/2
16	C2M8	5 YR 4/6	5 YR 4/6	N.C	N.C	N.C	5 YR 4/6
17	C3M1	N.C	5 Y 2/6	N.C	N.C	5 Y 2/6	5 Y 2/6
18	C3M2	7,5 Y 6/8	7,5 Y 6/8	7,5 Y 6/8	5 Y 2/6	N.C	7,5 Y 6/8
19	C3M3	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	5 Y 2/6	N.C	7,5 YR 7/2
20	C3M4	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	5 Y 2/6	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2
21	C3M5	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
22	C3M6	5 Y 2/6	5 Y 2/6	7,5 Y 7/6	7,5 Y 7/6	7,5 Y 7/6	7,5 Y 7/6
23	C3M7	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	7,5 Y 7/2	5 Y 2/6	5 Y 2/6	7,5 YR 7/2
24	C3M8	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4
25	C4M1	7,5 Y 6/4	N.C	N.C	N.C	N.C	7,5 Y 6/4
26	C4M2	N.C	N.C	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	5 Y 2/6	7,5 YR 7/4
27	C4M3	5 Y 2/6	5 Y 2/6	5 Y 2/6	5 Y 2/6	5 Y 2/6	5 Y 2/6
28	C4M4	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	5 Y 2/6	7,5 YR 7/2	5 Y 2/6	7,5 YR 7/2
29	C4M5	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
30	C4M6	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4	5 Y 2/6	7,5 Y 6/8	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/4
31	C4M7	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2
32	C4M8	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/4	7,5 YR 7/2	7,5 YR 7/2

ANEXO 8. Número de callos formados hasta los 15 días

Tratamientos		Repeticiones					Total	Promedio
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V		
1	C1M1	0	0	0	0	0	0	0,00
2	C1M2	0	0	0	0	0	0	0,00
3	C1M3	4	5	2	9	0	20	4,00
4	C1M4	6	4	10	5	0	25	5,00
5	C1M5	0	0	0	0	0	0	0,00
6	C1M6	0	0	0	0	0	0	0,00
7	C1M7	2	1	5	1	0	9	1,80
8	C1M8	5	8	10	5	0	28	5,60
9	C2M1	0	0	0	0	0	0	0,00
10	C2M2	5	2	3	5	0	15	3,00
11	C2M3	3	14	10	8	10	45	9,00
12	C2M4	12	11	12	0	0	35	7,00
13	C2M5	0	0	0	0	0	0	0,00
14	C2M6	3	4	8	4	0	19	3,80
15	C2M7	0	8	0	0	0	8	1,60
16	C2M8	3	20	0	0	0	23	4,60
17	C3M1	0	0	0	0	0	0	0,00
18	C3M2	5	2	1	4	0	12	2,40
19	C3M3	9	4	15	14	0	42	8,40
20	C3M4	15	10	18	11	10	64	12,80
21	C3M5	0	0	0	0	0	0	0,00
22	C3M6	5	2	1	2	4	14	2,80
23	C3M7	9	12	7	13	14	55	11,00
24	C3M8	11	7	5	8	13	44	8,80
25	C4M1	0	0	0	0	0	0	0,00
26	C4M2	0	0	2	8	4	14	2,80
27	C4M3	15	13	15	15	13	71	14,20
28	C4M4	17	14	15	15	16	77	15,40
29	C4M5	0	0	0	0	0	0	0,00
30	C4M6	4	3	6	2	3	18	3,60
31	C4M7	10	14	11	15	16	66	13,20
32	C4M8	10	10	9	9	9	47	9,40

ANEXO 9. Número de callos formados hasta los 30 días

Tratamientos		Repeticiones					Total	Promedio
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V		
1	C1M1	0	0	0	0	0	0,00	0,00
2	C1M2	0	0	0	0	0	0,00	0,00
3	C1M3	10	15	6	12	0	43,00	8,60
4	C1M4	22	16	15	4	0	57,00	11,40
5	C1M5	0	0	0	0	0	0,00	0,00
6	C1M6	0	0	0	3	0	3,00	0,60
7	C1M7	9	8	3	3	0	23,00	4,60
8	C1M8	6	5	6	10	0	27,00	5,40
9	C2M1	0	0	3	0	0	3,00	0,60
10	C2M2	2	4	8	0	0	14,00	2,80
11	C2M3	0	0	10	4	11	25,00	5,00
12	C2M4	8	0	3	0	0	11,00	2,20
13	C2M5	0	0	0	0	0	0,00	0,00
14	C2M6	2	4	11	2	0	19,00	3,80
15	C2M7	0	7	0	0	0	7,00	1,40
16	C2M8	1	40	0	0	0	41,00	8,20
17	C3M1	0	0	0	0	0	0,00	0,00
18	C3M2	8	0	2	0	0	10,00	2,00
19	C3M3	13	0	12	17	0	42,00	8,40
20	C3M4	15	24	2	32	11	84,00	16,80
21	C3M5	0	0	0	0	0	0,00	0,00
22	C3M6	2	0	0	7	0	9,00	1,80
23	C3M7	4	13	10	11	8	46,00	9,20
24	C3M8	11	12	9	12	12	56,00	11,20
25	C4M1	0	0	0	0	0	0,00	0,00
26	C4M2	0	0	2	2	1	5,00	1,00
27	C4M3	11	17	7	16	12	35,00	7,00
28	C4M4	7	13	13	7	9	29,00	5,80
29	C4M5	0	0	0	0	0	0,00	0,00
30	C4M6	3	1	2	0	2	4,00	0,80
31	C4M7	11	15	11	15	16	57,00	11,40
32	C4M8	18	13	17	25	11	84,00	16,80

ANEXO 10. Número de callos formados hasta los 45 días

Tratamientos		Repeticiones					Total	Promedio
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V		
1	C1M1	0	0	0	0	0	0	0,00
2	C1M2	0	0	0	0	0	0	0,00
3	C1M3	10	7	2	10	0	29	5,80
4	C1M4	9	16	11	9	0	45	9,00
5	C1M5	0	0	0	0	0	0	0,00
6	C1M6	0	0	0	0	0	0	0,00
7	C1M7	14	7	4	3	0	28	5,60
8	C1M8	14	9	2	11	0	36	7,20
9	C2M1	0	0	0	0	0	0	0,00
10	C2M2	25	16	17	13	0	71	14,20
11	C2M3	0	0	15	20	20	55	11,00
12	C2M4	22	0	0	0	0	22	4,40
13	C2M5	0	0	0	0	0	0	0,00
14	C2M6	0	6	7	1	0	14	2,80
15	C2M7	0	9	0	0	0	9	1,80
16	C2M8	0	0	0	0	0	0	0,00
17	C3M1	0	0	0	0	0	0	0,00
18	C3M2	8	0	5	10	0	23	4,60
19	C3M3	10	0	16	15	0	41	8,20
20	C3M4	21	17	0	9	12	59	11,80
21	C3M5	0	0	0	0	0	0	0,00
22	C3M6	3	0	0	4	0	7	1,40
23	C3M7	15	7	6	13	18	59	11,80
24	C3M8	0	8	30	11	12	61	12,20
25	C4M1	0	0	0	0	0	0	0,00
26	C4M2	0	0	4	0	4	8	1,60
27	C4M3	14	21	9	13	10	32	6,40
28	C4M4	20	16	14	26	10	50	10,00
29	C4M5	0	0	0	0	0	0	0,00
30	C4M6	0	0	3	0	0	3	0,60
31	C4M7	4	20	12	11	12	55	11,00
32	C4M8	14	8	16	12	8	58	11,60

ANEXO 11. Porcentaje de callos formados hasta los 15 días

Tratamientos		Repeticiones					Promedio	Suma	Porcentaje
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V			
1	C1M1	0	0	0	0	0	0,0	9,0	0,00
2	C1M2	0	0	0	0	0	0,0		0,00
3	C1M3	4	5	2	9	0	4,0		44,44
4	C1M4	6	4	10	5	0	5,0		55,56
5	C1M5	0	0	0	0	0	0,0	9,4	0,00
6	C1M6	2	3	0	5	0	2,0		21,28
7	C1M7	2	1	5	1	0	1,8		19,15
8	C1M8	5	8	10	5	0	5,6		59,57
9	C2M1	4	1	7	3	0	3,0	22,0	13,64
10	C2M2	5	2	3	5	0	3,0		13,64
11	C2M3	3	14	10	8	10	9,0		40,91
12	C2M4	12	11	12	0	0	7,0		31,82
13	C2M5	0	0	0	0	0	0,0	10,0	0,00
14	C2M6	3	4	8	4	0	3,8		38,00
15	C2M7	0	8	0	0	0	1,6		16,00
16	C2M8	3	20	0	0	0	4,6		46,00
17	C3M1	0	1	0	0	1	0,4	24,0	1,67
18	C3M2	5	2	1	4	0	2,4		10,00
19	C3M3	9	4	15	14	0	8,4		35,00
20	C3M4	15	10	18	11	10	12,8		53,33
21	C3M5	0	0	0	0	0	0,0	22,6	0,00
22	C3M6	5	2	1	2	4	2,8		12,39
23	C3M7	9	12	7	13	14	11,0		48,67
24	C3M8	11	7	5	8	13	8,8		38,94
25	C4M1	1	0	0	0	0	0,2	32,6	0,61
26	C4M2	0	0	2	8	4	2,8		8,59
27	C4M3	15	13	15	15	13	14,2		43,56
28	C4M4	17	14	15	15	16	15,4		47,24
29	C4M5	0	0	0	0	0	0,0	26,2	0,00
30	C4M6	4	3	6	2	3	3,6		13,74
31	C4M7	10	14	11	15	16	13,2		50,38
32	C4M8	10	10	9	9	9	9,4		35,88

ANEXO 12. Porcentaje de callos formados hasta los 30 días

Tratamientos		Repeticiones					Promedio	Suma	Porcentaje
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V			
1	C1M1	0	0	0	0	0	0,00	20,00	0,00
2	C1M2	0	0	0	0	0	0,00		0,00
3	C1M3	10	15	6	12	0	8,60		43,00
4	C1M4	22	16	15	4	0	11,40		57,00
5	C1M5	0	0	0	0	0	0,00	10,60	0,00
6	C1M6	0	0	0	3	0	0,60		5,66
7	C1M7	9	8	3	3	0	4,60		43,40
8	C1M8	6	5	6	10	0	5,40		50,94
9	C2M1	0	0	3	0	0	0,60	10,60	5,66
10	C2M2	2	4	8	0	0	2,80		26,42
11	C2M3	0	0	10	4	11	5,00		47,17
12	C2M4	8	0	3	0	0	2,20		20,75
13	C2M5	0	0	0	0	0	0,00	13,40	0,00
14	C2M6	2	4	11	2	0	3,80		28,36
15	C2M7	0	7	0	0	0	1,40		10,45
16	C2M8	1	40	0	0	0	8,20		61,19
17	C3M1	0	0	0	0	0	0,00	27,20	0,00
18	C3M2	8	0	2	0	0	2,00		7,35
19	C3M3	13	0	12	17	0	8,40		30,88
20	C3M4	15	24	2	32	11	16,80		61,76
21	C3M5	0	0	0	0	0	0,00	22,20	0,00
22	C3M6	2	0	0	7	0	1,80		8,11
23	C3M7	4	13	10	11	8	9,20		41,44
24	C3M8	11	12	9	12	12	11,20		50,45
25	C4M1	0	0	0	0	0	0,00	23,40	0,00
26	C4M2	0	0	2	2	1	1,00		4,27
27	C4M3	11	17	7	16	12	12,60		53,85
28	C4M4	7	13	13	7	9	9,80		41,88
29	C4M5	0	0	0	0	0	0,00	32,00	0,00
30	C4M6	3	1	2	0	2	1,60		5,00
31	C4M7	11	15	11	15	16	13,60		42,50
32	C4M8	18	13	17	25	11	16,80		52,50

ANEXO 13. Porcentaje de formación de callo hasta los 45 días

Tratamientos		Repeticiones					Promedio	Suma	Porcentaje
Nº	Símbolo	I	II	III	IV	V			
1	C1M1	0	0	0	0	0	0,00	14,80	0,00
2	C1M2	0	0	0	0	0	0,00		0,00
3	C1M3	10	7	2	10	0	5,80		39,19
4	C1M4	9	16	11	9	0	9,00		60,81
5	C1M5	0	0	0	0	0	0,00	12,80	0,00
6	C1M6	0	0	0	0	0	0,00		0,00
7	C1M7	14	7	4	3	0	5,60		43,75
8	C1M8	14	9	2	11	0	7,20		56,25
9	C2M1	0	0	0	0	0	0,00	29,60	0,00
10	C2M2	25	16	17	13	0	14,20		47,97
11	C2M3	0	0	15	20	20	11,00		37,16
12	C2M4	22	0	0	0	0	4,40		14,86
13	C2M5	0	0	0	0	0	0,00	4,60	0,00
14	C2M6	0	6	7	1	0	2,80		60,87
15	C2M7	0	9	0	0	0	1,80		39,13
16	C2M8	0	0	0	0	0	0,00		0,00
17	C3M1	0	0	0	0	0	0,00	24,60	0,00
18	C3M2	8	0	5	10	0	4,60		18,70
19	C3M3	10	0	16	15	0	8,20		33,33
20	C3M4	21	17	0	9	12	11,80		47,97
21	C3M5	0	0	0	0	0	0,00	25,40	0,00
22	C3M6	3	0	0	4	0	1,40		5,51
23	C3M7	15	7	6	13	18	11,80		46,46
24	C3M8	0	8	30	11	12	12,20		48,03
25	C4M1	0	0	0	0	0	0,00	32,20	0,00
26	C4M2	0	0	4	0	4	1,60		4,97
27	C4M3	14	21	9	13	10	13,40		41,61
28	C4M4	20	16	14	26	10	17,20		53,42
29	C4M5	0	0	0	0	0	0,00	24,00	0,00
30	C4M6	0	0	3	0	0	0,60		2,50
31	C4M7	4	20	12	11	12	11,80		49,17
32	C4M8	14	8	16	12	8	11,60		48,33