



UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRIA EN AGROECOLOGÍA Y AMBIENTE

TITULO

**Eficiencia de la multiplicación *in vitro* de *Juglans neotrópica*
(nogal) en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)**

**TRABAJO DE TITULACION PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TITULO DE
MAGISTER EN AGROECOLOGÍA Y AMBIENTE**

AUTOR: Mélida Noemí Rocano Curillo

C.I. 0104399423

DIRECTOR: Msc. Denisse Fabiola Peña Tapia.

C.I. 0102501809

CUENCA, ECUADOR

2017



RESUMEN

El nogal (*Juglans neotropica*), es una especie apreciada principalmente por su madera, tintes y frutos a la que se le atribuye una gran capacidad adaptativa para ser utilizada en programas de forestación y reforestación. Generalmente propagada por semillas a pesar de que presenta limitaciones en su germinación pues su latencia profunda hace que requiera períodos relativamente largos para su germinación, por lo que existe interés en desarrollar protocolos de propagación in vitro que permitan acelerar este proceso. En el presente trabajo se evaluó la eficiencia de los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) en la multiplicación del nogal, como una herramienta novedosa para la producción acelerada de plantas, en este estudio se comparan los resultados de la multiplicación in vitro en BIT frente al método convencional en medio semisólido obteniendo mayor eficiencia en el sistema BIT. Posteriormente se evaluaron tres frecuencias de inmersión, cada 6, 8 y 12 horas y la aplicación de ventilación forzada, durante un período de 45 días, finalmente se realizó un análisis comparativo de los costos. Los resultados indican que la frecuencia de inmersión con mejor resultado en relación a la calidad de brotes generados fue la aplicada cada 12 h, la ventilación forzada por un minuto cada cuatro horas no tuvo un efecto en la multiplicación pero si produjo una disminución de la hiperhidricidad de los brotes durante el proceso.

Palabras clave: *JUGLANS NEOTROPICA*, NOGAL, TOCTE, BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL. (BIT)



ABSTRACT

The Andean walnut (*Juglans neotropica*) is a species prized mainly for its wood, dyes and fruits with a great adaptive capacity to be used in afforestation and reforestation programs. Generally propagated by seeds, this species presents limitations during its germination due to the deep dormancy of the embryos that delays germination. Currently, there is great interest in developing in vitro propagation protocols that could allow to reduce its germination time. In order to evaluate the efficiency of Temporal Immersion Bioreactors (BIT) in walnut multiplication as a novel tool for the accelerated production of plants, this study compares the results of in vitro multiplication in BIT versus the conventional method using semisolid medium, obtaining greater efficiency in the BIT system.

Three immersion frequencies were tested (every 6, 8 and 12 hours) along with the application of forced ventilation, during a period of 45 days. A comparative costs analysis was also carried out for both protocols. The frequency of immersion showing the best results in relation to the quality of shoots generated was immersion for 12 h and forced ventilation for one minute every 4 hours. This treatment did not have change the multiplication rate but reduced the hyperhydricity of the shoots formed.

Key words: *JUGLANS NEOTROPICA*, TOCTE, TEMPORAL IMMERSION BIOREACTORS (TIB)



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
TABLA DE CONTENIDOS	3
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA	9
AGRADECIMIENTOS	12
DEDICATORIA.....	13
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	14
1.2 OBJETIVO GENERAL - Establecer un protocolo para la proliferación de brotes de <i>Juglans neotropica</i> (nogal) en Biorreactores de Inmersión Temporal.	16
1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS -	16
2.1 Características generales de <i>Juglans neotropica</i> Diels. (nogal)	17
2.2 Estrategias de micropropagación.	19
2.2.1 Cultivo de Tejidos	19
2.2.2 Etapas de la micropropagación.	21
2.2.2.1 Etapas 0: Selección de plantas madre.	21
2.2.2.2 Etapa I: Establecimiento de un cultivo aséptico.	22
2.2.2.3 Etapa II: Producción de plantas con características adecuadas	22
2.2.2.4 Etapa III: Preparación para el crecimiento en el medio ambiente.	22
2.2.2.5 Etapa IV: Traslado al medio ambiente.	23
2.2.3 Medios de cultivo.	23
2.2.4 Parámetros que afectan la eficiencia de los Sistemas de Inmersión Temporal	24
2.2.5 Sistemas de Inmersión Temporal en <i>Juglans Neotropica</i> Diels (Nogal)	28
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Ubicación.....	31
3.1.1 Características del sitio experimental.	31
3.2 Materiales y métodos.....	31
3.2.1 Material vegetal	31
3.3 Metodología.	32
3.3.1 Etapa de Establecimiento.	32



3.3.2	Inducción a la multiplicación en sistema semisólido (convencional)	34
3.3.3	Cultivo en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)	36
3.3.3.1	Factores de evaluación:	38
	Sistemas de cultivo Semisólido y BIT	38
–	Sistema de cultivo semisólido	38
–	Sistema de cultivo BIT	38
	En Sistemas de Inmersión Temporal.....	38
3.3.3.2	Tratamientos.	39
3.3.3.3	Unidad Experimental.....	39
3.3.3.4	Análisis Estadístico	41
3.3.4	Características del área experimental	41
3.4	VARIABLES Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN.....	41
3.4.1	Número de Brotes.....	42
3.4.2	Tamaño de Brotes.....	42
3.4.3	Número de Hojas.....	42
3.4.4	Masa fresca.....	42
3.4.5	Masa seca	42
3.4.6	Brotes hiperhídricos.....	42
3.5	Análisis de los costos de la producción de <i>J. neotropica</i> en el sistema semisólido y en BITS.....	43
	CAPITULO IV: RESULTADOS	44
4.1	Resultados del establecimiento de embriones maduros de <i>J. neotropica</i> (etapa I).....	44
4.2	Efecto del Sistema de Cultivo Semisólido y BIT sobre el número de brotes. .	44
4.3	Multiplicación de <i>Juglans neotropica</i> en Biorreactores de Inmersión Temporal.....	46
4.2.1	Efecto de las frecuencias de inmersión sobre el número de brotes.....	46
4.2.2	Efecto de las frecuencias de inmersión sobre las variables indicadoras de calidad (tamaño, número de hojas, masa fresca y seca).	46
4.2.3	Efecto de la ventilación sobre número de brotes obtenidos	48
4.2.4	Efecto combinado de la ventilación y frecuencia de inmersión sobre las variables indicadoras de calidad.....	49
4.2.4.1	Efecto de la ventilación y frecuencias de inmersión sobre el número de brotes	49



4.2.4.2	Efecto de la ventilación y frecuencias de inmersión sobre el tamaño del brote	50
4.2.4.3	Efecto de la ventilación y frecuencias de inmersión sobre el número de hojas	51
4.2.4.4	Efecto de la ventilación y frecuencia de inmersión sobre la masa fresca y seca	51
4.2.5	Efecto de la frecuencia de inmersión y ventilación sobre la cantidad de brotes hiperhídricos.	53
4.3	Análisis de costos de producción de plantas de nogal producidas en el sistema convencional y en BITS.	54
CAPITULO V: DISCUSIÓN		59
5.1	Establecimiento de embriones cigóticos maduros de <i>J. neotrópica</i> .	59
5.2	Efecto del sistema de cultivo sobre el número de brotes.	59
5.3	Efecto del sistema de cultivo (BIT, Semisólido) en las variables de calidad.	60
5.4	Efecto de la frecuencia de inmersión en el número de brotes.	61
5.5	Efecto de la frecuencia de inmersión en las variables indicadoras de calidad.	63
5.6	Efecto de las frecuencias de inmersión y ventilación sobre el número de brotes.	63
5.7	Efecto de las frecuencias de inmersión y ventilación sobre el número de brotes hiperhídricos.	64
5.8	Efecto de las frecuencias de inmersión y ventilación sobre las variables indicadoras de calidad.	65
5.9	Análisis de costo de la propagación convencional versus BITS.	66
CAPITULO VI: CONCLUSIONES		71
1.	Bibliografía.	73



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de sales en (mg/l) de cada medio de cultivo.....	34
Tabla 2. Tratamientos utilizados para comparación de la eficiencia del Sistema de cultivo empleado Semisólido y BIT	39
Tabla 3. Tratamientos utilizados para determinar la eficiencia en la multiplicación de <i>J. neotropica</i> en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT).	39
Tabla 4. Resultados del establecimiento de embriones cigóticos de <i>J. neotropica</i> en medio semisólido.....	44
Tabla 5. Porcentajes de brotes hiperhídricos por frecuencias de inmersión con y sin ventilación.....	53
Tabla 6. Costo de las soluciones madre por 100ml	56
Tabla 7: Comparación del costo por plántula obtenida en sistema convencional (semisólido) y BITs, para las etapas de establecimiento y multiplicación de <i>J. neotropica</i>	58



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Preparación de material para establecimiento in vitro de <i>J. Neotrópica</i> . ..	32
Figura 2. Establecimiento de embriones de <i>J. neotropica</i> en medio de cultivo MS, semisólido.....	33
Figura 3. Siembra de plántulas de <i>J. Neotropica</i> a multiplicación bajo el sistema convencional.....	35
Figura 4. Plántulas de <i>J. neotropica</i> después de 1,2 y 3 subcultivos cada 21 días en medio semisólido.....	35
Figura 5. Esquema de funcionamiento del BIT desarrollado por Escalona et. al., (1999).....	37
Figura 6. Preparación de material y siembra de explantes en BIT.	38
Figura 7: Efecto del Sistema de Cultivo sobre el número de brotes (a); tamaño de brote (b); número de hojas (c); masa fresca y seca (d y e).	45
Figura 8. Efecto en el número de brotes por frecuencia de inmersión.....	46
Figura 9. Efecto de las frecuencias de inmersión sobre las variables indicadoras de calidad a) tamaño del brote, b) número de hojas, c) masa fresca, d) masa seca.....	47
Figura 10. Efecto de la ventilación en el número de brotes obtenidos por explante con y sin ventilación	48
Figura 11. Efecto de la ventilación en número y tamaño del brote con y sin ventilación.	50
Figura 12. Efecto de la ventilación en el número de hojas bajo la influencia de la ventilación y frecuencia de inmersión.....	51
Figura 13. Efecto de la ventilación en la masa seca y fresca de los brotes bajo la influencia de la ventilación y frecuencia de inmersión.	52



Figura 14. Brotes de J neotrópica obtenidos en las diferentes frecuencias de inmersión..... 54

Figura 15. Diagrama de flujo de las actividades desarrolladas en..... 55



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

	Micromol
μM	
BAP	6- Bencil amino purina
BioMINT®	Biorreactor Modular de Inmersión Temporal
BIT	Biorreactores de inmersión temporal
DKW	Driver & Kuniyuki
GLM	Modelo lineal generalizado
IBA	Ácido indol butírico
MS	Murashig & Skoog
RITA®	Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado
SED	Error estándar de la diferencia.
SIT	Sistema de inmersión Temporal
TDZ	Thidiazurom
WPM	Woody plant medium
$\mu\text{mol.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	Micro mol por metro cuadrado por segundo
ZEA	Zeatina
2-4 D	2-4 diclofenoxiacético



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Mélida Noemí Rocano Curillo, autora del Trabajo de Titulación “Eficiencia de la multiplicación *in vitro* de *Juglans neotrópica* (nogal) en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Magister en Agroecología y Ambiente, El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 19 Abril del 2017

Mélida Noemí Rocano Curillo

C.I: 0104399423



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Mélida Noemí Rocano Curillo, autora del Trabajo de Titulación "Eficiencia de la multiplicación *in vitro* de *Juglans neotrópica* (nogal) en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 19 de Abril del 2017

Mélida Noemí Rocano Curillo

C.I.: 0104399423



AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es fruto de un esfuerzo conjunto, es por esto que hago un agradecimiento a mi directora, Msc. Denisse Peña Tapia por su voluntad, dedicación experiencia, a las autoridades de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, en los nombres de Dr. Manuel Soria y Dr. Fernando Bermúdez, por abrirme las puertas para la ejecución del experimento en sus instalaciones, a la Dra. Maritza Escalona, Dr. Javier Aguirre y Eco. Carlos Torres por compartir su conocimientos, ideas y recomendaciones; A mi familia por su apoyo incondicional finalmente gracias a mis compañeros por sus palabras de motivación.

Mélida Rocano.



DEDICATORIA

Con mucho cariño a mis hijos Martín y Benjamín por ser los motores de mi vida y proyectos.

A mis padres Ángel y Lucía por darme la vida y sobre todo ese apoyo incondicional en cada momento de mi vida.

Mélida Rocano.



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La pérdida de hábitats, su fragmentación y degradación sumadas al cambio climático tienen un impacto en la supervivencia de especies leñosas (Pijut et al. 2011). La explotación forestal no sostenible y la tala ilegal constituyen las mayores amenazas que enfrentan los bosques nativos del Ecuador. (Grijalva & Checa, 2012). Bajo este marco, a nivel político se impulsan iniciativas apoyando programas de reforestación con especies nativas para fines productivos y de protección (FAO & MAE, 2008). Dichas especies nativas deben tener la potencialidad de adaptarse y reestablecer la diversidad (Urgilés et al. 2016). Herrera (2016), en su estudio manifiesta que *Juglans neotropica*, tiene una alta capacidad adaptativa, recomendada para programas de forestación y reforestación, sin embargo, su dispersión y regeneración se ven limitadas por el bajo número de individuos encontrados en campo y bajos porcentajes de germinación .

Los sistemas de propagación vegetativa tradicionales en la familia *Juglandaceae*, son ineficientes y complejos para la producción de grandes volúmenes de plantas (Licea, 2016). Ante esta situación la micropropagación se plantea como la mejor alternativa para superar algunas de éstas dificultades (Ballester & Vieitez, 2006). En el género *Juglans* varios son los estudios, iniciándose en 1984 con Driver y Kuniyuki quienes establecen una formulación específica para el género, dando apertura a un nuevo camino para su micropropagación (Licea, 2016). Sánchez et al. (2006) en su estudio comparativo entre los medios MS (Murashige & Skoog, 1962); WPM (Lloyd & McCown, 1980); DKW (Driver & Kuniyuki , 1984) y NGE (Sánchez et al., 2006) señalan que el medio WPM estimula la germinación de embriones, resultado corroborado por Long, Preece, & Van Sambeek, (1995) quienes indujeron embriones



somáticos en el medio WPM, por el contrario Bosela & Michler (2008) evaluaron los medios MS, DKW y WPM, así como una reducción al 50% del medio DKW, afirmando que las variantes bajas en sales (WPM y $\frac{1}{2}$ DKW) no fueron adecuadas para el cultivo *in vitro* de yemas axilares de *J. nigra*. Por su parte Amiri & Gharati, (2012) demostraron la eficiencia del medio DKW, en plántulas obtenidas del aislamiento *in vitro* de embriones inmaduros de *Juglans regia*.

Para la fase de proliferación existe similitudes en las dosis y tipos de reguladores de crecimiento empleadas, siendo 6-bencil amino purina (BAP) y ácido indol butírico (IBA) las más usadas (Payghamzadeh & Sayyed, 2011), tradicionalmente en medios semisólidos. Sin embargo, los nuevos retos del cultivo de tejidos incluyen la disminución de costos, la automatización, además la tendencia de pasar de medios con agar a medios líquidos constituyendo una estrategia y un gran desafío para los estudios de nogal (García et al. 2010).

La automatización mediante el uso de Sistemas de inmersión temporal (SIT) han sido aplicados a escala comercial en un gran número de especies como: sábila (*Aloe barbadensis Mill.*) (Albany de Vílchez, 2015), papa (Iles, et al. 2015), mora (*Rubus glaucus Benth*) (Zapata Maldonado, 2014), entre otros; son escasos los estudios en especies forestales; sin embargo en teca (Quiala, et al. 2012) y *Eucalyptus grandis* (Oliveira, et al. 2014) han reportado altas tasas de proliferación.

En nogales, su recalcitrancia y los escasos resultados publicados, han limitado el escalado comercial y el máximo aprovechamiento de esta tecnología. (Pascual Alcón, Ligos, & De Peña, 2009). En el presente trabajo se evaluó la eficiencia de la multiplicación *in vitro* de *J. neotrópica* empleando Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) en comparación con el método tradicional en medio semisólido y los



costos que se generan, además del análisis de las condiciones específicas de cultivo en BIT, para contribuir así en la propagación y permanencia de *Juglans neotrópica* en los ecosistemas de bosque andino.

1.2 OBJETIVO GENERAL - Establecer un protocolo para la proliferación de brotes de *Juglans neotropica* (nogal) en Biorreactores de Inmersión Temporal.

1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS -

- Determinar la eficiencia del cultivo en inmersión temporal al comparar con el cultivo en semi-sólido.
- Evaluar el efecto de la frecuencia de inmersión (2f/día, 3F/día y 4 F/día) con y sin ventilación forzada y su efecto en el coeficiente de multiplicación y calidad de los brotes.
- Realizar el análisis comparativo de la eficiencia del uso de los recursos y tiempo entre el sistema BITs y el sistema convencional en cultivo semisólido.



CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características generales de *Juglans neotropica* Diels. (nogal)

J. neotropica es una especie nativa de Ecuador, Colombia, Perú y Bolivia; (Rojas & Torres, 2008), se distribuye altitudinalmente entre los 800-3000 m.s.n.m. (CATIE, 2000) En Colombia ha sido categorizada en peligro según el libro rojo de plantas maderables debido a su explotación indiscriminada, (Salinas & Cárdenas, 2007). En Ecuador se encuentra bajo la Norma Técnica N° 128 del Ministerio del Ambiente (MAE, 2006) donde se establece como una especie de aprovechamiento condicionado para un manejo sustentable del bosque andino.

J. neotropica, posee una de las maderas duras más valiosas, también se la cultiva por sus nueces, pero esta especie es más valorada por su madera de alta calidad, muy apreciada para muebles finos, culatas, armarios y chapas (Williams, 1990); (Payghamzadeh & Sayyed, 2011),

La germinación de *J. neotropica* se ha reportado con porcentajes muy bajos alcanzando tasas de 6,75% de germinación; (Herrera, 2016) sin embargo, experiencias realizadas en la Universidad Nacional de Loja evidencian que semillas sin limpiar, sembradas con pulpa y en almácigos a la intemperie pudieron germinar a una tasa del 60% (Raurau, 2012).

Feuillet et al. (2011) manifiestan que esta es una de las especies con mayor valor de uso para la elaboración de tintes y bisutería, el material de base utilizado son sus frutos y corteza, del mismo modo, en medicina Texeira, (2015) afirma que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *J. neotropica* fue efectiva como agente gastroprotector en ratones, en un modelo de inducción de úlceras gástricas por etanol 96°.



Además, en Europa y en Nueva Zelanda se está plantado por la calidad de su madera y como potencial productor de nuez. (Ospina et al. 2003). Herrera, (2016) considera a *J. neotropica* como una buena especie para ser utilizada en programas de forestación y reforestación ya que muestra gran capacidad adaptativa, sin embargo, López & Piedrahita (1998) reportan que la semilla de *J. neotropica* registra baja capacidad germinativa, irregular uniformidad de su germinación y latencia profunda, además Bosela & Michler, (2008) indican que por falta de técnicas rentables de propagación vegetativa han impedido su clonación y explotación comercial en la familia de las juglandaceas.

Debido a las limitantes que esta especie presenta en su germinación y por ello su propagación, se ha visto la necesidad de buscar herramientas que permitan su recuperación, protección y multiplicación; para ello una importante alternativa es la utilización de la biotecnología, uno de los métodos es la regeneración de plantas a partir de embriones cultivados *in vitro*. (Toosi & Dilmagani, 2010)

La micropropagación es una de las herramientas de la biotecnología ideal para la multiplicación comercial de importantes genotipos élite, especies amenazadas y las difíciles de propagar a través de otros medios (Watt, 2012). En los últimos años, el uso de técnicas de cultivo *in vitro* han venido en aumento, ya que permiten la producción de un gran número de plántulas. La micropropagación constituye una alternativa al método convencional para la producción de plantas de nogal, ya que permite reducir el ciclo de generación, pues sus semillas requieren estratificación por un periodo de 2-3 meses para su germinación, (Bosela & Michler, 2008).



2.2 Estrategias de micropropagación.

2.2.1 Cultivo de Tejidos

El Cultivo de tejidos vegetales es la ciencia del cultivo de células, tejidos u órganos aislados de una planta madre, en medios artificiales (George, 2008); para ello se han desarrollado varias técnicas mediante las cuales dicho órgano se cultiva asépticamente y se incuba en condiciones ambientales controladas. (Mroginski & Roca, 1993). Se basa en el principio de totipotencia celular, que establece que a partir de cualquier célula de una planta es posible regenerar un individuo completo. (Trejo & Rodríguez, 2007).

Las principales aplicaciones de esta técnica de cultivo se encuentran en los campos de la micropropagación, obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos e investigación básica en áreas como la genética, fisiología y bioquímica (Fowler, 1987; Carpita & McCann, 2000; Calva & Pérez, 2005). Es así que se están impulsando con gran fuerza en el ámbito agrícola, existiendo ya numerosas aplicaciones comerciales, además, se empieza a implementar en el sector forestal. (Toribio, 2000).

Por lo general, los protocolos son primero desarrollados utilizando explantes juveniles (a partir de semillas, plántulas o árboles pequeños) para establecer métodos útiles en el desarrollo de sistemas de propagación clonal de árboles maduros (Pijut et al. 2011). Varias son las ventajas que presenta la micropropagación, pero una de sus limitantes son los precios elevados de las plántulas micropropagadas comparadas con los métodos convencionales, estos costos se reducen cuando se tienen sistemas estables de multiplicación a gran escala (Aguilar & Mesén, 2006). En los últimos años, los



sistemas de inmersión temporal (SIT) han sido reconocidos como una tecnología de perspectiva para la micropropagación de plantas (Georgiev, Schumann, Pavlov, & Bley, 2014); ganando atención, ya que es una tecnología importante que reduce mano de obra proporcionando bajos costos de producción. (Takayama & Akita, 2005).

Los SIT son plataformas automatizadas para el contacto controlado de corto tiempo de los explantes de la planta con un medio líquido en un ambiente aséptico (Georgiev et al, 2014) En los SIT intervienen una serie de factores físicos, mecánicos y ambientales que posibilitan obtener una mejor respuesta fisiológica y lograr una mayor eficiencia en el cultivo (Escalona, et al., 2007).

En la actualidad se puede encontrar una amplia variedad de modelos y sistemas automatizados utilizados para la micropropagación de plantas, entre ellos resaltan el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT®) (Escalona, et al., 1999), el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®) (Alvarad et al. 1993) el Biorreactor Modular de Inmersión Temporal (BioMINT®) (Robert et al. 2005), el Plantima® (A-Tech Bioscientific Co.) SETIS® (SETIS, 2012) entre otros (Georgiev et al. 2014)

Todos estos sistemas cumplen los requisitos mencionados por Teisson et al. (1999) tales como: evitar la inmersión continua, permitir el suministro y transferencia adecuada de oxígeno; proveer cambios de medios secuenciales y automáticos, además de reducir costos de producción.

Los Biorreactores de inmersión temporal de vasos gemelos (BIT) de Escalona et al., (1999), se han convertido en una herramienta eficaz para la micropropagación, ya que incrementan el coeficiente de multiplicación y mejoran la calidad del material *in vitro* (Watt, 2012) además, al hacer posible la automatización del sistema se reducen los costos de producción (Afreeen, 2006) disminuyendo drásticamente el trabajo del operador, la superficie de estantería y el número de contenedores utilizados; (Etienne



& Berthouly, 2002), varias son las ventajas de este sistema pero a menudo son contrarrestados por problemas como la muerte por asfixia, hiperhidricidad y la necesidad de un equipo complejo (Teisson & Alvard, 1995). La hiperhidricidad, es un trastorno fisiológico grave, que afecta al cultivo en medio líquido, sin embargo el problema se compensa al exponer la planta al medio líquido de forma intermitente, bajo este contexto, los Biorreactores de Inmersión Temporal (BITs) pueden eliminar o controlar el trastorno antes descrito ajustando los tiempos y frecuencias de inmersión. (Berthouly, & Etienne, 2002).

2.2.2 Etapas de la micropropagación.

En el proceso de micropropagación Debergh & Maene (1981) define cinco etapas que han sido adoptadas ampliamente, siendo estas:

Etapas 0: Selección de plantas madre.

Etapas I: El establecimiento de un cultivo aséptico.

Etapas II: La producción de plántulas con características adecuadas.

Etapas III: Preparación para el crecimiento en el medio Ambiente.

Etapas IV: Traslado al medio ambiente.

2.2.2.1 Etapas 0: Selección de plantas madre.

El cultivo de tejidos se inicia a partir de pedazos de planta denominados explantes, la elección del mismo dependerá del tipo de cultivo, el propósito y la especie con la que se pretende trabajar, dichos explantes procederán de plantas de la misma variedad o especie, libre de cualquier síntoma de enfermedad, o se pueden realizar pretratamientos medioambientales y químicos a las mismas, a las plantas donadoras de explantes se las llama plantas madre (George et al. 2008).



2.2.2.2 Etapa I: Establecimiento de un cultivo aséptico.

Esta fase consiste en obtener un cultivo del material vegetal seleccionado, su éxito exige que los explantes sean transferidos al medio de cultivo libres de contaminantes microbianos evidentes; posteriormente estos explantes deberán tener algún tipo de crecimiento (brote, callo) se considera satisfactoria la etapa cuando un número adecuado de explantes hayan sobrevivido libre de contaminantes. (George & Debergh, 2008).

2.2.2.3 Etapa II: Producción de plantas con características adecuadas

El objeto de esta fase es producir nuevos brotes de plantas que, cuando se separan del cultivo, son capaces de dar origen a plantas completas, en algunos métodos de micropropagación, los brotes son utilizados como base para ciclos adicionales de multiplicación, ya que por lo general pueden cultivarse (subcultivo), para aumentar su número. (George & Debergh, 2008)

2.2.2.4 Etapa III: Preparación para el crecimiento en el medio ambiente.

Los brotes o plántulas derivados de la etapa II son pequeños incapaces de su crecimiento autosostenido en el suelo o sustrato, en la etapa III, se toman medidas para cultivar individuos, capaces de llevar a cabo la fotosíntesis así como menciona Murashige & Skoog, (1964) el estado III se incluye el enraizamiento *in vitro* antes de su transferencia al suelo. (George & Debergh, 2008). La etapa III suele dividirse convenientemente, según Debergh y Maene (1981) en etapa IIIa, la elongación de brotes, para proporcionar brotes de tamaño adecuado para su enraizamiento en la etapa IIIb.



2.2.2.5 Etapa IV: Traslado al medio ambiente.

Los métodos por los cuales las plántulas transferidas desde el ambiente *in vitro* al *ex vitro* son muy importantes; la transferencia inadecuada puede provocar pérdidas significativas del material propagado porque las plántulas han crecido en alta humedad y baja intensidad de luz. Por lo general, a las plántulas se las extrae de la etapa III y si han sido cultivadas en agar, se lavan cuidadosamente las raíces; las plántulas son entonces trasplantadas en un sustrato adecuado como turba, compost o arena, manteniéndolas durante varios días con alta humedad y baja intensidad luminosa. (George & Debergh, 2008)

2.2.3 Medios de cultivo.

El material que se desee cultivar se lo puede establecer en un medio líquido o en un medio solidificado parcialmente, el método empleado dependerá del tipo de cultivo y de su objetivo. Las plantas propagadas en BIT por lo general se sumergen en medio líquido; la respuesta de crecimiento de las plantas en dicho medio varía entre especies o géneros (Takayama & Akita, 2005).

El uso de medio líquido ayuda al rápido crecimiento del explante en comparación con el medio semisólido, esto, debido a que una mayor área del explante se encuentra en contacto con el líquido, la agitación del medio provoca gradientes de difusión de nutrientes, además se reducen gases permitiendo una absorción más eficiente de los nutrientes y reguladores de crecimiento. (George et al., 2008). Asimismo Alvarad, et al (1993) agregan que otra ventaja de los SIT, es la disminución del tiempo de respuesta de las vitroplantas, todo esto debido a la absorción más rápida de los nutrientes y los reguladores de crecimiento en los medios de cultivo líquidos.



2.2.4 Parámetros que afectan la eficiencia de los Sistemas de Inmersión

Temporal

Los parámetros de cultivo que afectan a la eficacia de los Sistemas de Inmersión Temporal son: la combinación de la ventilación de los tejidos de la planta y el contacto intermitente entre toda la superficie del tejido y el medio líquido, el volumen del medio y cantidad de medio. (Berthouly, & Etienne, 2002).

2.2.4.1 Tiempo y Frecuencia de Inmersión

En la micropropagación de plantas en Biorreactores de Inmersión Temporal, el tiempo y la frecuencia de inmersión son los parámetros decisivos para lograr la eficiencia del sistema (Etienne & Berthouly, 2002), el contacto intermitente del medio nutritivo con los explantes proporciona una capa delgada de medio que se adhiere en toda la superficie del explante por cohesión y se renueva con cada inmersión. (Albany, 2015), además dichos parámetros se encuentran relacionados tanto en la asimilación de los nutrientes por los explantes, como en la renovación de la atmósfera dentro del recipiente de cultivo evitando la acumulación de gases perjudiciales como el etileno, que promueve la senescencia de los tejidos, así se facilita la regulación de la concentración de CO₂ y se mejora la oxigenación de los tejidos (Escalona, 2003; McAlister et al., 2005; González, 2013), ajustando los tiempos y frecuencias inmersión se puede eliminar o controlar la hiperhidricidad, que afecta gravemente a los cultivos en medio líquido (Etienne & Berthouly, 2002).

En el medio de cultivo los reguladores del crecimiento permiten conducir la morfogénesis de los tejidos y modificar las respuestas fisiológicas en condiciones in vitro. Dentro de estos compuestos se encuentran las auxinas, cuyos efectos están



relacionados con la dominancia apical y con la inducción de los procesos rizogénicos en las plantas y promueven el crecimiento por medio de los mecanismos de elongación celular. (Salisbury & Ross, 1994)

Los períodos de inmersión varían mucho dependiendo de la especie en estudio, varios autores han demostrado la necesidad de la optimización de esta variable; en eucalipto una frecuencia de 12 horas por 3 minutos mejoró el coeficiente de multiplicación y la calidad de las plántulas. (Castro & González, 2002); Para la variedad CEMSA $\frac{3}{4}$ de plátano se logró el coeficiente de multiplicación de 15,99 con un tiempo de inmersión de 10 minutos y una frecuencia de 3 horas; (Basail, et al., 2015); en *Stevia rebaudiana* el mayor crecimiento de los explantes y el incremento en la inducción de brotes se logró en tiempos de inmersión de 10 minutos cada 12 horas, (Alvarenga Venutolo, 2015). Para piña Merr Variedad MD2 se usó un período de 3 minutos cada 3 horas obteniendo un índice de multiplicación de 11 plántulas (LLanos Buendía, 2015)

2.2.4.2 Volumen de medio de cultivo.

Optimizar el volumen de medio y del recipiente de cultivo también mejora sustancialmente la eficacia, especialmente para la proliferación de brotes, varios autores han demostrado que altos volúmenes fueron menos eficientes, sugiriendo que los cultivos producen sustancias químicas extracelulares que estimulan la formación de brotes, estas se diluye cuando se utilizan grandes volúmenes de medio. (Etienne & Berthouly, 2002).

El volumen del medio nos permite controlar la cantidad de nutrientes, evita las pérdidas debido al consumo de los explantes y la evapotranspiración y facilita la dilución de productos tóxicos o inhibidores de procesos favorables o no a la morfogénesis. (Escalona, et al., 2007)



2.2.4.3 Volumen del contenedor o recipiente.

En el método convencional, semisólido, los contenedores utilizados son pequeños comparados con los que se usan para los sistemas de inmersión temporal, en el mercado se pueden encontrar una variedad de tamaños y formas que pueden ser adaptados al sistema con el que se esté trabajando. (Etienne & Berthouly, 2002); Este parámetro influye ya que a mayor capacidad del frasco de cultivo en el BIT, aumenta el volumen gaseoso por explante; siendo una medida de la densidad de inóculo que se requiere para el escalado. (Escalona M. , 2015), bajo este contexto, el uso de contenedores más grandes significa que se utilizarán mayores volúmenes de medio de cultivo, que puede tener un efecto positivo sobre el material vegetal en la proliferación y el crecimiento. (Etienne & Berthouly, 2002)

2.2.4.4 Aireación y ventilación forzada.

El ambiente interior de un recipiente de cultivo de tejidos es diferente del ambiente circundante exterior, dependiendo de los tejidos dentro del recipiente y el fotoperiodo la concentración de CO₂ será alta o baja, a diferencia de las concentraciones de etileno y humedad relativa que son altos, principalmente debido a los efectos combinados de evaporación continua del medio de cultivo y la transpiración de las hojas, (George, et al 2008), las plantas obtenidas bajo las condiciones antes descritas, pueden presentar alteraciones o déficit en cuanto a su estructura anatómica, morfológica y fisiológica. (Cañal, M.J. et al, 2001)

La aireación puede mejorar el intercambio de aire entre el entorno exterior y el medio ambiente *in vitro*, actualmente hay muchos recipientes de cultivo de tejidos



especialmente diseñados y disponibles en el mercado para mejorar el intercambio de aire. (Zobayed, 2006)

La aireación forzada es el proceso de mover mecánicamente el aire del exterior al interior de un recipiente de cultivo y viceversa, es uno de los métodos más eficaces para la ventilación y el principio básico es crear una presión positiva dentro del recipiente, que conduce a la renovación completa de la atmósfera (Etienne & Berthouly, 2002). Con este sistema, la composición gaseosa (CO₂), vapor de agua o cualquier otro gas puede ser controlado relativamente, mediante el uso de una válvula, el controlador de flujo y una bomba de aire (Kozai et al. 1995)

Bajo condiciones de ventilación forzada, con frecuencia la transpiración puede aumentar debido a que la humedad relativa baja dentro del contenedor, al mismo tiempo hay una mayor velocidad de la corriente de aire alrededor de las hojas y los estomas son funcionales, lo que puede estimular el desarrollo de las plantas a través de la mejora del transporte acrópeto de los nutrientes disueltos, además la evaporación estimula el desarrollo de precursores de la cera de la cutícula en la superficie de la hoja (Kozai, T. et al 2005)

La humedad relativa que resulta de la ventilación forzada puede estimular la transpiración de las plantas, que a su vez permite la adaptación de las plantas de manera más eficaz a las condiciones *ex vitro* (Wardle et al. 1983; Etienne & Berthouly, 2002). Asimismo ligeros cambios en el déficit de presión de vapor *in vitro* producen diferencias significativas en el crecimiento y la morfología de las plántulas (Kozai, T. et al., 2005).



2.2.5 Sistemas de Inmersión Temporal en *Juglans Neotropica* Diels (Nogal)

Las especies de *Juglans* por lo general son propagadas por semillas, aunque el embrión en estado latente es la principal limitación de la propagación y el desarrollo de cultivares de alto rendimiento a través de la hibridación. (Payghamzadeh & Sayyed, 2011). Varias son las evidencias de estudios realizados para este género en la propagación *in vitro* en sistema semisólido, sin embargo no se han reportado experiencias de propagación de *Juglans neotropica* en Sistemas de Inmersión Temporal.

En las últimas dos décadas, un gran número de obras se han publicado en diferentes especies del género *Juglans* utilizando diferentes tipos de explantes, medios, condiciones de cultivo y técnicas de enraizamiento con resultados alentadores, es así, que las técnicas de cultivo *in vitro* han sido investigadas para el éxito de la propagación a gran escala en dicho género, por ejemplo: Long & Van Sambeek (1995) realizaron la embriogénesis somática a partir de cotiledones inmaduros de *Juglans nigra* estableciendo que el mejor tratamiento para la inducción de embriones somáticos y brotes esporádicos de explantes de cotiledones inmaduros estaba en el medio (WPM) (Lloyd & McCown, 1980) solidificado con agar, suplementado con TDZ 0,1 μM y 2,4-D 5,0 μM incubando a la luz durante cuatro semanas.

Del mismo modo Roschke & Pijut (2006); citados por Payghamzadeh & Sayyed (2011) informaron que de los seis genotipos de *J. nigra* que se cultivaron a partir de hojas en varias combinaciones de (TDZ) y 6-bencilaminopurina (BAP), tres genotipos (D, E, F) mostraron regeneración adventicia de brotes en 6,8 μM de TDZ más 1,0 μM de IBA, en el genotipo D se regeneraron brotes en un 60% de los explantes; siendo la tasa más elevada de todos los genotipos. El genotipo F mostró 10% de regeneración de brotes en el mismo medio, así como en 6,8 μM de TDZ sin adición de IBA. En el mismo



año Sánchez et al., (2006) reportaron que el mejor porcentaje de germinación de embriones cigóticos de *Juglans regia* fue el obtenido en WPM (81%), mientras que la calidad del clúster de proliferación y otros parámetros estudiados indicaron que el tratamiento óptimo fue de 0,5 mg/l de BAP.

Bosela y Michler (2008) reportan el trabajo con *J. Nigra*, utilizando esquejes nodales de seis líneas en las que se compararon 4 medios de cultivo MS, DKW, WPM, y DKW^{1/2}, y la concentración de tres citoquininas: ZEA; BAP; y TDZ, se observó que en los medios WPM y DKW^{1/2}, existía una hiperhidricidad del 60-100% en comparación con el 10-40% en los medios de alto contenido de sal DKW y MS. Las citoquininas BAP, ZEA y TDZ, todas provocaron regeneración de brotes pero el alargamiento recurrente se observó en BAP y ZEA, en las líneas de mayor elongación.

Además se utilizaron puntas apicales para la proliferación, donde ZEA fue menos eficaz con una frecuencia de proliferación del 30-40%, al contrario, en TDZ esta proliferación se duplicó, pero la mayoría de los brotes que generaron se mostraron hinchados o aplanado en su morfología. Las altas tasas de la proliferación (61-88%) fueron también posibles utilizando BAP (12,5 y 25 μ M), pero los brotes axilares no se alargaron obteniéndose alturas de solo 5-10 mm, después de 4-5 semanas.

Más tarde, Amiri & Gharati (2012) publicaron su experiencia en *Juglans regia* donde analizaron la influencia de la cantidad de macronutrientes en el medio DKW como base, en el que pudieron observar que el medio con niveles más altos de macronutrientes suplementado con 4,0 μ M de 6-bencilaminopurina (BAP) y 12 μ M de ácido indol-3-butírico (IBA), mejoró la proliferación, pero al contrario, la disminución de la disponibilidad de minerales, mostró un crecimiento deprimido en los tratamientos con bajos suministros de macrominerales, sin embargo, el tratamiento con baja



concentración de minerales mostró un alto porcentaje de enraizamiento (75%) y la alta concentración un bajo enraizamiento (13%).

En el mismo año Quintero & Jaramillo (2012) reportaron el establecimiento de cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de *Juglans neotropica* que iniciaron la germinación a los 5 y 7 días de siembra con un 100% de germinación a los 15 días de cultivo obteniendo una mayor longitud de tallo en medio MS.

En otro estudio se demostró que tratando microplántulas de *J. neotropica* con dos citoquininas en dos concentraciones BAP (2,3-3,2 μM) y TDZ (0,24-3,2 μM), se obtuvo un índice promedio de multiplicación entre 2,05 y 2,8 brotes en BAP, sin reportar diferencias entre los niveles de concentración de cito-quinina. (Peña *et. al.*, 2014).

Licea *et al.*, (2015) demuestran que el uso secuenciado de Phloroglucinol en el medio de cultivo en concentraciones ente 0,2 μM y 0,8 μM combinada con el FeEDDHA (quelato de hierro) aporta en la multiplicación de brotes y mejoró su longitud, número de nodos y peso del callo, en las primeras etapas de establecimiento y proliferación. Semanas antes de la inducción de la raíz se prescindió de este compuesto logrando un alto porcentaje de enraizamiento y supervivencia de las plantas durante la aclimatación.

Diversos resultados se muestran en la propagación del género *Juglans*, surgiendo la necesidad de ajustar las condiciones de cultivo *in vitro* para *J. neotropica*; especie de interés para la sierra ecuatoriana; bajo este contexto, los resultados obtenidos en el estudio de Peña *et al.*, (2014) se usaron para ajustar el proceso de propagación *in vitro* en BIT, planteándonos como objetivo de este trabajo: evaluar la eficiencia de la



multiplicación *in vitro* de *Juglans neotropica* (nogal) en Biorreactores de Inmersión Temporal.

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación.

3.1.1 Características del sitio experimental.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la granja El Romeral de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca ubicada en Guachapala, provincia del Azuay, todos los ensayos fueron desarrollados a una temperatura ambiental de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, con 60% de humedad relativa, a iluminación artificial fluorescente con una fluencia de $42\text{-}48\text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Material vegetal

Para la obtención de los embriones se recolectaron semillas de *J. neotropica*, en la Parroquia Tomebamba del cantón Paute, Provincia del Azuay, la colecta de la nuez se realizó cuando esta alcanzó su madurez, es decir cuando los frutos se desprenden de los nogales, luego de recogerlas se limpiaron y clasificaron por su tamaño descartando material deteriorado. Para el secado, la semilla se ubicó bajo sombra en bandejas forradas con papel periódico durante 15 días, todo esto para evitar el ataque de hongos. (Figura 1)



Figura 1. Preparación de material para establecimiento *in vitro* de *J. Neotrópica*.

3.3 Metodología.

3.3.1 Etapa de Establecimiento.

El protocolo de desinfección y establecimiento utilizado fue el descrito por Peña et al. (2014). De cada semilla se extrajo la sección de la nuez que contiene al embrión, éstos segmentos de nuez se colocaron bajo chorro de agua corriente por dos minutos, y a continuación fueron lavados en tres ocasiones con jabón líquido antibacterial. Posteriormente, dentro de la cámara de flujo laminar, se sumergieron los segmentos en alcohol al 70% por tres segundos, seguidamente se desinfectaron con cloro al 2% por un minuto y se enjuagaron con agua destilada estéril e inmediatamente se extrajo el embrión. Para el proceso de extracción, en caja petri y con la ayuda de un bisturí se hizo un corte longitudinal en el extremo del segmento de nuez desinfectada, separándola en dos partes y exponiendo así el embrión para su extracción evitando causar daños, (Figura 2c) los embriones extraídos se sometieron a una nueva desinfección con hipoclorito de sodio 0,07% (Peña et al, 2014) y fueron sembrados sin enjuague en un tubo de ensayo que contenían 5ml de medio de cultivo Murashige & Skoog (Tabla 1), sin adición de reguladores de crecimiento.

El medio se preparó en un matraz añadiendo las soluciones madres de macronutrientes, micronutrientes y hierro, seguido de las fuentes de vitaminas tiamina,

ácido nicotínico, piridoxina ; aminoácidos myo-inositol y glicina, el agente gelificante agar-agar 0,7% y la sucrosa en una concentración de 30%, se calentó la mezcla agitándola con una barra magnética, luego se ajustó el pH a 5,7 utilizando HCL o NaOH, por último, se distribuyó el medio en tubos de ensayo a razón de 5ml cada uno, éstos se esterilizaron por 20 minutos a una temperatura de 120°C y 1,05 kg/cm² de presión.



Figura 2. Establecimiento de embriones de *J. neotropica* en medio de cultivo MS, semisólido

Tabla 1. Composición de sales en (mg/l) de cada medio de cultivo.

REACTIVO	MS	DKW	DKW BIT
Nitrato de amonio	1650	1416	1416
Nitrato de potasio	1900	-	-
Nitrato de calcio	-	1968	1968
Cloruro de calcio	440	149	149
Sulfato de potasio	-	1559	1559
Sulfato de Magnesio	370	740	740
Fosfato de potasio	170	265	265
Sulfato de Manganeso monohidratado	22,3	33,5	33,5
Molibdato sódico dihidratado	0,25	0,39	0,39
Sulfato de Zinc heptahidratado	8,6	-	-
Nitrato de Zinc	-	17	17
Yoduro de potasio	0,83	-	-
Ácido Bórico	6,2	4,8	4,8
Sulfato de cobre pentahidratado	0,025	0,25	0,25
Cloruro de cobalto	0,025	-	-
Sulfato de Níquel	-	0,005	0,005
Sulfato ferroso	27,8	27,8	27,8
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3
Myo-inositol	100	100	100
Tiamina	0,1	2	2
Ácido Nicotínico	0,5	1	1
Piridoxina	0,5	-	-
Glycina	2	2	2
Sucrosa	30g	30g	30g
Agar	7g	7g	-
Reguladores de crecimiento			
BAP	-	0,05	0,05
IBA	-	0,7	0,7

3.3.2 Inducción a la multiplicación en sistema semisólido (convencional)

Las plántulas obtenidas a partir de embriones cigóticos y que alcanzaron una longitud entre 2,5 y 3cm con 2 o 3 hojas se subcultivaron en medio DKW semisólido descrito en la Tabla. N° 1 suplementado con BAP 0,7mg/l y 0,05 mg/l de IBA, (Peña et al, 2014) se sometieron a tres subcultivos cada 21 días para luego utilizarlas en el establecimiento de los ensayos de multiplicación en medio semisólido y biorreactores de Inmersión temporal (BIT) (etapa II) como se describe en la Figura 3.



Figura 3. Siembra de plántulas de *J. Neotropica* a multiplicación bajo el sistema convencional

Las plántulas obtenidas de tres subcultivos (medio semisólido DKW) Figura 4 (etapa I), que alcanzaron un tamaño entre 2,5 y 3cm de altura fueron evaluadas a través de un test de sanidad vegetal para asegurar este parámetro previo al establecimiento del ensayo en BITs.



Figura 4. Plántulas de *Juglans neotropica* después de 1,2 y 3 subcultivos cada 21 días en medio semisólido.



El medio de cultivo utilizado para el test de sanidad fue el caldo nutriente para uso bacteriológico, su fórmula contiene peptona bacteriológica, extracto nutritivo, extracto de levadura y cloruro de sodio.

Para su preparación, en un matraz se colocaron los 13 gr del caldo nutritivo y 7 gr de agar, luego se añadió la cantidad de agua destilada requerida procediendo a agitar y calentar; a continuación se esterilizó en autoclave a 120°C y 1,05 kg/cm² de presión durante 20 minutos. Una vez estéril en cámara de flujo se procedió a dispensar el medio en placas de petri estériles, se dejaron reposar hasta que solidifique.

El test de sanidad consiste en verificar si luego de la siembra de cualquier parte de la plántula, surgen agentes contaminantes bacterianos o fúngicos; todo esto para evitar la pérdida de material vegetal durante el experimento.

Las placas petri en las que se realizó el test de sanidad (Figura 6a) , fueron sometidas a una temperatura de 24°C±2; en obscuridad, la evaluación de la presencia de agentes contaminantes se la realizó a los 5 días, la morfología de las colonias bacterianas observadas fue mucosa blanquesina y amarillenta de forma irregular, mientras que en el caso de los agentes fúngicos se observaron colonias, aterciopeladas, lanosas o algodonosas, al inicio mostraron un aspecto blanco pero luego adquirieron un tono verde azulado, grisáceo.

El material que no presentó contaminación fue utilizada para los experimentos, mientras que los contaminados fueron descartados.

3.3.3 Cultivo en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)

El Sistema de Inmersión Temporal empleado fue el desarrollado por Escalona et al., (1999) (Figura 5), BIT® sistema de frasco gemelo; utilizando frascos de vidrio

transparentes de dos litros de capacidad, los mismo se interconectan por parejas mediante mangueras de silicona, cada uno de los frascos se encuentran conectados a un filtro (Pall Corporation) hidrofóbico con un diámetro de poro de 0.2 μm que asegure la esterilización del aire entrante y saliente.

En uno de los frascos gemelos se colocó el medio de cultivo líquido y en el otro las plántulas, cada frasco está conectado a una válvula solenoide que se encuentra conectada a otra válvula reguladora de aire, al mismo tiempo estas se unen a un sistema de entrada de aire procedente de un compresor, el flujo de aire fue accionado por un programador automático, mismo que controla la frecuencia, duración de las inmersiones y flujo de gases.

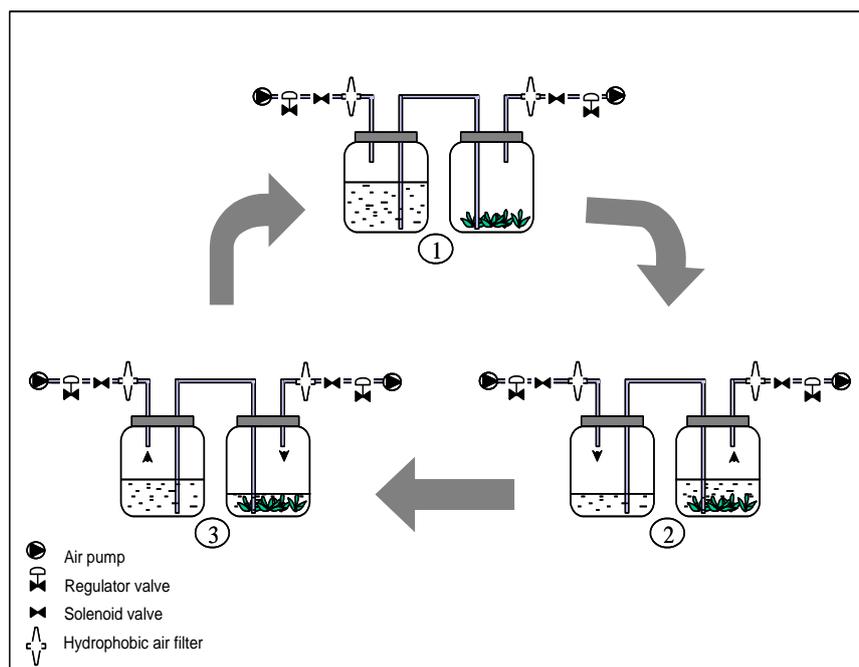


Figura 5. Esquema de funcionamiento del BIT desarrollado por Escalona et. al., (1999)

La formulación del medio de cultivo utilizado en los biorreactores fueron los descritos en la etapa de inducción a la multiplicación prescindiendo del agar. (Tabla 1). Tanto el

medio de cultivo como la cristalería y herramientas fueron previamente esterilizados en una autoclave a 121 °C y 1,05 kg/cm² de presión por 20 minutos (Figura 6b).

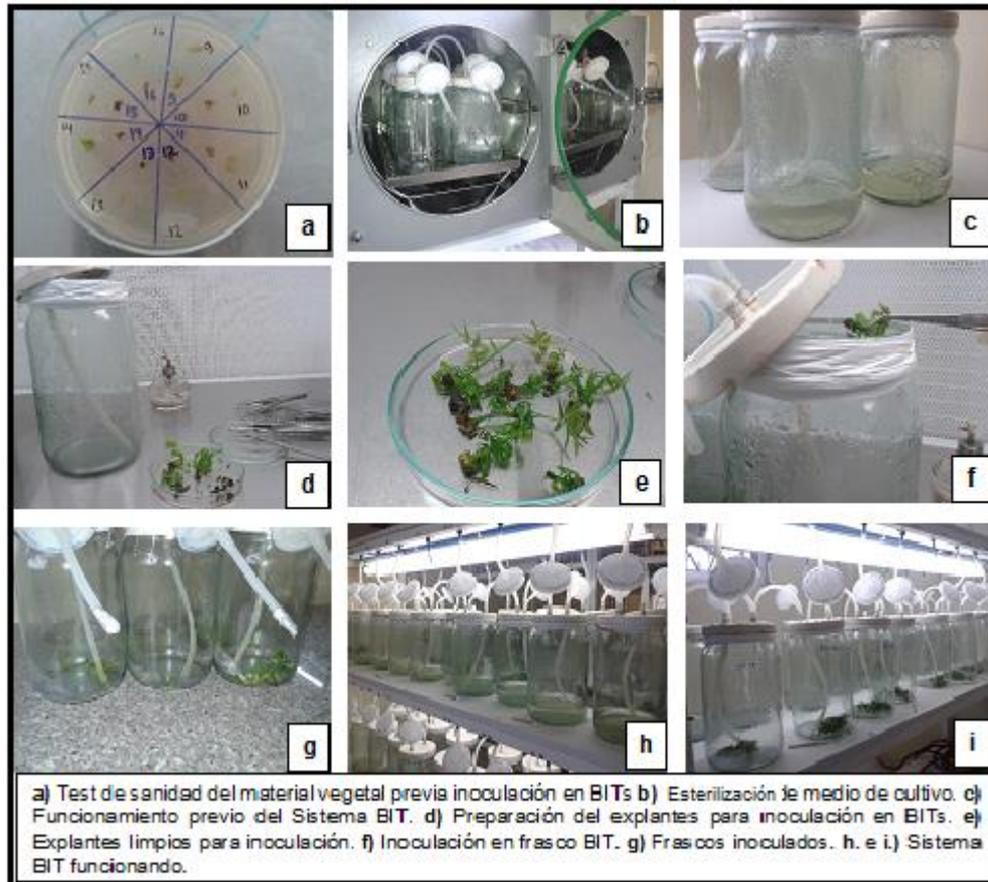


Figura 6. Preparación de material y siembra de explantes en BIT.

3.3.3.1 Factores de evaluación:

Sistemas de cultivo Semisólido y BIT

- Sistema de cultivo semisólido.
- Sistema de cultivo BIT

En Sistemas de Inmersión Temporal

- Frecuencia de Inmersión (6, 8 y 12 horas)
- Aplicación y no aplicación de ventilación forzada.



3.3.3.2 Tratamientos.

Producto de las combinaciones de las variables en estudio se formaron los siguientes tratamientos (Tabla 2 y 3)

Tabla 2. Tratamientos utilizados para comparación de la eficiencia del Sistema de cultivo empleado Semisólido y BIT

SISTEMA DE CULTIVO	TRAT	CÓDIGO	TRATAMIENTO
SEMISOLIDO	T1	SS	Método convencional semisólido
BIT	T2	BF6	Método en BIT frecuencia c/6horas

Tabla 3. Tratamientos utilizados para determinar la eficiencia en la multiplicación de *J. neotropica* en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT).

FRECUENCIA	TRAT	CÓDIGO	TRATAMIENTO
cada 6 horas	T1	F6SV	Sin ventilación, frecuencia de inmersión cada 6 horas
	T2	F6CV	Con ventilación, frecuencia de inmersión cada 6 horas
cada 8 horas	T3	F8SV	Sin ventilación, frecuencia de inmersión cada 8 horas
	T4	F8CV	Con ventilación, frecuencia de inmersión cada 8 horas
cada 12 horas	T5	F12CV	Sin ventilación, frecuencia de inmersión cada 12 horas
	T6	F12CV	Con ventilación, frecuencia de inmersión cada 12 horas

3.3.3.3 Unidad Experimental.

Para el primer experimento, BIT vs. Semisólido se utilizaron frascos de vidrio con una capacidad de dos litros para los dos sistemas; para el sistema de cultivo en BIT dos frascos se mantuvieron interconectados por mangueras de silicona; un frasco contenía 300ml de medio de cultivo líquido DKW (Tabla 1) y el otro los explantes (Figura 6g), cada par de frascos se conectaron a un sistema que provee flujo de aire cada 6 horas, por dos minutos.



Para el sistema semisólido se utilizó el medio antes descrito para BIT suplementado con agar 7g/l, cada frasco contenía la misma cantidad de medio de cultivo (300ml) que en los BIT, y en ambos sistemas se sembraron 10 plantas por frasco, con una repetición.

El ensayo en medio semisólido se estableció con los mismos frascos empleados en los BIT, se sembraron plántulas con las mismas características descritas para los BITS y se proporcionaron las mismas condiciones de cultivo, siendo, la única diferencia el agar en el medio de cultivo.

Para el experimento en BIT la unidad experimental se conformó de dos frascos de vidrio con una capacidad de 2 litros cada uno, estos se mantuvieron interconectados por mangueras de silicona; un frasco contenía 300ml de medio de cultivo líquido. Moreno et al., (2016) sugiere el uso de 10ml por explante en semisólido, Castro & Gonzáles, (2002) demostraron en eucalipto que con un volumen de 500 mL de medio de cultivo, con 9 explantes se logró un mayor coeficiente de multiplicación, por lo tanto se realizó una valoración estableciendo un volumen de 30ml por planta.

En el segundo frasco que conforma el sistema BIT se sembraron diez plántulas, obtenidas de los subcultivos previos con 2 o 3 hojas y una altura de 2,5 a 3cm; la densidad de los explantes fue determinada por la cantidad de material vegetal disponibles para el experimento. Para el funcionamiento de los BIT, con antelación se realizó la programación del tiempo y frecuencia de inmersión, así como la aplicación o no de la ventilación, esta variable se logró gracias al programa incorporado en el BIT. Como parámetro fijo se determinó un tiempo de inmersión de 2 minutos y un tiempo de ventilación de 1 minuto cada 4 horas tratamiento utilizados por Oliveira, et al. (2014) en la micropropagación de Eucalipto.



3.3.3.4 Análisis Estadístico

Para el análisis de los factores y determinar las diferencias entre medias obtenidas por tratamiento se efectuó un análisis usando el paquete estadístico, SPSS, versión 22. En el primer experimento evaluación del sistema de cultivo (Semisólido vs BIT) se empleó un diseño completo al azar de un factor, con 2 repeticiones, donde se evaluaron las variables número, tamaño, peso de masa fresca, peso de masa seca y número de hojas por brote individualizado, en la evaluación del sistema de cultivo se conformaron dos tratamientos y una repetición.

Para el segundo experimento, evaluación de las condiciones específicas de cultivo en BIT se empleó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de 3x2 con una repetición cada una, donde se evaluaron los factores correspondientes a la frecuencia de inmersión (6, 8, y 12 h) y la aplicación o no de ventilación; el ensayo experimental estuvo conformado por un total de 6 tratamientos.

3.3.4 Características del área experimental

Sistemas de cultivo BIT vs. Semisólido

N° de tratamientos: 2

N° de unidades experimentales 40

Condiciones específicas de cultivo en BIT

N° de tratamientos: 6

N° de unidades experimentales 120

3.4 Variables y métodos de evaluación.

Para los dos experimentos se utilizaron los mismos parámetros de evaluación



3.4.1 Número de Brotes.

A los 45 días de cultivo se contaron el número de brotes obtenidos por plántula individualizando cada uno.

3.4.2 Tamaño de Brotes.

Se determinó la longitud en cm, de cada uno de los brotes cosechados en todos los tratamientos, a los 45 días de cultivo.

3.4.3 Número de Hojas.

De igual manera, a los 45 días de cultivo, se contabilizaron cada una de las hojas que presentaban los brotes.

3.4.4 Masa fresca.

Luego de obtenida la longitud y demás variables se procedió a pesar los brotes en miligramos usando una balanza analítica.

3.4.5 Masa seca

Luego de medidos y pesados los brotes, se sometieron a desecación en una estufa a 70°C por 48 horas, tras lo cual se procedió a pesarlos en miligramos con el uso de una balanza analítica hasta obtener un peso constante.

3.4.6 Brotes hiperhídricos.

Mediante un análisis de las características morfológicas de los brotes, éstos se clasificaron en hiperhidratados o normales, contabilizándolos por cada uno de los tratamientos. La hiperhidricidad se evaluó en base a la textura del brote, se consideraron hiperhídricos los que presentaron coloración negruzca y brotes deformados con aspecto cristalizado.



3.5 Análisis de los costos de la producción de *J. neotropica* en el sistema semisólido y en BITS.

Se establecieron los costos en los dos sistemas de cultivo utilizados en el proceso de multiplicación, así como el tiempo que requieren las diferentes actividades tanto en el método convencional como en los BITS. Los datos se analizaron de una forma general ya que el análisis especializado no es el objetivo principal de este estudio, sino evidenciar de una forma general las ventajas o desventajas que presentan los sistemas utilizados.



CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Resultados del establecimiento de embriones maduros de *J. neotropica* (etapa I)

Los análisis estadísticos de los experimentos se realizaron utilizando el programa SPSS versión. 22.0. Se aplicó el análisis no paramétrico en todos los datos ya que no cumplieron los supuestos de normalidad pero si homogeneidad de varianzas. Se realizó el test de U Mann Whitney para establecer las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Para la etapa de establecimiento de embriones cigóticos de *J. neotrópica* se evaluó la contaminación y germinación de los embriones. En la Tabla 4 se observan los resultados obtenidos tras 30 días de siembra.

Del total de embriones cigóticos sembrados, el 86,6% germinaron a los 30 días, el 7,3% se perdieron debido a la contaminación tanto fúngica como bacteriana y un 6,01% de embriones no lograron germinar.

Tabla 4. Resultados del establecimiento de embriones cigóticos de *J. neotropica* en medio semisólido

Embriones cigóticos	%
Embriones germinados	86,69
Contaminados	7,3
No germinados	6,01
TOTAL	100

4.2 Efecto del Sistema de Cultivo Semisólido y BIT sobre el número de brotes.

Para evaluar las diferencias en la cantidad de brotes obtenidos en cada sistema de cultivo se utilizó la prueba U de Mann Whitney, debido al comportamiento asimétrico de los datos, en la Figura 7, se puede observar la diferencia significativa favorables al sistema BIT en cuanto al número de brotes generados, el promedio para semisólido

fue de 1,9 nuevos brotes por explante mientras que para BIT se registró una media de 3,025 brotes. Los resultados obtenidos revelan que el mejor sistema de cultivo para la obtención de un mayor número de nuevos brotes es el sistema BIT, sin embargo, los valores registrados para las variables tamaño de brote, número de hojas, masa fresca y seca, no resultan significativamente diferentes entre los dos sistemas de cultivo.

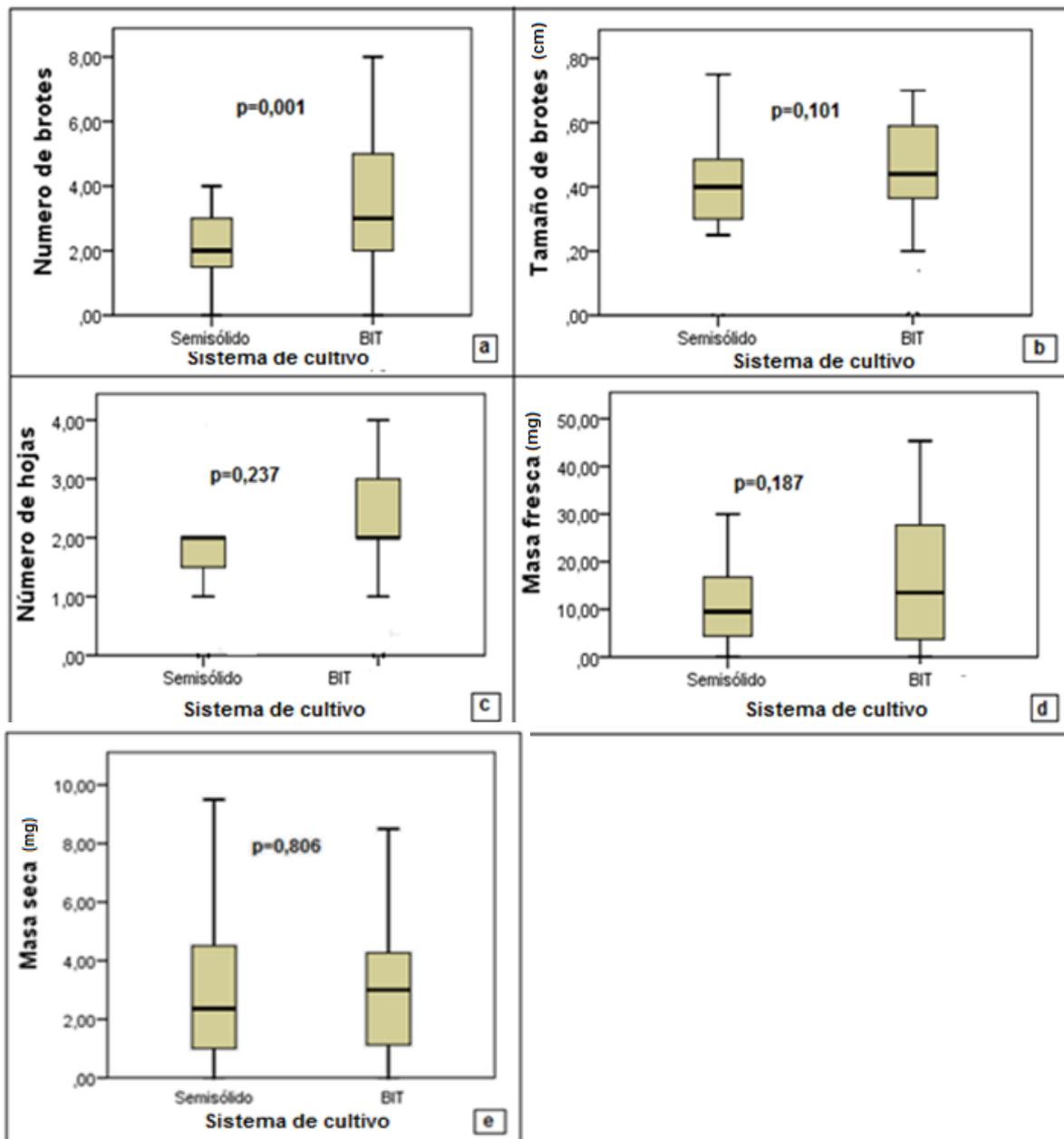


Figura 7: Efecto del Sistema de Cultivo sobre el número de brotes (a); tamaño de brote (b); número de hojas (c); masa fresca y seca (d y e).

4.3 Multiplicación de *Juglans neotropica* en Biorreactores de Inmersión Temporal.

4.2.1 Efecto de las frecuencias de inmersión sobre el número de brotes

Para evaluar el efecto en la cantidad de brotes obtenidos, con relación a los niveles de frecuencias de inmersión se utilizó un modelo de regresión lineal, se ensayaron tres frecuencias de inmersión cada 6, 8 y 12 horas por día. Para los coeficientes del modelo de regresión las puntuaciones obtenidas de $t= 4,443$ y $p=0,001$ los valores indican que los valores de las constantes son distintas de 0. La cantidad total de brotes obtenidos para las frecuencias de inmersión no es significativamente distinta entre cada una de las frecuencias (U de Mann Whitney $p = 0,519$; $p=0,662$; $p=0,717$ en frecuencias 6-8, 6-12 y 8-12 respectivamente), pudiéndose observar en la Figura 8.

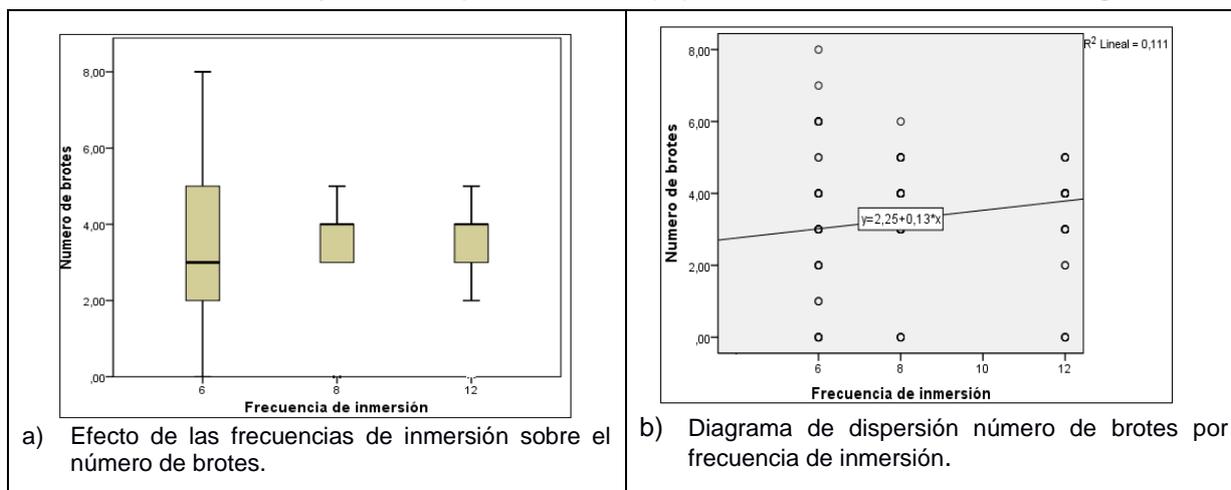


Figura 8. Efecto en el número de brotes por frecuencia de inmersión.

4.2.2 Efecto de las frecuencias de inmersión sobre las variables indicadoras de calidad (tamaño, número de hojas, masa fresca y seca).

Para el análisis del efecto de los diferentes niveles de frecuencias de inmersión (cada 6, 8 y 12 horas) sobre las variable indicadoras de calidad, se utilizó el test de U de Mann Whitney, dos a dos; la frecuencia establecida cada 6 horas, comparada con la de 8 no presenta diferencias significativas en ninguna de las variables, mientras que,

al comparar la frecuencia de 6 horas con la de 12 se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para todas las variables, pudiéndose observar en la Figura 9, que las medianas, de cada variable en el nivel 12 se encuentran más altas que las del nivel 6; además, comparados los niveles 8 y 12, la diferencia es significativa para las variables tamaño del brote, masa seca y fresca, no obstante no existe diferencia alguna para el número de hojas.

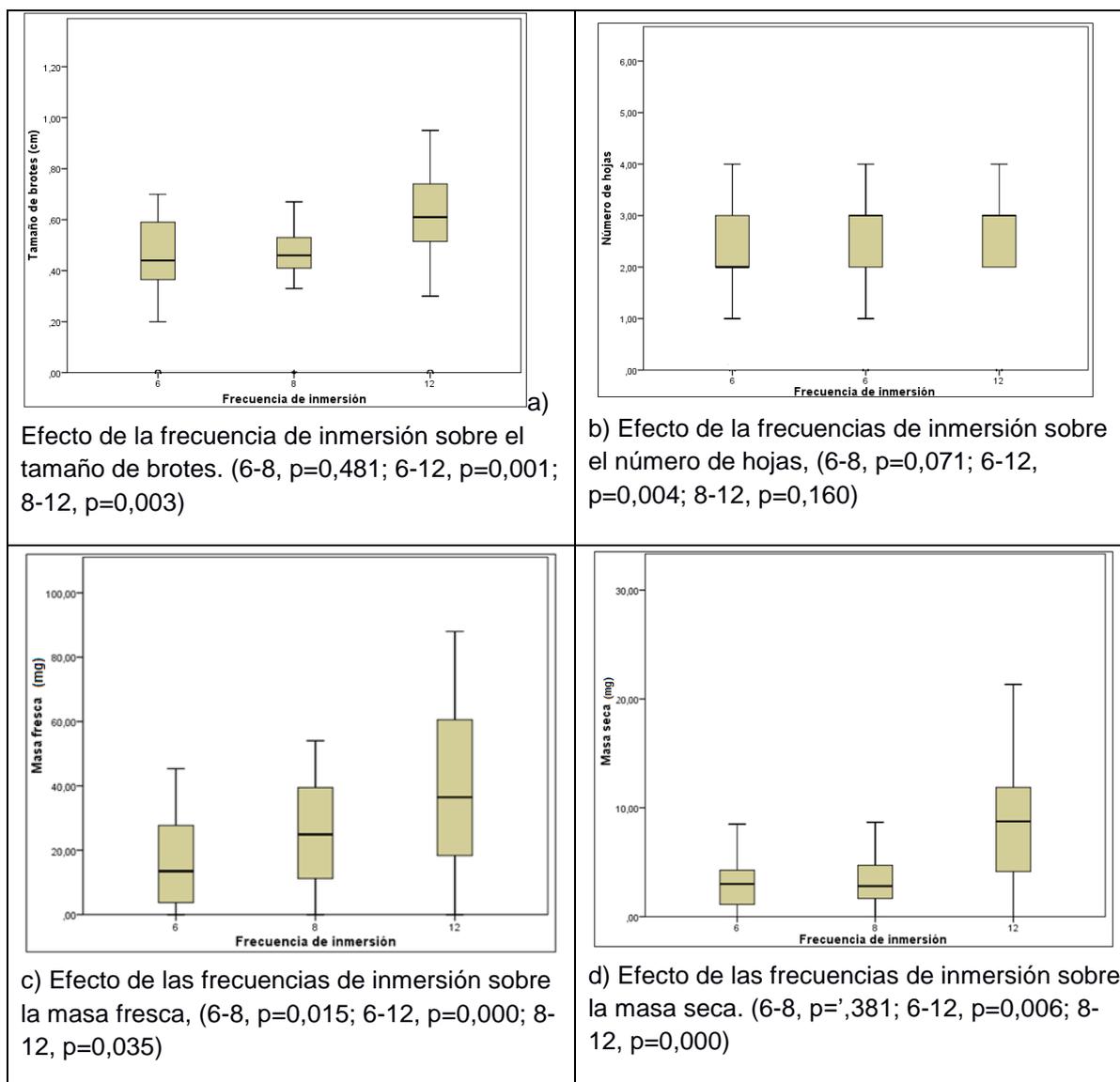


Figura 9. Efecto de las frecuencias de inmersión sobre las variables indicadoras de calidad a) tamaño del brote, b) número de hojas, c) masa fresca, d) masa seca

4.2.3 Efecto de la ventilación sobre número de brotes obtenidos

Los contenedores de cultivo con los explantes fueron sometidos a aireaciones periódicas (6 veces diarias durante un minuto). La evaluación de las diferencias en el número de brotes bajo la influencia de la ventilación se realizó mediante el test U de Mann-Whitney para los grupos, el indicador $p=0,377$ muestra que no existe diferencia entre la aplicación o no de la ventilación sobre el número de brotes obtenidos. Como se observa en la Figura. 10 (a), sin la aplicación de la ventilación en el nivel 6 la mayor parte de la población se encuentra sobre la mediana, no obstante, si se le aplica ventilación la mediana baja; para el nivel 8 tanto la aplicación o no de ventilación no influye en la generación de brotes, sin embargo, en la población del nivel 12 el 75% se encuentra debajo de la mediana, para los dos tratamientos.

Comparados los distintos niveles de frecuencias de inmersión en conjunto con la ventilación, sin la aplicación de ventilación el valor $p=0,043$ (Figura 10 (b)) demuestra la existencia de una diferencia significativa en el número de brotes generados, que los obtenidos cuando se aplicaron ventilación.

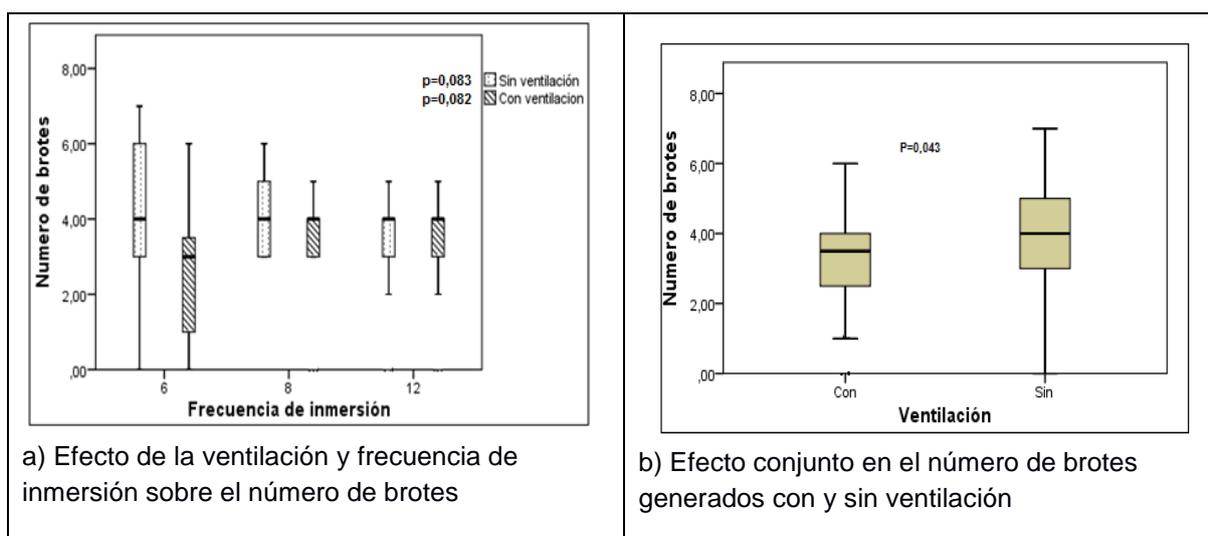


Figura 10. Efecto de la ventilación en el número de brotes obtenidos por explante con y sin ventilación



4.2.4 Efecto combinado de la ventilación y frecuencia de inmersión sobre las variables indicadoras de calidad.

Para el análisis de los efectos de la ventilación y frecuencias de inmersión sobre las variables indicadoras de calidad, el valor $p= 0,025$ de la interacción ventilación por frecuencia de inmersión demuestra que existe interacción entre los dos factores.

4.2.4.1 Efecto de la ventilación y frecuencias de inmersión sobre el número de brotes

Basados en el modelo de regresión lineal aplicado, se demuestra que existe una correlación negativa para el factor sin ventilación mientras que una positiva en la aplicación de la ventilación, sin embargo el R^2 se encuentra entre los valores 0,33 y 0,180, indicando un coeficiente de determinación bajo, basado en el análisis se determina que, cuando se aplica la ventilación el número de brotes aumenta con menor frecuencia de inmersión (12h) y se observa un efecto contrario sin ventilación, sin existir una diferencia significativa ($p= 0,083$ y $0,082$) entre la aplicación o no de la ventilación sobre el número de brotes obtenidos en ninguna de las frecuencias estudiadas. Figura 11 (a).

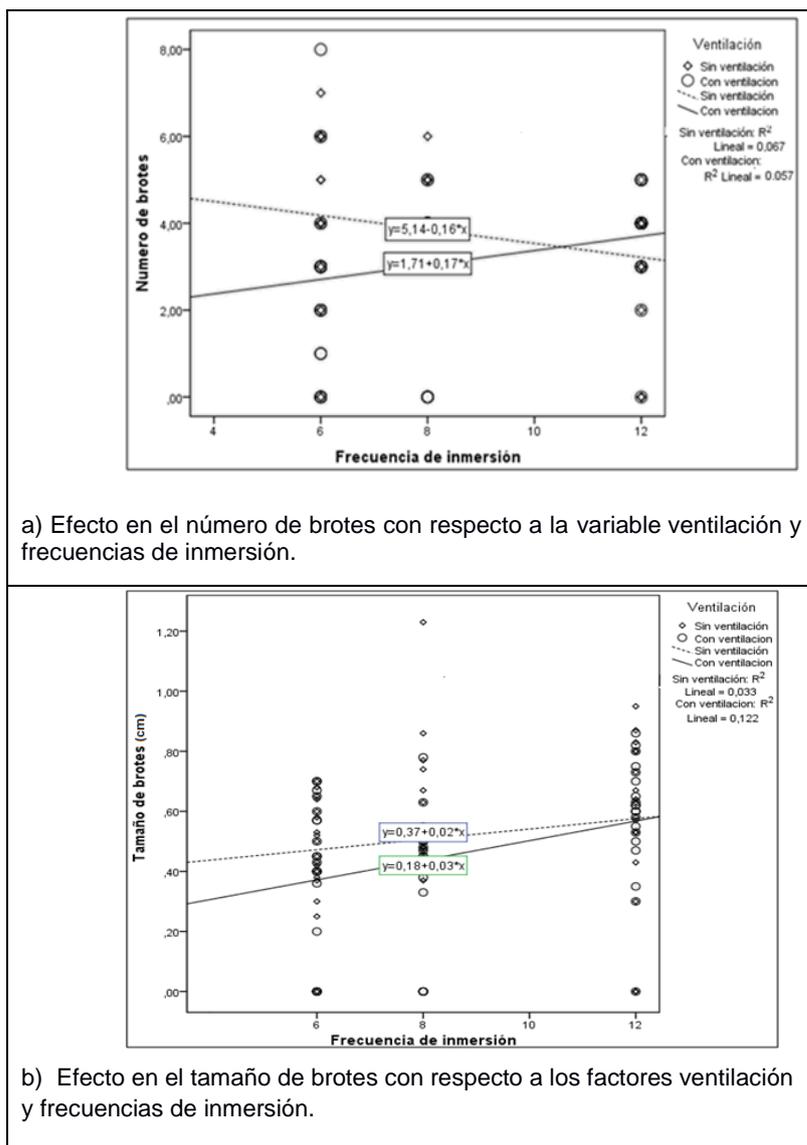


Figura 11. Efecto de la ventilación en número y tamaño del brote con y sin ventilación.

4.2.4.2 Efecto de la ventilación y frecuencias de inmersión sobre el tamaño del brote

A menor frecuencia de inmersión (12), con aplicación de ventilación, el tamaño del brote se incrementa, es importante exponer que sin ventilación los mayores tamaños se ubican en frecuencias mayores (6), sin existir diferencias estadísticamente significativas entre las variables evaluadas valor de $p= 0,294$ sin ventilación y $p= 0,579$ con ventilación. Figura 11(b)

4.2.4.3 Efecto de la ventilación y frecuencias de inmersión sobre el número de hojas de hojas

Al aplicarse o no la ventilación el número de hojas no varía significativamente ($p=0,091$ y $p=0,414$) en ninguna de las frecuencias evaluadas, sin embargo cuando se aplica ventilación y la frecuencia se reduce, se observa una tendencia al incremento en el número de hojas (Figura 12).

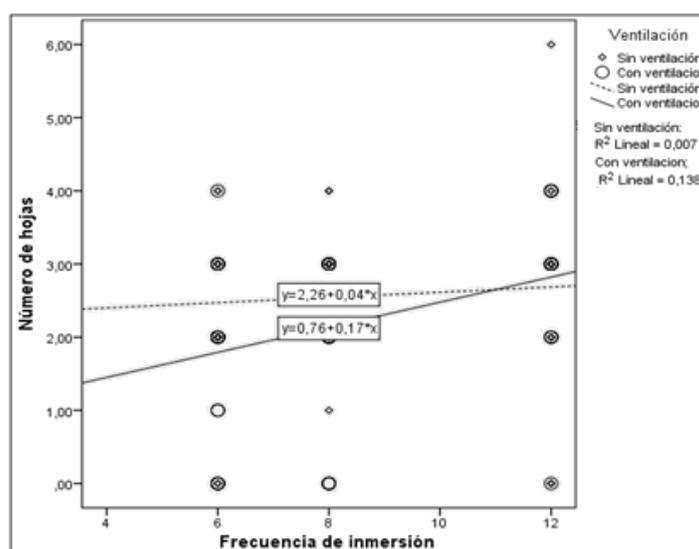
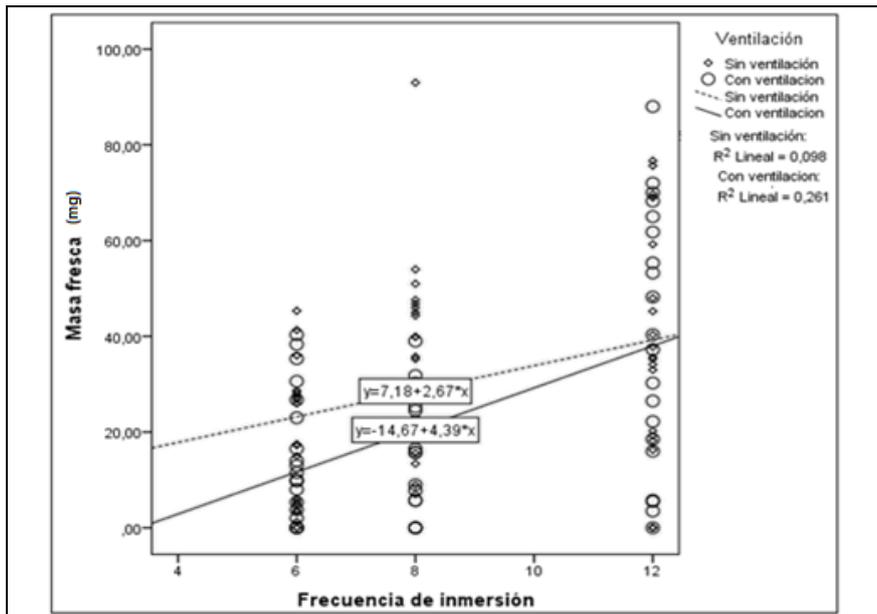


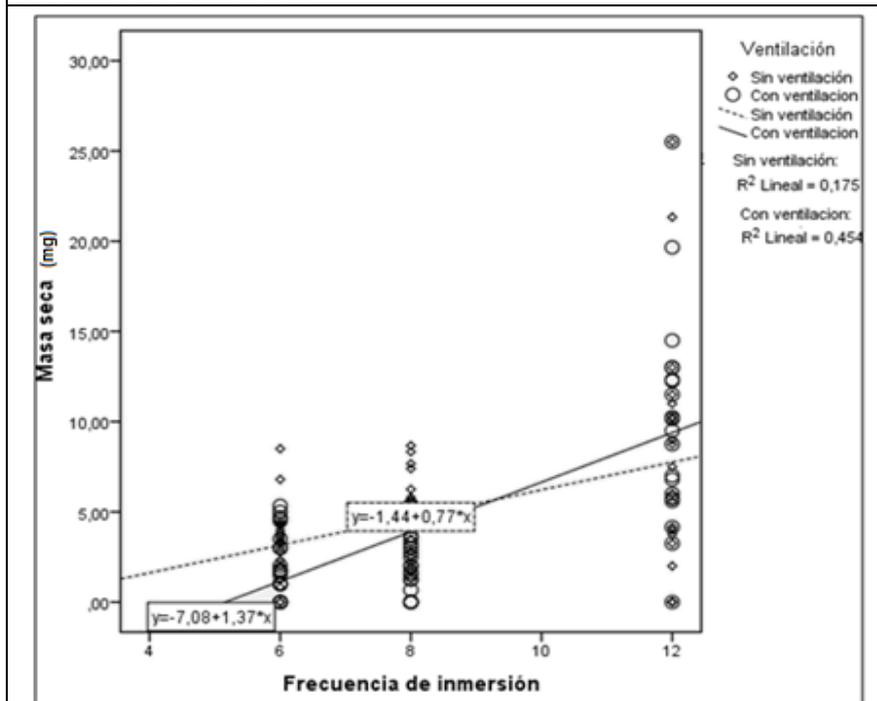
Figura 12. Efecto de la ventilación en el número de hojas bajo la influencia de la ventilación y frecuencia de inmersión.

4.2.4.4 Efecto de la ventilación y frecuencia de inmersión sobre la masa fresca y seca

Realizados los análisis correspondientes en la variable masa fresca al aplicar ventilación se muestran la existencia de diferencias significativas ($p= 0,000$) que cuando no se aplica ventilación, ($p=0,201$) Figura 13 (a); lo contrario sucede en la masa seca al aplicar o no ventilación a mayores frecuencias de inmersión el peso de la masa seca aumenta, ($p=0,000$) Figura 13 (b).



a) Efecto en la masa fresca con respecto los factores ventilación y frecuencia de inmersión.



a) Efecto en la masa seca de brotes con respecto a los factores ventilación y frecuencia de inmersión.

Figura 13. Efecto de la ventilación en la masa seca y fresca de los brotes bajo la influencia de la ventilación y frecuencia de inmersión.



4.2.5 Efecto de la frecuencia de inmersión y ventilación sobre la cantidad de brotes hiperhídricos.

Para evaluar la cantidad de brotes hiperhídricos obtenidos por frecuencia de inmersión, se realizó una evaluación basada en el porcentaje de brotes encontrados por cada tratamiento, como se puede observar en la Tabla 5. La frecuencia de inmersión de 6 horas, tiene el porcentaje más alto de brotes hiperhidratados seguido de la frecuencia de 8 horas, al mismo tiempo para la frecuencia de 12 horas la hiperhidricidad se reduce, se hayan o no aplicado ventilación, el análisis también muestra que la falta de ventilación ha producido mayor porcentaje de brotes hiperhídricos que la aplicación de esta.

Tabla 5. Porcentajes de brotes hiperhídricos por frecuencias de inmersión con y sin ventilación.

Frecuencias (h)	% de Brotes hiperhídricos por frecuencia	Sin ventilación	Con ventilación
6	6,76	4,59	2,17
8	4,11	3,14	0,97
12	2,41	1,93	0,48
TOTAL	13,28	9,66	3,62

En la figura 14 se puede apreciar las características que presentaron los brotes (a) con frecuencia de inmersión cada 6 horas, brotes pequeños, (b) con una frecuencia de inmersión cada 8 horas, brotes grandes y pequeños, (c y d) con frecuencia de inmersión cada 12 horas, se observan brotes de mayor tamaño que en las frecuencias anteriores; (e y f) muestra las características de los brotes hiperhídricos encontrados en todos los tratamientos.

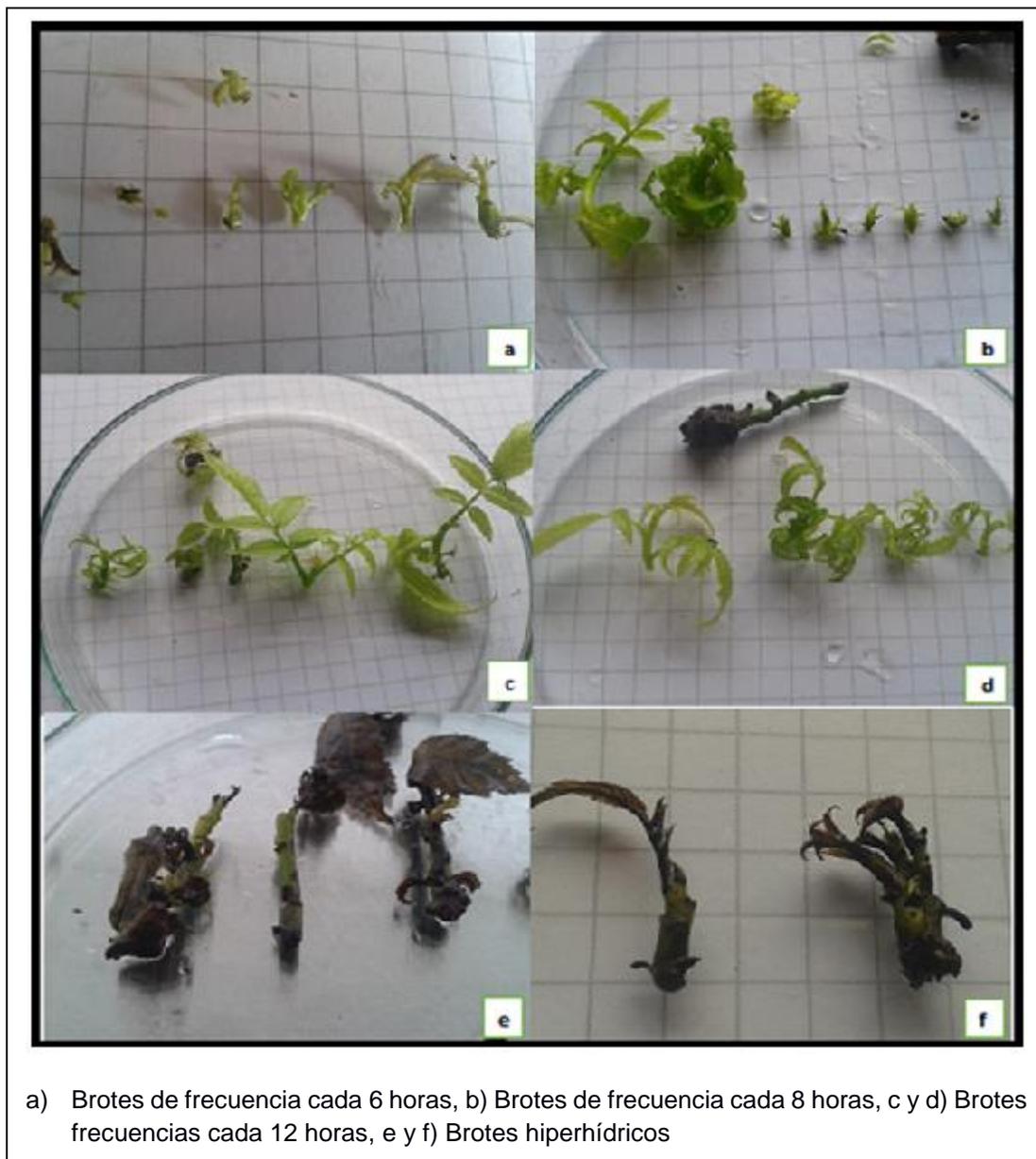


Figura 14. Brotes de *J neotrópica* obtenidos en las diferentes frecuencias de inmersión.

4.3 Análisis de costos de producción de plantas de nogal producidas en el sistema convencional y en BITs.

Se analizaron los costos generados en las etapas de establecimiento y multiplicación de *Juglans neotropica*, considerando el valor de los componentes utilizados en la elaboración de los medios de cultivo, siendo la única variación entre los dos sistemas evaluados la ausencia del agente gelificante (agar) en los BITs.

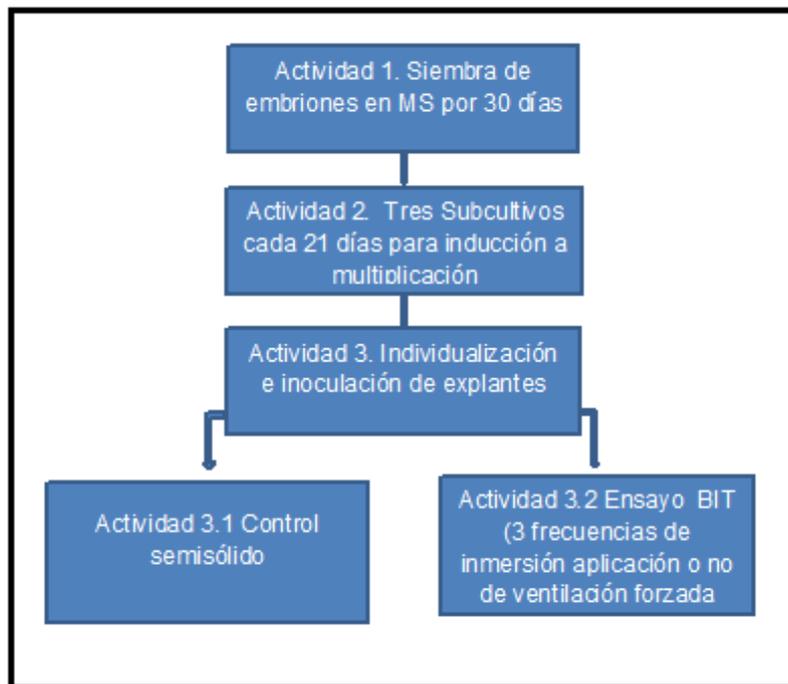


Figura 15. Diagrama de flujo de las actividades desarrolladas en las fases de establecimiento y multiplicación de *J. neotropica*.

4.3.1 Cálculo de los costos directos de la multiplicación de *Juglans neotropica* en los dos sistemas evaluados

Se consideraron tres actividades comunes, descritas en la Figura 15 separándose posteriormente los costos de acuerdo al sistema evaluado, para cada actividad se valoró la mano de obra directa y los insumos requeridos.

4.3.1.1 Costos de producción de 100ml de soluciones madre.

Las cuatro soluciones madre requeridas: macroelementos, microelementos, vitaminas y hierro fueron valoradas en dólares como se detalla en la Tabla 6. El costo de la mano de obra requerida para su elaboración también fue considerado.

**Tabla 6.** Costo de las soluciones madre por 100ml

RUBRO	COSTO TOTAL \$
Macroelementos	7,91
Microelementos	0,12
Vitaminas	1,50
Hierro	0,27
Mano de obra	15,00
Total	24,80
Costo /ml	0,25

Fuente: Precios de catálogo Sigma 2000-2001

Para establecer el valor de la mano de obra se determinó el número de horas requeridas para la elaboración de dichas soluciones, y se las valoró en base al sueldo mensual del técnico

4.3.1.2 Costo de un litro de medio de cultivo semisólido para establecimiento y multiplicación de *Juglans neotropica*.

Para la siembra de embriones maduros de nogal se empleó el medio de cultivo Murashig Skoog (MS) completo, sin adición de reguladores de crecimiento.

Para la etapa de multiplicación la plántulas obtenidas a partir de los embriones cigóticos sembrados en el medio MS fueron transferidas al medio de cultivo Driver y Kuniyuki (DKW) suplementado con 0,7mg/L de BAP y 0,05mg/L de IBA para inducción de la brotación.

Para determinar el costo de un litro de medio de cultivo se calculó el valor del volumen requerido, de cada solución madre y se incluyó además el costo del agar y la sucrosa usados en el caso del medio semisólido y solo de valor de la sucrosa en el caso del medio de cultivo líquido; así se determinó que un litro de medio de cultivo MS, para el establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos tuvo un valor de: \$9,43, valor común para ambos casos (semisólido y BIT) y para la etapa de multiplicación el costo de un



litro de medio DKW fue de \$10,06 en el caso del medio semisólido y de \$6,08 en el caso del cultivo en BIT, sin adición de agar (Tabla 1).

El procedimiento de elaboración fue similar en ambos casos y se encuentra detallado en el punto 3.3.1. El tiempo utilizado para la siembra de embriones fue de 2 minutos por cada uno, incluyendo las actividades de aislamiento del embrión, última etapa de desinfección, siembra y sellado del tubo de ensayo, es decir, para sembrar 150 embriones se requirieron 5 horas de trabajo.

Después de un período de 30 días, los embriones ya germinados, en estado de microplántulas, se transfirieron al medio de multiplicación a razón de 3 por frasco, esta actividad también fue común ya que se la realizó previo al establecimiento de los ensayos con el fin de inducir la multiplicación en todas las plántulas, en esta actividad se emplearon 3 minutos por frasco, usando frascos de 200ml de capacidad que contenían 30ml de medio de cultivo DKW elaborado como se describe en el Tabla 1, el valor de la mano de obra es de \$7,5 por hora, en la etapa de inducción a multiplicación se requirió de un total de \$105,88 incluyendo los valores de mano de obra y medio de cultivo..

4.3.1.3 Establecimiento de los ensayos de multiplicación en los dos sistemas evaluados

Para la transferencia de las plántulas de los tres subcultivos al ensayo en BITs se requirieron 5 minutos por frasco para sembrar 10 plántulas en cada uno, mientras que para para el sistema semisólido se necesitó 7 minutos, se utilizaron frascos de dos litros de capacidad con medio líquido para BIT y un frasco de iguales características para el sistema convencional.

Se realizó el análisis comparativo de los gastos involucrados en el proceso de producción en BIT y semisólido, considerando que se sembraron 150 embriones de nogal, de los cuales se obtuvieron 130 plantas competentes, como se puede observar en la Tabla 7 las plántulas obtenidas se sometieron a un proceso común previo para inducción de la multiplicación, las plántulas conseguidas de esa inducción (338) en tres subcultivos, se usaron para el establecimiento de los ensayos.

Para el análisis de costos 65 plántulas se distribuyeron para el sistema BIT y 65 para el convencional o semisólido, las plántulas ingresadas en esta etapa para efectos de cálculo, se las multiplicó por la media de producción obtenidas como resultado de este trabajo, que fue de 1,9 brotes por explante para el sistema convencional y de 3,025 para el BIT. Finalmente si comparamos el costo de plántula en el sistema convencional con el BIT, se puede determinar claramente la eficiencia de BIT con la reducción de los costos en un 52%.

Tabla 7: Comparación del costo por plántula obtenida en sistema convencional (semisólido) y BITs, para las etapas de establecimiento y multiplicación de *J. neotropica*.

SISTEMA DE CULTIVO IN VITRO	CICLO	ETAPAS	PLANTAS	CANT DE MEDIO (L)	BROTES OBTENIDOS	PERDIDA DE MATERIAL VEGETAL	COSTO DE MEDIO UTILIZADO (L)	COSTO MANO DE OBRA	SUBTOTAL
CONVENCIONAL	ACT. 1	ESTABLECIMIENTO	75	0,38	65	7%	3,53	18,75	22,28
	ACT. 2	INDUCCIÓN A MULTIPLICACIÓN	65	0,65	338	10%	37,22	46,38	83,60
	ACT. 3	SEMISOLIDO	338	10,14	587	10%	102,01	29,58	131,59
								TOTAL	237,47
								Costo /planta	0,40
BIT	ACT. 1	ESTABLECIMIENTO	75	0,38	65	7%	3,58	18,75	22,33
	ACT. 2	INDUCCIÓN A MULTIPLICACIÓN	65	0,65	338	10%	37,22	46,38	83,60
	ACT. 3	BIT	338	10,14	920	10%	61,65	21,13	82,78
								TOTAL	188,71
								Costo /planta	0,21



CAPITULO V: DISCUSIÓN

5.1 Establecimiento de embriones cigóticos maduros de *J. neotrópica*

Pascual et al., (2009) especifica que varios son los problemas del género *Juglans* para su introducción en el cultivo in vitro, especialmente si se usan explantes de material adulto, por lo que sugiere el uso de embriones como alternativa ya que posee un gran potencial de regeneración.

El porcentaje de germinación obtenido fue de 86,69% sin embargo Quintero & Jaramillo (2012) lograron un 100% de germinación a partir de semillas inmaduras, las cuales fueron recolectados cada cuatro semanas después de la polinización de la flor, La diferencia entre los porcentajes obtenidos y los publicados por Quintero & Jaramillo (2012) probablemente está asociada a la manipulación durante el proceso de extracción del embrión, también podría estar influenciada por el grado de madurez de la semilla, en el presente estudio se usó semilla madura en lugar de embriones obtenidos de frutos no maduros, esto, debido a que al inicio del experimento los árboles de nogal se encontraban en época de fructificación y para obtener embriones inmaduros se requería un período adicional, razón por la cual, se trabajó con el material disponible pese a que George et al., (2008) ratifican que en general el cultivo de embriones inmaduros como explantes genera una mayor proporción de plántulas, en comparación con los embriones maduros.

5.2 Efecto del sistema de cultivo sobre el número de brotes.

En los dos sistemas evaluados se obtuvo multiplicación de los explantes, con tasas que variaron entre 1,93 y 3,025 en el sistema semisólido y BIT respectivamente, la



multiplicación obtenida en el BIT es mayor a la obtenida en medio semisólido, varios son los estudios en distintas especies que corroboran los datos obtenidos, sin embargo es necesario indicar que los reportes de aplicación de BIT en leñosas en su mayoría no han reportado datos específicos ya que son generados por empresas con intereses comerciales. Ross & Castillo, (2010) reportaron que con el empleo de biorreactores lograron incrementar la multiplicación de *Achyrocline fláccida* respecto al sistema convencional, pasando de 4 a 11 brotes, en *E. grandis* Castro & Gonzales (2002), lograron un tasa de multiplicación de 11,5 brotes por explante; Alvarenga (2015) obtuvieron hasta 13 brotes por explante en *Stevia rebaudiana*; Perugorria, (2012) afirma que el uso de medio líquido en BIT, aumenta significativamente las tasas de proliferación en manzana M9 y Eucalipto, con respecto al medio convencional, información que se corrobora con los resultados obtenidos por (Escalona et al. 1999, Lorenzo et al. 2001, Etienne y Berthouly 2002, Aragón et al. 2014) quienes manifiestan que los BIT garantizan mayores tasas de multiplicación; ya que los explantes al estar en contacto directo con el medio de cultivo permiten una nutrición más eficiente; (Watt, 2012) además indica que la aireación o agitación del medio podría reducir los gradientes de difusión entre el medio y explante. (Etienne & Berthouly, 2002) estimulando la multiplicación de brotes.

5.3 Efecto del sistema de cultivo (BIT, Semisólido) en las variables de calidad.

Aunque, no se encontraron diferencias significativas de las variables: tamaño de brote, número de hojas, masa fresca y seca entre los dos sistema de cultivo evaluados, muchos autores han publicado resultados confirmando la eficiencia de los BIT en la calidad de plántulas obtenidas así Cejas et al, (2011) en banano; en piña (LLanos



Buendía, 2015); en *Digitalis purpurea*; Pérez Alonso, et al., (2015) de igual manera, obtuvieron los mayores valores en la masa fresca y masa seca que indicaron una mayor calidad de las plántulas generadas; Chakrabarty et al., (2003) dentro de su estudio en Manzana M9 observó que los brotes procedentes de BIT tenían mayores índices de masa seca y en general de mejor calidad, información que coincide con los conceptos expuestos por Escalona et al., (1999) quienes explican BIT mejoran el comportamiento fisiológico de los brotes, ya que los brotes muestran características similares al de las plantas *ex vitro*. Los resultados obtenidos en este estudio en referencia a las características antes analizadas no son evidentes; sin embargo en el presente trabajo se evaluaron parámetros para la optimización del sistema BIT aplicado a *J. neotropica* cuyos resultados de estandarización se evidencian; es importante notar que la calidad de los brotes constituye un factor importante para las etapas posteriores del cultivo *in vitro*.

5.4 Efecto de la frecuencia de inmersión en el número de brotes.

En cada una de las frecuencias de inmersión analizadas, se obtiene una media sobre los tres brotes por planta, aunque no existe diferencias estadísticamente significativas entre cada una de las frecuencias 6, 8 y 12 horas de inmersión para la variable número de brotes.

Sánchez et al. (2009) indican que la frecuencia de inmersión es considerada como un parámetro importante que interviene en la respuesta morfogénica de los explantes por el contacto con el medio de cultivo líquido. En este trabajo se han alcanzado los primeros resultados de la aplicación de Birreactores de Inmersión Temporal en *J. neotropica*, Por esta razón los resultados obtenidos se compararon con datos reportados en otras especies; resultados semejantes se han reportado en *E. grandis*



donde se concluye como mejor tratamiento una frecuencia de inmersión cada 12 horas por 3 minutos (Castro & González, 2002); De Fera Silva et al. (2003) demuestran que con 4 inmersiones diarias (c/6 horas), se observa el mayor número de explantes en *Psidium guajava cv*, sin embargo, los explantes obtenidos fueron de menor altura con respecto a los demás tratamientos, resultados que coinciden con los datos obtenidos en nuestro estudio. Como se pudo observar la frecuencia de inmersión cada 8 horas favoreció la obtención de un mayor promedio de brotes, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias estudiadas, esto al parecer se debe a que la inmersión cada 8 horas propició más disponibilidad de nutrientes conjuntamente con los reguladores de crecimiento que promovería la proliferación de los explantes, no obstante éste tratamiento presentó un gran porcentaje de brotes hiperhídricos, al igual que en la frecuencia de inmersión cada 6 horas. Basail, et al.,(2015) afirman que a medida que la frecuencia aumenta, se produce el incremento de la longitud del tallo, el número de brotes y el índice de multiplicación, a pesar de estas referencias, los resultados obtenidos con la frecuencia de inmersión cada 12 horas fue menor en cantidad de brotes, probablemente debido, a una menor disponibilidad de nutrientes, sin embargo, se obtienen explantes de mayor calidad en comparación con las frecuencias de inmersión cada 6 y 8 horas, información importante ya que el manejo de especies forestales en SIT, requiere una mayor comprensión sobre el tratamiento de la hiperhidricidad; Watt, P. (2012) sugiere un manejo especial al utilizar inmersiones cortas y largos periodos de descanso (frecuencias) Se puede observar que las condiciones que los BIT generan empleando frecuencias ajustadas a esta especie influyen de forma efectiva en los resultados obtenidos sobre todo en la calidad del brote.



5.5 Efecto de la frecuencia de inmersión en las variables indicadoras de calidad.

En la frecuencia de inmersión cada 12 horas se obtuvieron los mejores resultados para las variables tamaño de brote, número de hojas, masa fresca y seca, resultados que coinciden con los obtenidos en *E. grandis*, cuando el baño con el medio de cultivo se realiza en períodos largos cada 12 h, se logra un mejor aprovechamiento de los nutrientes; logrando mejorar la calidad de los brotes (Castro & González, 2002), sin embargo para lograr un desarrollo adecuado de los explantes se requiere que estos dispongan de nutrientes esenciales suficientes vinculados en el desarrollo de las plantas, (Amiri & Gharati, 2012), muchos autores señalan que la masa seca es un indicador de calidad de los brotes, Salisbury & Ross, (1994) citados por Castro & Gonzalez (2002) argumentan que la masa seca se compone de lignina y polisacáridos en la pared celular y además de proteínas, lípidos, aminoácidos, ácidos orgánicos y algunos elementos inorgánicos como el potasio como componentes en el protoplasma, justificando el mayor peso de la masa seca, en el presente estudio promedios mayores en masa seca se lograron mediante la aplicación de la frecuencia de 12 horas de inmersión.

5.6 Efecto de las frecuencias de inmersión y ventilación sobre el número de brotes.

A pesar de no encontrarse diferencias significativas, en el análisis conjunto de las frecuencias de inmersión y ventilación, entre el número de brotes tras 6, 8 y 12 horas de inmersión, los valores promedios de 8 y 12 horas resultan superiores al de 6 horas.



Para determinar la eficiencia del BIT es necesario determinar los tiempos y frecuencias de inmersión, esto dependerá de la especie con la que se esté trabajando (Castro & González, 2002) varios estudios sobre el análisis de las frecuencias de inmersión en SIT se han reportado, así: Chakrabarty et al. (2003) demuestran que en manzana M.9 EMLA tiempos largos de 20 a 30 min y frecuencias de 6 a 10 por día indujeron un mayor porcentaje de hiperhidricidad; mientras que para pistacho Akemir et al. (2013) sostienen que mediante la prolongación de la frecuencia de inmersión hasta 16 y 24 horas, los porcentajes de proliferación aumentaron significativamente entre un 85 y 88% comparado con el medio semisólido convencional.

Los contenedores de cultivo con ventilación forzada promueven una mejor distribución del CO₂ y la reducción de la humedad relativa, debido a la descarga continua de aire en el recipiente, probablemente con un efecto positivo que puede estimular la transpiración de las plantas, que luego será más eficaz para adaptarse a condiciones *ex vitro* (Zhao et al., 2012), con respecto a la influencia de la ventilación nuestros resultados concuerdan con el trabajo reportado por Oliveira, et al. (2014) en *E. grandis* en donde la ventilación no tuvo un efecto significativo con relación a la proliferación, de esta manera se hace necesario ajustar la frecuencia y tiempo de inmersión para la especie con la que se esté trabajando, considerando aspectos importantes como la calidad de las plantas.

5.7 Efecto de las frecuencias de inmersión y ventilación sobre el número de brotes hiperhídricos.

Los niveles de frecuencias de inmersión y la aplicación o no de ventilación, han tenido influencia sobre el número de brotes hiperhidratados, como era de esperarse tanto las



frecuencias de inmersión como la falta de ventilación favorecieron a la obtención de brotes hiperhídricos por el uso de medio líquido, además la hiperhidricidad reduce la síntesis de lignina (George, Hall, & De Klerk, 2008), provocando en lo posterior niveles bajos de masa fresca un indicador de calidad, además Quiala et. al,(2012) demuestran que la hiperhidricidad en *Tectona grandis* se produce por la acumulación de citoquininas endógenas activas, el control o eliminación de este desorden de la hiperhidricidad se la puede realizar mediante la ventilación y el control de la concentración de carbohidratos y macronutrientes del medio (Castro & González, 2002).

Sin embargo en nuestro estudio con la aplicación de ventilación cada 4 horas con un minuto de duración, se logró disminuir claramente la hiperhidratación. Kozai et al. (1993) indican que el número de intercambios de aire influyó en gran medida en el desarrollo y fotosíntesis de plántulas de patata, cambiando la temperatura del aire y la humedad relativa dentro del recipiente de cultivo, esta información es ratificada por varios autores quienes aplicaron la ventilación de manera forzada en *Psidium guajava* (De Fera et al., 2003) y en *Eucaliptus grandis* (Castro & González, 2002) reduciendo las afectaciones de los explantes por hiperhidricidad, además sugieren que el flujo de aire favoreció la posterior aclimatización en condiciones *ex vitro* en las dos especies; importante ventaja ratificada por Majada et al. (1997) en trabajos en *Dianthus caryophyllus* (clavel) quienes mencionan que al existir ventilación las características anatómicas y fisiológicas de las plantas son mejores que las obtenidas en recipientes herméticos, confirmándolo con valores altos en la supervivencia *ex vitro*.

5.8 Efecto de las frecuencias de inmersión y ventilación sobre las variables indicadoras de calidad.



Como se pudo observar en los resultados del efecto de las frecuencias de inmersión y la ventilación sobre las variables indicadoras de calidad, con respecto al tamaño de los brotes, el número de hojas, peso de masa seca y fresca los mayores valores se encuentran en dos frecuencias diarias. Lo que está de acuerdo con lo sugerido por Watt, (2012) quien plantea que los nutrientes en medio de cultivo líquido podrían ser absorbidos más eficientemente, sin embargo no se debe dejar de lado los nutrientes del medio de cultivo Amiri & Gharanti, (2012) quienes mencionan que la concentración macromineral del medio de cultivo favorece significativamente, tanto el crecimiento (peso seco y fresco) como la tasa de multiplicación en *Juglans nigra*.

El uso de medio líquido y la concentración de éste probablemente son los factores responsables para obtener un mayor incremento en la proliferación y un rápido crecimiento; además se indica que la producción de masa como índice biológico está relacionado directamente con la disponibilidad de nutrientes (Gárate & Bonilla, 2008). Así, podemos explicar que los resultados en el número de brotes obtenidos comparados entre el cultivo semisólido y el BIT evidencian las ventajas que éste último presenta en *J. neotropica* frente al cultivo convencional en medio semisólido, además que la menor frecuencia de inmersión, cada 12 horas, permite obtener brotes de mejor calidad.

5.9 Análisis de costo de la propagación convencional versus BITs

Los costos de multiplicación *in vitro* de *J. neotropica*, en el sistema convencional semisólido son significativamente mayores en comparación con el sistema BIT, con el cual los costos se redujeron hasta un 50%, es así que Lorenzo et al. (1998) citado por Etienne & Berthouly, (2002) determina que estimaciones realizadas hasta ahora



confirman la eficiencia del sistema, especialmente por el uso de medio líquido para micropropagación. Realizado un análisis en la proliferación de *Saccharum spp.*, se calculó que la aplicación de los BIT disminuye los costos en un 46% en comparación con el sistema semisólido; adicionalmente se pudo notar la reducción de requerimiento del área de estanterías y número de frascos (contenedores).

La mano de obra representa generalmente el 40-60% de los costos de producción, siendo considerado el rubro más alto en la micropropagación (Chu, 1995), en nuestro caso, el costo de la mano de obra representa el 60% de los costos de producción, por esto es importante destacar que el costo de mano de obra de un técnico resulta bastante alto para el sistema convencional.

Con respecto a los objetivos específicos planteados se puede discutir que el Sistema BIT, fue el mejor sistema en todas las variables estudiadas para la micropropagación de *Juglans neotrópica*, a excepción de la hiperhidricidad, descrita por Afreen F. (2006) como un trastorno fisiológico por la acumulación de agua apoplástica, debido al contacto prolongado entre los explantes y el medio de cultivo líquido.

Para contrarrestar la hiperhidricidad se han desarrollado diferentes sistemas, tales como sistema de balsa de membrana, biorreactor de niebla nutritiva, biorreactor de inmersión temporal, etc. (Akita & Takayama, 1994).

El biorreactor de inmersión temporal ha ganado popularidad principalmente debido a su simplicidad y alta tasa de producción con trastornos fisiológicos mínimos. (Etienne & Berthouly, 2002). Varios son los trabajos que demuestran la eficiencia del Sistema BIT, así lo mencionan Escalona et al. (1999) encontrando un aumento en la multiplicación de *Ananas comosus L. Merr.* en un 300% y 400%, con respecto al método convencional semisólido, otro estudio muestra que el BIT fue adecuado para la regeneración masiva de embriones somáticos de *Theobroma cacao L.* (Niemenak



et al. 2008). Al parecer este aumento se debe a las ventajas que presenta este sistema puesto que en cada inmersión mayor superficie del explante tiene contacto con los nutrientes y reguladores del crecimiento contenidos en el medio de cultivo (Afreen, 2006).

Entre los tratamientos analizados en BIT, el nivel de inmersión más eficiente fue el de dos frecuencias diarias, cada 12 horas, ya que todas las variables morfológicas indicadoras de calidad muestran un mayor desarrollo del brote, en su tamaño y peso, aspecto corroborado por Aragón et al. (2006) quienes exponen que usando la técnica de cultivo en BIT se favorece el aumento del coeficiente de multiplicación y la calidad de las plantas obtenidas bajo este sistema, afirmación ratificada por Afreen F. (2006) quién describe que una de las ventajas de los BIT es la de producir plántulas saludables y de calidad.

Varios trabajos han sido reportados con resultados similares usando el sistema BIT, Lorenzo et al., (1998) en *Saccharum sp.* Demuestran que el sistema empleado provocó un mayor coeficiente de multiplicación, además de ventajas desde el punto de vista de calidad de los brotes. Por otra parte Alvarenga, (2015) compara los BIT, RITA y Sistema convencional en *Stevia rebaudiana Bertoni* determinando que en un tiempo de inmersión de 10 minutos por 2 frecuencias diarias en BIT, produjeron plantas vigorosas, con un promedio mayor en las variables longitud, masa fresca y masa seca.

Licea (2016) expresa que los brotes con baja calidad, tienen menos cantidad de reservas, lo que provocaría una disminución en su capacidad de supervivencia, al mismo tiempo recalca que la nutrición también es un factor importante en la obtención



de brotes de calidad y su posterior comportamiento en cada una de las etapas de micropropagación.

También en el tratamiento de dos frecuencias de inmersión diarias, el problema de hiperhidricidad se redujo, como era de esperarse, ya que el mayor problema, debido al medio de cultivo líquido en los Biorreactores de inmersión temporal, es el fenómeno de hiperhidricidad, que consiste en la deformación morfológica y malformación foliar, por la inmersión continua de los explantes (Ziv, 2002), este fenómeno puede ser reducido con ciclos correctamente regulados (Etienne & Berthouly, 2002) y pulsos de aire (Castro & González, 2002). Aunque en nuestro estudio no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a número de brotes respecto a las frecuencias de inmersión, si se pudo evidenciar una mejora en la calidad de éstos al reducir la frecuencia de inmersión, también el número de brotes hiperhídricos se redujo al aplicar la ventilación forzada con una frecuencia de dos inmersiones diarias aunque el efecto de la ventilación en general no se evidenció con una significancia estadística.

Estudios sobre el uso de la ventilación forzada en *Psidium guajava* cv indicaron, que la aplicación de ventilación forzada redujo la hiperhidricidad mejorando sus cualidades para la etapa de aclimatización. (De Fera Silva et al., 2003) incluso la ventilación forzada puede mejorar el crecimiento de las plántulas y con una adecuada nutrición aumenta significativamente la masa fresca (Kozai et al., 1999), La ventilación forzada permite el intercambio gaseosos entre el interior y el exterior del recipiente, la composición gaseosa (CO₂), vapor de agua o cualquier otro gas asegurando la renovación del ambiente interno del recipiente (Teisson & Alvard, 1995). Entonces, en nuestro estudio, el efecto de la ventilación probablemente sea evidente en una



siguiente etapa, es decir en el enraizamiento o aclimatización de las plantas que se obtengan.

Por otra parte, el promedio obtenido en la multiplicación en semisólido fue menor al reportada por Peña et al., (2014) en la misma especie, esto podría posiblemente ser un efecto del genotipo, aunque Licea Moreno, (2016) manifiesta que el genotipo no interviene en la etapa de proliferación, pero confirma que si lo hace en las fases de establecimiento y enraizamiento.



CAPITULO VI: CONCLUSIONES

- La micropropagación de *Juglans neotropica* bajo el sistema de Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) produjo más brotes de mejor calidad estos frente al sistema de cultivo convencional semisólido, presentando potencial para convertirse en una herramienta novedosa para la propagación de *Juglans neotrópica*.
- A pesar de haber obtenido el mayor promedio de brotes en la frecuencia de inmersión cada 8 horas, la calidad que estos alcanzan no presentan las características necesarias para ser sometidas a un subcultivo o una fase posterior de enraizamiento y aclimatización.
- Con una frecuencia de inmersión cada 12 horas se han logrado conseguir brotes de mejor calidad, para la etapa de multiplicación in vitro de *Juglans neotropica* en BITs.
- La hiperhidricidad, se logró reducir considerablemente con una ventilación de un minuto cada 4 horas por lo que se sugiere incorporarla en la fase de multiplicación de *Juglans neotropica* en BIT
- Con el uso de la Tecnología BIT los costos generados se reducen en un 65%, comparados con el cultivo semisólido, adicionalmente se redujo el espacio requerido en cuanto a número de contenedores y el tiempo de mano de obra, lo que permite estudiar otros factores para aumentar el número de brotes.



RECOMENDACIONES:

- Se recomienda además estudiar el grado de madurez de las semillas en la germinación de embriones cigóticos *in vitro* ya que esta información podría aportar en la obtención de un mayor número de brotes por explante.
- Considerar como variable adicional el volumen del medio de cultivo en BIT, ya que en el presente estudio sólo se analizó un único volumen.
- Para obtener un mejor resultado en la proliferación se recomienda también seleccionar preliminarmente los explantes que mejor respuesta presenten en la etapa de inducción a la multiplicación. Además un estudio de caracterización morfológica de las plántulas obtenidas de la germinación de los embriones cigóticos asociada con los resultados de multiplicación durante la fase de inducción podría ser valioso para discriminar con antelación las plántulas más prolíferas de encontrarse una correlación positiva entre los resultados.
- Se recomienda también realizar la etapa de inducción a la multiplicación directamente en los BITs, pero siempre con una previa selección de los explantes basada en la prueba de sanidad vegetal.
- Se recomienda la evaluación del uso de balsas en los BITs, para evitar pérdida de material por asfixia.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bibliografía

- (FAO), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; Ministerio del Ambiente (MAE). (2008). *Información forestal disponible en 2004 sobre el FAO perfil forestal del país*. Quito: A. Alba.
- Afreen, F. (2006). TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR Engineering considerations and applications in plant micropropagation. En D. Gupta, & Y. Ibaraki, *Plant tissue culture engineering* (págs. 187-201). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Aguilar, M., & Mesén, F. (2006). Taller Nacional de Biotecnología Vegetal de Costa Rica. Costa Rica: CATIE.
- Aguirre Mendoza, N. (2007). *Silvicultural contributions to the reforestation with native species in the tropical mountain rainforest region of South Ecuador*.
- Akdemir, H., Suzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y., & Ozden, Y. (2013). Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. (Springer, Ed.) *Plant Cell Tiss Organ Cult*.
- Akita, M., & Takayama, S. (1994). Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Rep.*, 13, 184-187.
- Albany de Vílchez, N. R. (14 de Octubre de 2015). Propagación in vitro de Zábila (*Aloe Barbadosensis* Mill.) utilizando. Córdoba, Venezuela: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016.
- Alvard, D., Cote F, D., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium cultures for banana micropropagation. Effect of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 32, 55–60.
- Alvarenga Venutolo, S. (2015). Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*, 36(3), , 36(3), 50-57. Recuperado el 15 de septiembre de 2016, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&p
- Alvarenga Venutolo, S. (s.f.). 2015 Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*, 36(3), 50-57.
- Amiri, M., & Gharati, S. (2012). Influence of medium composition on multiplication of walnut (*Juglans regia* L.) growth. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(8), 1482-1485.



- Aragón, C., Escalona, M., Capote, I., Cejas, I., Rodríguez, R., Sandoval, J., . . . Debergh, P. (2006). Aspectos metabólicos del crecimiento y desarrollo de las pantulas de plátano (CEMSA3/4) micropropagadas en biorreactores de inmersión temporal (BIT). *Cultivos Tropicales*, 27(1), 39-44.
- Aragón, C., Sánchez, C., González-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L., & Amancio, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization. *Biología Plantarum*, 58(1), 29-38.
- Ballester, A., & Vieitez, A. (2006). Producción forestal y Biotecnología. (págs. 520-522). I. d. Galicia, Ed.
- Basail, M., Medero, V., Torres, Y., Jiménez, A., Torres, J., Santos, A., . . . Gutiérrez, Y. (2015). 1, 2015 RNPS: 2397 (Versión electrónica) 32 MULTIPLICACIÓN DEL CULTIVAR DE PLÁTANO 'CEMSA ¾' (AAB) EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL. *Agricultura Tropicá*, 1(2), 32-41.
- Berthouly, M., & Etienne, H. (2002). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. (Springer, Ed.) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(215), 215-231. Recuperado el 22 de 8 de 2016, de <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1015668610465>
- Bosela, M., & Michler, C. (2008). Media effects on black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth in vitro: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*(44), 316–329.
- Calva, G., & Pérez Vargas, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria (UNAM)*, 6(11), 16. Recuperado el 1 de Agosto de 2016, de <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm>
- Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., & Majada, J. P. (2001). Fisiología del cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*, 1(1), 1.
- Carrizosa, M. (1994). II Congreso. La Investigación en la Universidad Javeriana. *Cultivo de tejidos para la propagación y mejoramiento de especies forestales. II Congreso.*, (págs. 547-559). Santa Fé.
- Castro, D., & González, J. (2002). Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system. *Agricultura Técnica*.
- CATIE, C. A. (2000). Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina. En CATIE, *Juglans Neotropica Diels* (Vol. 1, págs. 163-164). Turrialba, Costa Rica.



- Cejas, I., Capote, I., Aragón, C. E., Escalona, M., Pina, D. G., & Justo, R. R. (2011). Optimizing protocol of plantain propagation cv. CEMSA ¾ in Temporary Immersion Bioreactors. *Agrociencia*, 15(1), 13-18.
- Chakrabarty, D., Paek, Y., Hahn, E., & Yoon, Y. (2003). Micropropagation of apple rootstock M.9 EMLA using bioreactor. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78(5), 605-609.
- Chu, I. (1995). Economic analysis of automated micropropagation. In: Aitken–Christie J, Kozai T, Smith MAL (eds) Automation and Environmental Control. *Plant Tissue Culture*, 19-27.
- De Fera Silva, M., Chávez Milián, M., Quiala Mendoza, E., & Jiménez González, E. (2003). Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación in vitro de *Psidium guajava* cv. Enana roja en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*, 3(3), 149 - 154.
- Debasis, C., Kee Yoeup, P., & Mei Lan, L. (2003). Growth of *Lilium Oriental Hybrid "Casablanca"* bulblet using bioreactor culture. *Scientia Horticulturae*, 97(1), 41-48.
- Driver, J., & Kuniyuki, A. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*(19), 507–509.
- Eidi, A., Jalal, M. Z., Mortazavic, P., Shamsali, R., & Somayeh, O. (2013). Hepatoprotective effects of *Juglans regia* extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Pharmaceutical Biology*, 51(5), 558-565.
- Escalona, M. (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 39, 651–656.
- Escalona, M. (2006). Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta anual.*, 48-50.
- Escalona, M. (2015). Manejo de los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) en la propagación de plantas., (pág. 23). Cuenca.
- Escalona, M., Aragón, C. A., Capote, I., Pina, D., Ceja, I., Rodríguez, R., & Debergh, P. (2007). Physiology of effects of temporary immersion bioreactor (TIB) on micropropagated plantlets. *Acta horticulturae.*, 95-101.
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., González, J., Desjardins, Y., & Borroto, C. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation. *Springer*, 743-748.



- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*(69), 215-231.
- Feuillet Hurtado, C., Macías Pinto, D., & Chito Cerón, E. (2011). Plántas útiles para la elaboración de artesanías en el departamento del Cauca (Colombia). *Boletín Científico Centro de Museos de Historia Natural*, 15(2), 40-59.
- Gárate, A., & Bonilla, I. (2008). *Nutrición mineral y producción vegetal*. En: Azcón-Bieto J, Talón M *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: McGraw Hill Interamericana.
- García Gonzáles, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e investigación agraria*, 37(3), 5-30.
- George, E. F., & Debergh, P. C. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. En E. George, M. Hall, & G.-J. Klerk, *Plant Propagation by Tissue Culture* (Vol. III, págs. 29-62). The Netherlands.: Springer.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3 ed., Vol. 1). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Review Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering Life Sciences*, 14, 607-621.
- González, M. (2013). *Multiplicación in vitro de brotes de Bambusa vulgaris Schrader ex Wendland en medio de cultivos líquidos*. Tesis de postgrado, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Santa Clara.
- Grijalva, J., & Checa, X. (2012). *Situación Recursos Genéticos forestales. Informe país-Ecuador*. Quito.
- Herrera Herrera, C. (2016). Evaluación de fuentes semilleras de especies forestales nativa, como apoyo a programas y políticas de reforestación de laprovincia de Loja. En C. Herrera Herrera, *Evaluación de fuentes semilleras de especies forestales nativa, como apoyo a programas y políticas de reforestación de laprovincia de Loja* (pág. 95). Loja.
- Iles, D., Meneses, L., Piedra Burbano, M., Orbe, K., & Morillo, E. (2015). Microtuberización de los cultivares de papa INIAP-Victoria y Supechola bajo sistemas de inmersión temporal. . *VI Congreso Ecuatoriano de la Papa* (págs. 122-124). Ibarra: INIAP/CIP.



- Kozai, T., Afreen, F., & Zobayed, S. 2. (2005). . Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. *Springer*, 314.
- Kozai, T., Kubota, C., & Zobayed, S. (1999). Develoment of a forced ventilation micropropagation system for large-scale photoautotrophicculture and its utilizacion in sweet potato. *In Vitro Cell Biol Plant*, 35, 350-355.
- Kozai, T., Kubota, C., Zobayed, S., & Nguyen, Q. (1995). *Developing a mass-propagation system of woody plants*. In: *Watanabe, K. and Komamine, A.* USA.
- Kozai, T., Tanaka, K., Jeong, B., & Fujiwara, K. (1993). Effect of relative humidity in the culture vessel on the growth and shoot elongation of potato plantlets in vitro. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science*, 62(473), 7.
- Licea Moreno, R. J. (2016). Biotecnología forestal aplicada a la producción de madera de nogal. *Tesis Doctoral*, 1-3. Madrid, España: E.T.S.I. Agrónomos (UPM) [antigua denominación].
- Licea-Moreno, R., Contreras , A., Morales , A., Urban , I., Daquinta, M., & Gomez, L. (2015). Improved walnut mass micropropagation through the combined use of phloroglucinol and FeEDDHA. *Plant Cell Tiss Organ Cult*.
- LLanos Buendía, C. I. (2015). *Micropropagación in vitro de piña, Ananas comosus (L.) Merr Var. MD2 (Bromeliaceae) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal*.
- Lloyd , G., & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings*. (30), 421-427.
- Long, L., Preece, J., & Van Sambeek, J. (1995). Adventitious regeneration of *Juglans nigra* L. (eastern black walnut). *Plant Cell Reports*, 14(12), 799--803.
- Lopez Carvajal , J., & Piedrahita Cardona, E. (1998). Respuesta de la Semilla de Cedro Negro (*Juglans Neotropica* Diels) a la Aplicación de Tratamientos Pregerminativos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 51(1).
- Lorenzo, J., González, B., Escalona, M., Teisson, C., Borroto, C., & Espinosa, P. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 200, 197–200.
- Majada, J., Fal, M., & Sanchez-Tames, R. (1997). The effect of the number of air exchanges per hour on proliferation <and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. *In vitro Cellular Development Biology-Plant*, 33, 9.



- McAlister, B., Finnie, J., Watt, M., & Blakeway, F. (2005). Use of temporary immersion bioreactor system (RITA ®) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forest (SA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(3), 347-358.
- Montgomery, D., & Runger, G. (2003). *Applied Statistical and Probability for Engineers* (3rd ed ed.). New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol plant*(48), 473-497.
- Niemenak, N., Saare-Surminski, K., Omokolo Ndoumou, D., Lieberei, R., & Rohsius, C. (2008). Regeneration of somatic embryos in Theobroma cacao L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Reports*.
- Oliveira, M., Xavier, A., Penchel Filho, R. M., & Palauro dos Reis, J. (2014). Effect of frequency of immersion and air injection on in vitro, multiplication of Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophyllain temporary immersion biorreactor. *Ciência Florestal, Santa Maria*, 24(1), 37-45.
- Ospina Penagos, C., Hernandez Restrepo, R., Aristizabal Valencia, F., Patiño Castaño, J., & Salazar Castaño, J. (2003). El cedro negro: Una especie promisoriosa de la zona cafetera. (H. F. Ospina Ospina, Ed.) *CENICAFE*, 40. Recuperado el junio de 2016, de <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/580/1/025.pdf>
- Pascual Alcón, B., Ligos, J., & De Peña, M. A. (2009). Evaluación del cultivo In Vitro de nogal (Juglans regia L.) para la proliferación de. *5º Congreso forestal español* (págs. 2-10). Sociedad Española de Ciencias Forestales.
- Payghamzadeh, K., & Sayyed, K. K. (2011). In vitro propagation of walnut - A review. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 290-311.
- Peña T, D., Rocano C, M., Salazar O, J., & Torres, C. (2014). Inducción de la brotación in vitro de microplántulas de Nogal (Juglans neotropica) tratadas con Thidiazuron (TDZ) y 6-Bencilaminopurina (BAP). *MASKANA*, 5(2), 81-85.
- Pérez Alonso, N., Capot, A., Pérez, A., Gerth, A., Chong Pérez, B., & Jiménez, E. (2015). Efecto de la densidad de inóculo y la renovación de la atmósfera



- gaseosa en el cultivo de brotes de *Digitalis purpurea* L. en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*, 15(1), 35-45.
- Perrugoria, M. (2012). *Desarrollo de una técnica para micropropagación de especies leñosas en biorreactores*.
- Pijut, P., Lawson, S., & Michler, C. (2011). Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 123–147.
- Quiala, E., Cañal, M.-J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., . . . Barbón, R. (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Cell Tiss Organ Cult.*, 109(2), 223-234.
- Quintero García, O., & Jaramillo Villegas, S. (2012). Rescate y germinación in vitro de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglans neotropica* Diels). 61, 1, 52-60. Scielo.
- Raurau Quisuyupanqui, M. (2012). *Caracterización de fuentes semilleras para uso sostenible y conservación de recursos forestales de los bosques andinos de Loja, Ecuador*. CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA (CATIE), POSTGRADO. Turrialba: Tesis de postgrado.
- Rave Oviedo, S., Montenegro Ríos, M., & Molina Rico, L. (2013). Caída y descomposición de hojarasca de *Juglans neotropica* Diels (1906) (juglandacea) en un bosque montano andino, pijao (quindío), Colombia. *Actual Biol*, 35(98), 33-43.
- Robert, M. L., Herrera, J. L., Herrera, G., Herrera A, M., & Fuentes, P. (2005). A New Temporary Immersion Bioreactor System. En V. M. Loyola Vargas, & F. Vázquez Flota, *Methods in Molecular Biology. vol 318. Plant Culture Protocols* (Vol. 318). Totowa NJ: Humana Press Inc.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Cali, Colombia.
- Rojas Rodríguez, F., & Torres Córdova, G. (2008). Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción. *Kurú: Revista Forestal (Costa Rica)*, 3.
- Roschke, C., & Pijut, M. (10 de 10 de 2006). *North Central Research Station*. Obtenido de <http://www.ncrs.fs.fed.us/>
- Ross, S., & Castillo, A. (2010). Micropropagación de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. en medios de cultivo líquidos. *Agrociencia*, XIV(1), 1-71.
- Salinas, N., & Cárdenas, D. (2007). *Libro Rojo de plantas de Colombia*. Bogotá.



- Salisbury, F., & Ross. (1994). *Fisiología vegetal*. Mexico D.F.: Iberoamerica.
- Sánchez Zamora, M., Cos Terrer, J., Frutos Tomás, D., & García López, R. (2006). Embryo germination and proliferation in vitro of *Juglans regia* L. *Scientia Horticulturae*, 317-321,.
- Sánchez, J., Daquinta, M., & Capote, I. (2009). Multiplicación in vitro de *Zantedeschia* spp. variedad Treasure en Sistemas de Inmersión Temporal. *Bioteología Vegetal*, 9(4), 211 - 215.
- Takayama, S., & Akita, M. (2005). Bioengineering aspects of bioreactor application in plant. En G. Dutta, & I. Yasuomi, *Plant Tissue Culture Engineering* (págs. 81-83). The Netherlands.: Springer.
- Teisson, C., & Alvard, D. (1995). A New Concept of Plant In Vitro Cultivation Liquid Medium: Temporary Immersion. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 105-110.
- Teisson, C., Alvard, D., Lartaud, M., Etienne, H., Berthouly, M., Escalona, M., & Lorenzo, J. (1999). Temporary immersion for plant tissue culture. In *Plant Biotechnology and In vitro Biology in the 21st Century, Proceedings of the IXth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture* (pp. 629-632). Jerusalem.
- Texeira, B. J. (2014). *Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de Juglans neotropica Diels "nogal peruano*.
- Toosi, S., & Dilmagani, K. (Agosto de 2010). Proliferation of *Juglans regia* L. by in vitro embryo. *Journal of Cell Biology and Genetics*, 1(1), 12-19.
- Toribio, C. (2000). El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. *Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA)*, 12. Recuperado el 3 de agosto de 2016, de <http://www.inia.es/IASPF/2000/fueraserie/TORIB.PDF>
- Trejo, G., & Rodriguez, M. (2007). La agragación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia*, 32(10), 669-679. Recuperado el 1 de Agosto de 2016, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007001000006&lng=es&tlng=es.
- Urgiles, N., Haug, I., Setaro, S., & Aguirre, N. (2016). *Introducción a las Micorrizas en los Trópicos con Énfasis en el Bosque Montano en el Sur del Ecuador*. Loja. Recuperado el 21 de 10 de 2016, de https://www.researchgate.net/profile/Narcisa_Urgiles_Gomez/publication/3060



82812_Introduction_to_Mycorrhizas_in_the_Tropics_with_Emphasis_on_the_Montane_Forest_in_Southern_Ecuador/links/57af01ce08aeb2cf17c23695.pdf

- Wardle, K., Dobbs, E., & Short, K. (1983). In vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Soc. Hort. Sci*(108), 386-389.
- Watt, P. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 11(76), 1-11.
- Williams, R. (1990). *Juglans nigra L., Black walnut*. In: Burns RM, Honkala BH (techcoords) *Silvics of North America, Hardwoods*. USDA For Serv Agric Handbook 654 (Vol. 2). Washington,.
- Zapata Maldonado, C. I. (2014). *Evaluación de la producción de Explantes de mora sin espina "Rubus Glaucus Benth" en la fase de multiplicación vegetativa en un sistema de inmersión temporal (Doctoral dissertation)*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE., Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Quito.
- Zelterman, D. (2010). *Applied Linear Models with SAS®*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Zhao, Y., Sun, W., Wang, Y., Saxena, P., & Liu, C.Z. (2012). Improved mass multiplication of *Rhodio lacrenulata* shoots using temporary immersion bioreactor with forced ventilation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 66(6), 1480-1490.
- Ziv, M. (2002). Simple biorreactor for mass propagation of plants. *1st Symp liquid systems for in Vitro Mass Propagation of plants*. Norway.
- Zobayed, S. (2006). Aereation in plant tissue culture. Engineering aspects of vessel design. En D. Gupta, & Y. Ibaraki, *PLANT TISSUE CULTURE ENGINEERING* (págs. 312-314). Dordrecht, The Netherlands: Springer.