



UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“Evaluación de métodos de propagación de *Macleania rupestris* (Joyapa) mediante la germinación de semillas y micropropagación de meristemas”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo

AUTORES:

Ortiz Rodríguez Katherine Elizabeth

CI: 0302716766

Iñamagua Pandi Wilson Fabián

CI: 0106626526

DIRECTOR:

Dr. Segundo Moisés Maita Supliguicha PhD.

CI: 0102297553

CUENCA-ECUADOR

09 de septiembre de 2019



RESUMEN

Macleania rupestris, conocida como Joyapa, pertenece a la familia *Ericáceae*, es una planta frutal no domesticada, epífita, terrestre y nativa de las especies andinas que se encuentra en los páramos y subpáramos ecuatorianos. *M. rupestris* considerada una especie importante por su producción de frutos, los cuales sirven de alimento para personas y animales. *Macleania* presenta dificultades al momento de su propagación, por lo que se considera una especie difícil de propagar. En esta investigación, se evaluaron dos métodos de propagación (sexual y asexual) para *M. rupestris*. En la propagación sexual, se utilizaron semillas de frutos de joyapa en tres etapas fenológicas (tierno, semi maduro, maduro) que fueron colectadas en la parroquia Jima, cantón Sigüig. Para inducir la germinación de las semillas, se aplicó ácido giberélico en 6 concentraciones (0 ppm, 200 ppm 400 ppm 600 ppm 800 ppm 1000 ppm). Para la propagación asexual, se utilizaron 100 meristemas apicales sembrados en un medio de cultivo Murashige y Skoog enriquecido con ácido giberélico (0,5 mg / l). Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas entre las tres etapas fenológicas. Las concentraciones de ácido giberélico que presentaron los mayores porcentajes de germinación fueron de 400 ppm y 800 ppm aplicados a semillas obtenidas de frutos tiernos. En el caso de la propagación asexual la aplicación de ácido giberélico (0,5 mg / l) agregada al medio de cultivo presentó el mejor resultado alcanzando el 50,77% del prendimiento de los explantes. En conclusión, la propagación a partir de semillas de *M. rupestris* fue superior con el uso del ácido giberélico siendo como el método más eficiente en este momento; por otra parte, para la propagación por meristemas apicales la aplicación de AG₃ tuvo mejores resultados, lo cual podría ser considerado como un método base para la estructuración de un protocolo para la especie.

Palabras clave: *Macleania rupestris*. Joyapa. Ácido giberélico. Meristemas. Semillas.



ABSTRACT

Macleania rupestris, known as Joyapa, belongs to the family of the *Ericáceae*, is a non-domesticated fruit plant, epiphytic, perennial, endemic Andean species that is found in the páramos and subpáramos Ecuadorian. *M. rupestris* is considered an important species for the restoration of degraded ecosystems. This species presents difficulty at the time of its spread, which is why it is considered an endangered species. This investigation, two propagation methods (sexual and asexual) for *M. rupestris* were evaluated. In sexual propagation, seeds of joyapa fruits were used in three phenological stages from the Jima Parish, Sigsig Canton. To induce germination of seeds, gibberellic acid was applied in 6 concentrations and to asexual propagation, 100 apical meristems seeded in a Murashige and Skoog culture medium enriched with gibberellic acid (0.5 mg / l) were used. Results showed that there are no significant statistical differences between the three phenological stages. Concentrations of gibberellic acid that presented the highest percentages of germination were 400 ppm and 800 ppm applied to seeds obtained from fruits in the sweet phenological stage. In the case of asexual propagation using apical meristems, the application of gibberellic acid (0.5 mg / l) added to the culture medium Murashige and Skoog presented the best result reaching 50% of development of the explants. In conclusion, the multiplication of *M. rupestris* is facilitated with the use of gibberellic acid being the most efficient method at the moment, on the other hand, asexual propagation by apical meristems is foreseen as a promising method once established protocols are established for this species.

Key words: *Macleania rupestris*. Joyapa. Gibberellic acid. Meristems. Seeds.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE ANEXOS.....	12
ÍNDICE DE IMAGENES.....	13
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	15
1. INTRODUCCIÓN	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo general	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. HIPÓTESIS	24
4. REVISIÓN DE LITERATURA	25
4.1 Descripción de la familia Ericaceae.....	25
4.2 Descripción de la especie <i>Macleania rupestris</i>	26
4.3 Morfología de la especie.....	26
4.4 Características nutricionales.....	27
4.5 Métodos de propagación.....	27
4.6 Propagación sexual.....	28
4.7 Propagación asexual.....	29



4.8 Tejidos meristemáticos	31
4.9 Meristemas apicales	31
4.10 Medios de cultivo	31
4.11 Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog)	32
4.12 Medio de Cultivo WPMm	32
4.13 Biorreguladores	32
4.14 Ácido Giberélico (AG₃)	33
4.15 Ácido indolbutírico (AIB)	33
5. METODOLOGÍA	35
5.1 Área de estudio	35
5.2 Propagación sexual	36
5.2.1 Recolección de semillas	36
5.2.2 Desinfección de semillas	36
5.2.3 Preparación del Ácido Giberélico	36
5.2.4 Siembra	37
5.2.5 Germinación	37
5.2.6 Repique de plántulas	37
5.2.7 Sombreado	37
5.2.8 Cuidados culturales	38
5.3 Propagación asexual	38



5.3.1 Recolección del material vegetativo	38
5.3.2 Desinfección del material	38
5.3.3 Preparación del medio de cultivo (MS)	39
5.3.4 Siembra de meristemas	39
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	41
6.1 Propagación sexual.....	41
6.2 Propagación asexual.....	41
6.3 Variables analizadas	41
6.3.1 Propagación sexual.....	41
6.3.2 Propagación asexual.....	41
7. RESULTADOS	42
7.1 Propagación sexual (semillas)	42
7.1.1 Porcentaje de germinación de semillas de <i>M. rupestris</i> (Joyapa) según sus estados fenológicos a los 30 y 60 días.....	42
7.1.2 Porcentaje de germinación de semillas de <i>M. rupestris</i> bajo el efecto del Ácido Giberélico (AG ₃).....	43
7.1.3 Porcentaje de germinación de semillas bajo el efecto del Ácido Giberélico (AG ₃)	45
7.1.4 Longitud de raíz de plántulas de <i>M. rupestris</i> (Joyapa) en sus diferentes estados fenológicos.....	48



7.1.5 Longitud de raíz de plántulas de <i>M. rupestris</i> (Joyapa) en sus diferentes estados fenológicos.....	51
7.1.6 Altura de plántulas de <i>M. rupestris</i> (Joyapa) a los 30 días en sus diferentes estados fenológicos.....	54
7.1.7 Altura de plántulas de <i>M. rupestris</i> (Joyapa) a los 60 días, en sus diferentes estados fenológicos.....	57
7.1.8 Altura de plántulas de <i>M. rupestris</i> (Joyapa) a los 90 días de su repique en sus diferentes estados fenológicos.	60
7.1.9 Análisis de peso seco a nivel foliar y radicular de plántulas de Joyapa a los 90 días	64
7.2 Propagación asexual (meristemas)	65
7.2.1 Efecto del AG ₃ sobre el desarrollo de meristemas de <i>M. rupestris</i>	65
7.2.2 Altura de plántulas procedentes de meristemas de <i>M. rupestris</i> bajo el efecto de AG ₃	66
8. DISCUSIÓN	67
9. CONCLUSIONES	69
10. RECOMENDACIONES	70
11. BIBLIOGRAFÍA	71
12. ANEXOS	75



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de AG ₃ utilizadas en la propagación sexual de <i>M. rupestris</i>	37
Tabla 2. Peso fresco y seco de raíces (mg) de plántulas de <i>M. rupestris</i> a los 90 días.....	64
Tabla 3. Peso fresco y seco de hojas (mg) de plántulas de <i>M. rupestris</i> a los 90 días.	64
Tabla 4. Prueba Mann Whitney porcentaje de meristemas desarrollados a los 15 días.....	65
Tabla 5. Altura de plántulas de <i>M. rupestris</i> en medio MS enriquecido con AG3 y BAP....	66



ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Mapa de ubicación geográfica de la provincia del Azuay, la parroquia Jima, comunidad de Zhipta.....	35
Fig. 2. Etapas del desarrollo del fruto de joyapa (<i>M rupestris</i>): (a) Capullo floral (b) flor (c) Estadio inicial del desarrollo; (d) fruto de 8-9 mm diámetro; (e) fruto de 12 mm diámetro; (f) Semimaduro; (g) fruto Maduro.	36
Fig. 3. Porcentaje de germinación de semillas de <i>M. rupestris</i> en los diferentes estados fenológicos a los 30 y 60 días, n=4.	42
Fig. 4. Porcentajes y rangos pertenecientes a los tratamientos de ácido giberélico AG ₃ aplicados en la germinación de semillas de <i>M. rupestris</i> en el estado tierno a los 30 días, n=4, desviación estándar.	43
Fig. 5. Porcentajes y rangos pertenecientes a los seis tratamientos de ácido giberélico AG ₃ aplicados en la germinación de semillas de <i>M. rupestris</i> en el estado semi maduro a los 30 días, n=4, desviación estándar.	44
Fig. 6. Porcentajes y rangos pertenecientes a los tratamientos de ácido giberélico AG ₃ aplicados en la germinación de semillas de <i>M. rupestris</i> en el estado maduro a los 30 días, n=4, desviación estándar.	45
Fig. 7. Porcentajes y rangos pertenecientes a los tratamientos de ácido giberélico AG ₃ aplicados en la germinación de semillas de <i>M. rupestris</i> en el estado tierno a los 60 días, n=4, desviación estándar.	46
Fig. 8. Porcentajes y rangos pertenecientes a los seis tratamientos de ácido giberélico AG ₃ aplicados en la germinación de semillas de <i>M. rupestris</i> en el estado semi maduro a los 60 días, n=4, desviación estándar.	47



Fig. 9. Porcentajes y rangos pertenecientes a los tratamientos de ácido giberélico AG ₃ aplicados en la germinación de semillas de <i>M. rupestris</i> en el estado maduro a los 60 días, n=4, desviación estándar.	48
Fig. 10. Longitud y rangos de raíz (mm) de plántulas de <i>M. rupestris</i> , en el estado tierno a los 30 días, bajo la aplicación de AG ₃ , n=4, desviación estándar.	49
Fig. 11. Longitud y rangos de raíz (mm) de plántulas de <i>M. rupestris</i> en el estado semi maduro a los 30 días, bajo la aplicación de AG ₃ n=4, desviación estándar.	50
Fig. 12. Longitud y rangos de raíz (mm) de plántulas de <i>M. rupestris</i> en el estado maduro a los 30 días, bajo la aplicación de AG ₃ n=4, desviación estándar.	51
Fig. 13. Longitud de raíz (mm) de plántulas de <i>M. rupestris</i> para el estado tierno a los 60 días, bajo la aplicación de AG ₃ , n=4, desviación estándar. Fuente: Grupo de trabajo	52
Fig. 14. Longitud y rangos de raíz (mm) de plántulas de <i>M. rupestris</i> para el estado semi maduro a los 60 días, bajo la aplicación de AG ₃ , n=4, desviación estándar.	53
Fig. 15. Longitud y rangos de raíz (mm) de plántulas de <i>M. rupestris</i> para el estado maduro a los 60 días, bajo la aplicación de AG ₃ , n=4, desviación estándar.	54
Fig. 16. Altura y rangos de plántulas (mm) de <i>M. rupestris</i> para el estado tierno a los 30 días, bajo la aplicación de AG ₃ , n=4, desviación estándar.	55
Fig. 17. Altura y rangos de plántulas (mm) de <i>M. rupestris</i> para el estado semi maduro los 30 días, n=4, desviación estándar.....	56
Fig. 18. Altura de plántulas (mm) de <i>M. rupestris</i> para el estado maduro a los 30 días, n=4, desviación estándar. Fuente: Grupo de trabajo	57
Fig. 19. Altura y rangos de plántulas (mm) de <i>M. rupestris</i> para el estado tierno a los 60 días, n=4, desviación estándar.	58
Fig. 20. Altura y rangos de plántulas (mm) de <i>M. rupestris</i> para el estado semi maduro a los 60 días, n=4, desviación estándar.....	59



- Fig. 21.** Altura y rangos de plántulas (mm) de *M. rupestris* para el estado maduro a los 60 días, n=4, desviación estándar. 60
- Fig. 22.** Altura y rangos de plántulas (mm) de *M. rupestris* en el estado tierno a los 90 días de su repique a bandejas de germinación, n=4, desviación estándar. 61
- Fig. 23.** Altura y rangos de plántulas (mm) de *M. rupestris* en el estado semi maduro a los 90 días de su repique a bandejas de germinación, n=4, desviación estándar. 62
- Fig. 24.** Altura y rangos de plántulas (mm) de *M. rupestris* en el estado maduro a los 90 días de su repique a bandejas de germinación, n=4, desviación estándar..... 63
- Fig. 25.** Porcentaje de brotación de meristemas de *M. rupestris* bajo la aplicación de ácido giberélico AG₃ a los 15 días de sembrados, n=4, desviación estándar..... 65



INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Anexo 1. Selección del material vegetal (ramas y frutos) de <i>M. rupestris</i> , para la propagación sexual.....	75
Anexo 2: Recolección de frutos de la especie <i>M. rupestris</i> en sus tres estados fenológicos (tierno, semi maduro, maduro).....	75
Anexo 3: Fase de laboratorio, extracción de semillas, prueba de viabilidad y siembra de las mismas.....	76
Anexo 4: Repique de plántulas hacia bandejas de germinación a los 60 días y su desarrollo transcurridos 90 días.	77
Anexo 5: Recolección de material vegetativo (ramas) de <i>M. rupestris</i> para la propagación asexual.....	78
Anexo 6: Material vegetativo (explantes de joyapa) clasificado.....	78
Anexo 7: Fase de laboratorio, extracción y siembra de meristemas, toma de datos de plántulas finales.	79



ÍNDICE DE IMAGENES

Imagen 1. Plantas de <i>Macleania rupestris</i>	75
Imagen 2. Flores de <i>M. rupestris</i>	75
Imagen 3. Frutos de joyapa estado tierno	75
Imagen 4. Frutos de joyapa estado semi maduro	75
Imagen 5. Frutos joyapa estado maduro	76
Imagen 6. Frutos maduros	76
Imagen 7. Extracción de semillas	76
Imagen 8. Prueba de viabilidad	76
Imagen 9. Siembra de semillas	76
Imagen 10. Semillas en papel absorbente	76
Imagen 11. Plántulas a los 30 días	77
Imagen 12. Plántulas a los 60 días	77
Imagen 13. Plántulas a los 90 días	77
Imagen 14. Plantas de <i>M. rupestris</i>	78
Imagen 15. Ramas de joyapa	78
Imagen 16. Ramas jóvenes	78
Imagen 17. Tamaño del explante	78
Imagen 18. Extracción de meristemas	79
Imagen 19. Siembra de meristemas	79
Imagen 20. Meristemas a los 8 días	79
Imagen 21. Meristemas a los 16 días	79
Imagen 22. Meristemas a los 24 días	80
Imagen 23. Meristemas a los 32 días	80



Imagen 24. Desarrollo de plántulas 1.....	80
Imagen 25. Desarrollo de plántulas 2.....	80



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

AG₃: Ácido Giberélico

AIB: Ácido Indolbutirico

ANA: Ácido Naftalenacetico

BAP: Ácido Bencilaminopurina

MS: Medio de cultivo (Murashige y Skoog)

WPM: Medio de cultivo (Woody Plant Medium)



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo Katherine Elizabeth Ortiz Rodríguez, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de métodos de propagación de *Macleania rupestris* (Joyapa), mediante la germinación de semillas y micropropagación de meristemas", de conformidad con el Art. 14 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 09 de septiembre de 2019

Katherine Elizabeth Ortiz Rodríguez

CI: 0302716766



Cláusula de Propiedad Intelectual

Katherine Elizabeth Ortiz Rodríguez, autora del trabajo de titulación "Evaluación de métodos de propagación de *Macleania rupestris* (Joyapa), mediante la germinación de semillas y micropropagación de meristemas", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 09 de septiembre de 2019

Katherine Elizabeth Ortiz Rodríguez

CI: 0302716766



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo Wilson Fabián Iñamagua Pandi en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de métodos de propagación de *Macleania rupestris* (Joyapa), mediante la germinación de semillas y micropropagación de meristemas", de conformidad con el Art. 14 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 09 de septiembre de 2019

Wilson Fabián Iñamagua Pandi

CI: 0106626526



Cláusula de Propiedad Intelectual

Wilson Fabián Iñamagua Pandi, autor del trabajo de titulación "Evaluación de métodos de propagación de *Macleania rupestris* (Joyapa), mediante la germinación de semillas y micropropagación de meristemas", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 09 de septiembre de 2019

Wilson Fabián Iñamagua Pandi

CI: 0106626526



AGRADECIMIENTOS

La gratitud más grande a Dios, por darnos sabiduría, fe y fortaleza durante nuestro trayecto de vida estudiantil.

A nuestros padres por su apoyo incondicional y ser nuestros pilares fundamentales en el cumplimiento de nuestras metas.

A nuestro director de tesis, Dr. Segundo Maita, excelente persona y profesional, gracias por su paciencia y conocimientos brindados en este lapso de tiempo.

A las docentes, Ing. Melida Rocano y Ing. Adriana Tenesaca, por dedicarnos su tiempo, esfuerzos y conocimientos durante la ejecución del proyecto.

Así mismo, agradecemos a INV Minerales por el apoyo brindado mediante la financiación económica para esta tesis.

Katherine O. & Wilson I.



DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, las fuerzas y la sabiduría necesaria para alcanzar una meta más en mi vida.

A mis padres José y Elizabeth, por ser para mí un ejemplo de perseverancia y responsabilidad, por sus consejos y amor incondicional que me han llevado a ser la persona que soy hoy en día.

A mis hermanas, por estar siempre presentes, acompañándome en los momentos difíciles, por su apoyo moral.

A mi novio, Christian Cedillo, por tu amor y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

Katherine O.

Dedico este trabajo de titulación a Dios por guiarme y brindarme la sabiduría en toda mi carrera Universitaria.

A mis padres Juan C. y Rosa M., por todo su amor y apoyo incondicional quienes han sido mi guía y ejemplo a seguir.

A mis hermanos Johanna, Carla y David por alegrar mi vida.

A mis tías Ernestina y Carmen por cuidarme como si fuese su propio hijo, por protegerme en todo instante, por apoyarme y aconsejarme en cada decisión que tome.

A toda mi familia por brindarme palabras de aliento y me incentivaron a culminar una meta más en mi vida.

Lisbeth Llamatumbi, por ofrecerme tu tiempo y amor en los buenos y malos momentos, gracias por todo.

Wilson I.



1. INTRODUCCIÓN

La familia Ericaceae, es una de las familias más importantes dentro de la composición florística de los bosques andinos y amazónicos, presentan una amplia distribución geográfica a nivel continental. Involucran además una familia muy diversa, presentando más de 110 géneros y alrededor de 4000 especies, localizadas en diferentes zonas templadas, frías y en ciertas regiones neotropicales. (Reyna, 2012).

En el Ecuador existen aproximadamente 22 géneros y 221 especies, se encuentran de manera principal en la región Sierra, localizadas entre los 1500 a 4100 m.s.n.m, así mismo se encuentran desempeñando diferentes papeles dentro del área ecológica, tanto como regulador de agua como fuente de alimentos y en algunos casos como fuente de ingresos para los habitantes de las diferentes regiones que han adaptado una forma de vida mediante la comercialización de estos frutos (Boni, 2016).

Una de las especies dentro de la familia Ericaceae es *Macleania rupestris* (H.B.K.) Smith conocida comúnmente como joyapa, se encuentra en la zona geográfica de Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela, calificada como especie nativa dentro de los páramos ecuatorianos (Dávila, 2001).

Desde épocas pasadas, la joyapa ha sido considerada como un producto muy poco conocido, pese a sus grandes contenidos de azúcares, antioxidantes, vitaminas y minerales que en el fruto se concentran (Santamaría, Coronel, Verdugo, Paredes, & Yugsi, 2012). En la actualidad esta planta ha ido perdiéndose debido a su disminución de hábitat natural y la gran dificultad que se presenta al momento de su propagación (Santamaría et al., 2012). Siendo esta última, catalogada como la causa principal de la carencia de protocolos con referencia a los diferentes tipos de propagación, sexual y asexual, lo cual podría ser



un obstáculo importante que se presenta al momento de introducir esta planta, ya sea como cultivo o para el uso en la recuperación de páramos, subpáramos o ecosistemas (Veloza, Durán, Magnitskiy, & Lancheros, 2014)

Aguirre et al (2007), indica que la reforestación con especies nativas constituyen una herramienta prominente para la restauración de ecosistemas degradados; sin embargo, la conservación in situ, ha sido una de las estrategias más utilizadas al momento de afrontar problemas como la pérdida de cobertura vegetal, deforestación y expansión de la frontera agrícola (Minchala et al., 2013).

Es por ello, que con el transcurso del tiempo se han venido realizado investigaciones acerca de ciertos tipos de método de propagación asexual (estacas, acodos, esquejes), para algunas especies como (capulí, cascarilla, romerillo, arrayán, duco, guaylo, limoncillo, joyapa, salapa y roble andino) donde los resultados obtenidos han sido poco satisfactorios con relación a su propagación, por este motivo, en los últimos años se ha desarrollado una nueva técnica de propagación asexual con excelentes resultados, la cual es la propagación vegetativa a partir de meristemas, la misma que se ha dado gracias a la biotecnología (Aldaz & Ochoa, 2011).

Otro método de propagación asexual utilizado en Colombia fue el mediante acodos aéreos, utilizando hormonas de enraizamiento como el ácido indolbutírico (AIB) en diferentes concentraciones (Durán, Veloza, Magnitskiy, & Lancheros, 2013).

Ante esta realidad, existe la necesidad de profundizar diferentes aspectos con el fin de expandir los grandes beneficios que esta especie puede brindar al medio ambiente.



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Evaluar métodos de propagación para *Macleania rupestris* (Joyapa), mediante la germinación de semillas y micropropagación agámica (meristemas).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar el estado fenológico del fruto (tierno, semimaduro, maduro) más adecuado para la germinación de semillas de la joyapa.
- Comparar las diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG₃) para inducir la germinación de semillas de *M. rupestris*.
- Evaluar diferentes tratamientos de AG₃ y AIB para micropropagar *M. rupestris*, a partir de meristemas.

3. HIPÓTESIS

H₀: No existe diferencia entre los estados fenológicos del fruto, para la obtención de plántulas de joyapa.

H₁: Existe diferencia entre los estados fenológicos del fruto, para la obtención de plántulas de joyapa.

H₀: Ninguna de las concentraciones de AG₃, muestra diferencia significativa en la inducción de la germinación de las semillas de joyapa.

H₁: Una de las concentraciones de AG₃, muestra diferencia significativa en la inducción de la germinación de las semillas de joyapa.

H₀: Ninguno de los tratamientos (AG₃, AIB), ayuda a la micropropagación de *M. rupestris*, a partir de meristemas.

H₁: Uno de los tratamientos (AG₃, AIB), ayuda a la micropropagación de *M. rupestris*, a partir de meristemas.



4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Descripción de la familia Ericaceae

Las Ericáceas que se encuentran presentes en el Neotrópico, se concentran principalmente en las zonas montañosas del noroeste de Sur América, en los países de Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela, de manera especial en los bosques húmedos, las especies de esta familia se encuentran entre los 1500 y 3000 m de altura. Pueden soportar, además, temperaturas inferiores a -6 °C. La mayoría de estas especies presenta un tipo de crecimiento epifito (Dávila, 2001).

Dentro del Ecuador existen 22 géneros y 221 especies aproximadamente, esta familia se encuentra catalogada como una de las familias que mayor endemismo presenta dentro del Ecuador, donde el 44% de especies son endémicas del país, siendo *Pernettya howellii* la única especie de esta familia que se encuentra presente en Galápagos (Pedraza, Valencia, Montúfar, & Santiana, 2018)

Desde el punto de vista ecológico poseen flores con corolas grandes, tubulares y de colores brillantes, que brindan importancia como suministro de néctar para los diferentes tipos de aves, de manera principal para los colibríes (Olaya, 2012)

Además, las especies nativas de esta familia durante algunos siglos han sido consideradas como alimento para ciertas comunidades andinas, como es el caso de (Kichwa de la Sierra-Cañar,) quienes utilizaban el fruto y la flor para la elaboración de mermeladas de manera artesanal, sin embargo existe un porcentaje muy bajo de especies que han sido calificadas como especies domesticadas, tal es el caso del mortiño (*Vaccinium floribundum*) (Evans & Vander, 2010).

Las plantas que pertenecen a esta familia, se caracterizan por la capacidad de establecer simbiosis con un tipo de micorrizas propias de esta especie, llamadas micorrizas ericoides, estas micorrizas actúan como acelerador del crecimiento, por lo que pueden brindar plantas con mayor vigor (Alarcón & Ferrera, 1999), y a la vez, brindan a estas especies la capacidad de colonizar suelos poco nutritivos y poco evolucionados (Vega & Muñoz, 1994).



4.2 Descripción de la especie *Macleania rupestris*

Es una de las principales especies frutales no domesticada, perteneciente a la familia Ericaceae. Estas especies tiene gran importancia, principalmente en la producción de sus frutos donde su función es servir como alimento tanto para personas como para animales (Durán, Veloza, Magnitskiy, & Lancheros, 2013).

Es considerada como una planta silvestre, pertenece a los ecosistemas de páramo y sub páramo, se adapta a altitudes que van desde los 1500 a 4100 m.s.n.m aproximadamente. Caracterizada además, como una especie epífita perenne o terrestre, presenta baja demanda de fertilidad del suelo, se encuentra predominando en suelos pedregosos, superficiales, bien drenados y que presenten pH ácidos (Veloza, Durán, Magnitskiy, & Lancheros, 2014).

En el Ecuador, esta especie se encuentra de manera principal en la Sierra, en su estado natural y es conocida como una especie nativa (Loor, Cazar, & Cuenca, 2014).

En Colombia se ha registrado que la principal época de cosecha es entre los meses de marzo a mayo y en septiembre y noviembre en épocas de invierno (Olaya, 2012)

Así mismo en Colombia, *M. rupestris*, ha enfrentado un problema que con frecuencia afecta a sus hojas, flores y fruto, esto ocasionado por hongos que deterioran el aspecto y sus condiciones de buena calidad (Gutiérrez, 1991).

4.3 Morfología de la especie

M. rupestris es un arbusto perenne de aproximadamente tres metros de altura, se distingue por presentar flores con sépalos cortos (Altieri et al., 2010). Según Olaya (2012) las flores se forman en los ejes secundarios y no presentan desarrollo de flor terminal.

Estas flores se caracterizan por su atractivo color rojizo y su forma tubular, sus corolas pueden alcanzar hasta 4 cm de largo (Veloza et al., 2014).

Sus frutos son considerados como bayas comestibles de color morado a negro o rosados, estos miden de 10 a 12 mm de diámetro (Reyna, 2012), y su peso se encuentra entre los 2,6 gramos, siendo el promedio de frutos por racimo de 28, cada fruto puede contener hasta 150 semillas pequeñas. Así mismo, en este estado, las bayas alcanzan los 12.2 °Brix y una acidez de aproximadamente 0,43 % de ácido cítrico (Veloza et al., 2014).



En cuanto a la producción de *M. rupestris* en Colombia esta puede alcanzar hasta los 1960 kg/ha por año aproximadamente, en un tipo de siembra de cuatro por cuatro metros (625 árboles/ha) (Malagón & Ussa, 2002)

4.4 Características nutricionales

Tanto el fruto como las hojas presentan altos contenidos de vitamina C, así como: taninos y ácido benzoico. En el caso del fruto, cuando este alcanza su grado de madurez, posee ácido ascórbico, niacina y riboflavina, compuestos que le otorgan un potencial nutracéutico (Corzo, 2014).

Además, Veloza et al., (2014), informan que el racimo de frutos de joyapa presentan altos contenidos de fibra (2,65%) y cada fruto puede llegar al 4% de proteína, así mismo bajos contenidos de lípidos (0,05%).

Según García (1975), los frutos de la joyapa son utilizados por medio de la extracción de su néctar en la elaboración de mermeladas, tortas, salsas, vinos que presentan un alto poder laxante.

En Colombia los sépalos de *M. rupestris* también son usados en la preparación de mermeladas de tipo artesanal (Veloza et al., 2014).

Por otro lado, en cuanto al ámbito medicinal, es utilizado contra la disentería, diarreas crónicas y como astringente (Corzo, 2014).

4.5 Métodos de propagación

La propagación de plantas, involucra la aplicación de principios biológicos, mismos que se encuentran dirigidos hacia la multiplicación de plantas útiles de un genotipo específico. Este proceso se puede realizar a través de propágulos o cualquier parte de la planta que sirva para la producción de una nueva población. Los propágulos, pueden incluir semillas, segmentos de tejido, yemas, explantes, esquejes o estacas, y a la vez, diversas estructuras como bulbos, cormos o tubérculos (Osuna, Osuna, & Fierro, 2016)

Existen varias alternativas de propagación de plantas: entre las principales, se pueden encontrar: el método sexual a través de semillas y el método asexual mediante tejidos vegetales.



Por otro lado, para el caso de las especies frutales, la mayoría de ellas, poseen beneficios en cuanto a la simbiosis micorrízica, donde el principal beneficio que aporta esta simbiosis a las plantas está dado por la actividad del micelio externo del hongo, ya que posee mayor capacidad de absorción de los nutrimentos del suelo mediante la red de hifas que el hongo genera. De esta forma, la actividad del micelio contribuye en la función de la raíz cuando los nutrimentos de la zona del suelo adyacente están agotados (Alarcón & Ferrera, 1999)

Estos hongos son aplicados de manera principal en ciertos sistemas que requieren de una fase de vivero antes de ser liberados a campo. Es por esto que las especies de la familia Ericaceae, gozan de la capacidad de establecer simbiosis con un tipo de micorrizas propias de esta especie, llamadas micorrizas ericoides (Alarcón & Ferrera, 1999).

4.6 Propagación sexual

La propagación sexual, es una técnica muy conocida y utilizada por los beneficios económicos que esta puede brindar, es decir al momento de la obtención del material vegetativo, en este caso las semillas a nivel comercial resultan económicas y en su mayoría fáciles de conseguir, lo que no se puede afirmar en el caso de semillas silvestres. Sin embargo, al momento de obtener resultados, este material no conserva las características de la planta madre, pero es importante, porque con este método se mantiene la diversidad genética de las especies forestales en sus diferentes ambientes naturales (Minchala et al., 2013)

Para este tipo de propagación, las semillas deben someterse a ciertos tratamientos culturales como la caracterización morfológica y fisiológica de la semilla, curva de imbibición, prueba de vigor y prueba de viabilidad para poder obtener altos porcentajes de germinación (Correa & Jácome, 2015).

Con relación a *M. rupestris*, Boni (2016) menciona que, la germinación de estas en condiciones de invernadero es rápida considerando un buen estado de madurez, pero la tasa de crecimiento de plántulas es lento.

Cardozo (2005) reportó, que la propagación sexual de semillas de joyapa inicia a partir de la tercera semana pudiendo alcanzar hasta el 85% de germinación a los 30 días, sin embargo, el crecimiento de las plántulas es lento, de igual manera menciona la presencia



de protoclorofila lo que genera comportamientos fotoblastico positivos durante el periodo de germinación (Veloza et al., 2014).

La forma de propagación más conocida para muchas especies vegetales, es la propagación sexual; pese a la existencia de ciertas limitaciones, incluso para algunas semillas de especies consideradas viables han resultado incapaces de germinar, denominando a esta característica como latencia, mecanismo de supervivencia a condiciones adversas del clima (Saldivar, Laguna, Gutiérrez, & Domínguez, 2010).

4.7 Propagación asexual

Se puede describir la propagación asexual o vegetativa como uno de los métodos de propagación más utilizados al momento de multiplicar especies, esto se realiza mediante el uso de partes vegetativas separadas de una planta, utilizando condiciones ambientales favorables para la regeneración de las mismas, dando lugar al origen de nuevas plantas con características similares a las de la planta madre. Los principales partes que se utilizan para la multiplicación asexual son: los tallos, hojas o raíces. La propagación vegetativa es considerada además, como el único método que garantiza la caracterización deseada de un cultivar superior, de manera especial cuando es heterocigoto y poliploide (Braha & Rama, 2016).

Las variables a tener en cuenta para una respuesta óptima a este método son: la posición en la planta donadora, estado fisiológico y tener en cuenta el objetivo al que se desea llegar (Afanador, 2005)

Este método de propagación se fundamenta en la totipotencia celular, que es la capacidad de generar réplicas idénticas del individuo (Malajovich & Soares, 2013)

Según Levitus et al. (2010) indica que la micropropagación presenta cinco etapas:

- Preparación de material vegetal.
- Establecimiento del cultivo.
- Desarrollo y multiplicación de celular.
- Enraizamiento.
- Aclimatación de las plántulas.



Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden desarrollarse en condiciones *ex vitro*.

La preparación del material vegetal es indispensable para dar respuesta a los principales problemas que afectan el establecimiento del cultivo, como es el caso de la contaminación con microorganismos y la oxidación del material vegetal. Para obtener una mejor respuesta en la micropropagación se recomienda usar órganos jóvenes (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010)

En el momento de la recolección del material vegetal en campo, se sugiere que estas se encuentren en brotación activa de yemas, con el fin de evitar yemas en estado de dormición, ya que pueden ocasionar problemas de contaminación. Con la finalidad de adquirir un explante de calidad es conveniente hacer crecer las plantas donantes por un tiempo mínimo en condiciones de invernáculo. De esta forma es posible influir directamente sobre el estado sanitario y la calidad de los explantes mediante el control de la intensidad lumínica, temperatura y reguladores de crecimiento (Levitus et al., 2010).

El objetivo de la etapa de establecimiento del cultivo es obtener un cultivo de material vegetal libre de contaminantes, para ello se debe tener presente el momento de la selección, aislamiento y esterilización; estos explantes deberán desarrollar crecimiento e igualmente presentar un alto índice de supervivencia y libre de contaminantes (George & Debergh, 2008).

En la etapa de desarrollo y multiplicación de embriones, se trata de mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación que se usará en la posterior etapa de producción (enraizamiento). Los principales factores a tener en cuenta son; medio de cultivo, reguladores de crecimiento como auxinas, citoquininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento ya que estas juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

La etapa de enraizamiento se puede realizar tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento para promover la rizogénesis.



Esta etapa se da cuando se tiene los cultivos necesarios para garantizar una cantidad determinada de plántulas *in vitro*. Los explantes ya propagados se dejan crecer, formar hojas por un periodo de tiempo y posteriormente son cambiados a un nuevo medio de cultivo en el cual se puede implementar auxinas con el fin de inducir la formación y desarrollo de raíces. Generalmente las citoquininas se reducen o desaparecen en esta etapa al final deberá quedar formada completamente la vitroplantas (González, Lozano, & Rojas, 2004).

Es por esto, en la actualidad se ha venido evaluando diferentes métodos de propagación asexual para *M. rupestris*, mediante el uso de acodos aéreos, técnica que consistió en seleccionar ramas vigorosas y anillarlas, luego la aplicación de ciertos tipos de hormonas que ayude de una u otra manera al enraizamiento de estas, en el área de anillado, sin embargo los resultados obtenidos no fueron satisfactorios (Durán et al., 2013).

4.8 Tejidos meristemáticos

Son células que tienen como función principal la división ordenada que promueven el crecimiento de la planta, denominados como tejidos jóvenes, estos se clasifican según la ubicación que las células presenten, en este caso pueden ser: meristemas apicales y laterales. Además, los tejidos meristemáticos proporcionan varias características, como: crecimiento en altura, ensanchamiento o agrandamiento celular, en el caso de las hojas, también se podría encontrar éste tipo de tejido, además que se relacionan más con tejidos laterales, mismos que permiten la formación de tejidos conectivos (Acevedo, 2015).

4.9 Meristemas apicales

Conocidos también como meristemas primarios, estos se localizan en el ápice de los tallos y las raíces. Están formados por células muy pequeñas, en algunos casos pueden presentar formas isodiamétrica, núcleos grandes y carecen de vacuola central. Las paredes tienen una textura muy fina y constan de protopectina, pero carecen de celulosa. La diferenciación de los meristemas apicales originan tejidos primarios (Ram, 2016).

4.10 Medios de cultivo

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de diferentes nutrientes y agua. Puede incluir sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos y azúcares, en el caso de este último, es utilizado para las plantas que no son completamente autotróficas



y esto se da cuando se desarrollan en condiciones *in vitro*. Como resultado se origina el llamado, Medio Basal mismo que en ciertos casos puede ser suplementado con reguladores de crecimiento u otras sustancias. Los nutrientes son parte esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Blanco, 2008)

4.11 Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog)

Considerado como el medio de cultivo más exitoso al momento de una propagación *in vitro* y del cual se derivan los medios. Murashige (1982) explicó acerca de los beneficios que presentan las concentraciones de sales minerales al momento de estimular el enraizamiento, formación de yemas, hojas y la longitud de las plantas *in vitro*.

Este medio presenta un tipo de formulación básica que sirve como fuente de nutrientes para una gran variedad de plantas, constituido por macro y micro nutrientes, así, como un alto contenido de sales (Manrique & Caballero, 2009).

Sin embargo, la disminución de concentraciones de los nutrientes que conforman el medio de cultivo, así como la disminución de sales de hasta un 25% favorece al control del crecimiento y desarrollo de las plantas (Jiménez, Silva & Borges, 2016).

4.12 Medio de Cultivo WPMm

El medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM), es utilizado en el cultivo de plantas leñosas por su baja concentración en sales NH_4^+ (5 mM), NO_3^- (9.7 mM) y Cl^- (1.3 mM) ya que al contener altas concentraciones de sales como es el caso del medio MS generaría toxicidad en especies leñosas. Parada y Villegas (2009) afirman que el CaCl_2 es considerado tóxico para especies leñosas, motivo por el cual reformularon el medio WPM como WPMm (Martínez, et al., 2015).

4.13 Biorreguladores

Como uno de los mayores desafíos que enfrenta la agricultura hoy en día, es el desarrollo de sistemas sostenibles con el medio ambiente, enfrentando la necesidad de alimentar a la población mundial, con el objetivo de aumentar el rendimiento de los cultivos y proteger lo que se produce (Serna, Hurtado, & Ceballos, 2017).

Es por esto que Talaat, Khattab, & Ahmed, (2014) expresan que entre las soluciones más innovadoras para enfrentar este tipo de desafíos consiste en el uso de reguladores de



crecimiento, conocidos como sustancias orgánicas que inhibe o promueven los procesos celulares de división, alargamiento, proliferación de los vegetales, normalmente sintéticas, que controlan el crecimiento de plantas (Serna et al., 2017).

4.14 Ácido Giberélico (AG₃)

Las giberelinas en general, son clasificadas como fitorreguladores o conocidas también como hormonas, se encargan de regular el crecimiento vegetal en diferentes procesos metabólicos, estas actúan como promotores de la regulación enzimática en el proceso de germinación, esto se da principalmente en las partes jóvenes de las plantas como, raíces, frutos y semillas (Rodríguez, Antana, Rmando, & Amos, 2010).

El Ácido giberélico se encuentra relacionado de manera directa en el control de la germinación de las semillas, tiene la capacidad de romper la latencia de ciertos tipos de semillas y a la vez puede reemplazar la necesidad de estímulos ambientales como la luz y la temperatura (Saldívar, Laguna, Gutiérrez, & Domínguez, 2010).

Entre las principales funciones que cumple el AG₃, las giberelinas promueven el crecimiento celular debido a que incrementan la hidrólisis de almidón, fructosa y sacarosa, dando origen a moléculas de fructuosa y glucosas, mismas que proporcionan energía vía respiración y convierten el potencial hídrico más negativo, favoreciendo que el agua ingrese con mayor rapidez (Pinilla, n.d.)

Sin embargo, según un estudio realizado por Núñez y Davenport (1994), afirma que, el AG₃, retrasa la iniciación de primordios florales en yemas que se desarrollan en condiciones que promueven la floración (Vazquez, 2006)

4.15 Ácido indolbutirico (AIB)

Las auxinas pertenecen al grupo de las fitohormonas que tienen como función principal, el regular el crecimiento, provocando así mismo, el crecimiento por división o elongación de las células, estas participan activamente en el desarrollo de la raíz embrionaria y pos embrionaria, así como también en el gravitropismo (Sanchez et al., 2009)

El ácido indolbutirico (IBA) es un fitorregulador auxínico sintético comúnmente utilizado por la estabilidad que este ha presentado en diferentes estudios realizados, donde



se ha considerado como un elemento principal, ya que es muy resistente a la oxidación por ciertos factores como son: la luz, enzimas u otros agentes. Uno de los principales usos de las auxinas, está en la multiplicación asexual de plantas, sea por estacas, esquejes, u otros. Él IBA es la auxina más utilizada ya que presenta gran estabilidad y poca movilidad y su aplicación promueve diferenciación de raíces (Latsague, Sáez, & Yáñez, 2009).

Un estudio realizado por Aramendiz & Cardona (2005), presentó buenos resultados al momento de utilizar AIB y ANA (Ácido Naftalenacetico) en diferentes concentraciones, para el enraizamiento de esquejes de caña flecha (*Gynerium sagittatum Aubl*), donde los tratamientos más altos: 2000 mg L de AIB, propició el mayor número de raíces por estaca, de igual manera, en el caso de ANA a 400 mg L y AIB + ANA a 1200 mg L se lograron obtener un 100% de estacas enraizadas, frente al testigo que tuvo un 75 % de enraizamiento.

5. METODOLOGÍA

5.1 Área de estudio

El proyecto se desarrolló en los laboratorios de Semillas y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. El laboratorio de semillas se encuentra ubicado en el Campus Yanuncay, mientras que el de Biotecnología está ubicado en la granja “El Romeral”, parroquia Guachapala, cantón Guachapala provincia del Azuay.

El material vegetal (frutos, ramas y plantas de *M. rupestris*) se obtuvo de la comunidad de Zhipta, parroquia Jima, cantón Sigsig, provincia del Azuay con coordenadas -3.2234, -78.9304, esta comunidad se encuentra a una altura que varía de entre los 2.600 y 3.400 m.s.n.m. presentando además, dos vías de ingreso a la parroquia Jima, la primera: la Cumbe- San Vicente (Vía lastrada) y la segunda Cumbe- Tinajillas (Vía Loja). (Fig.1)

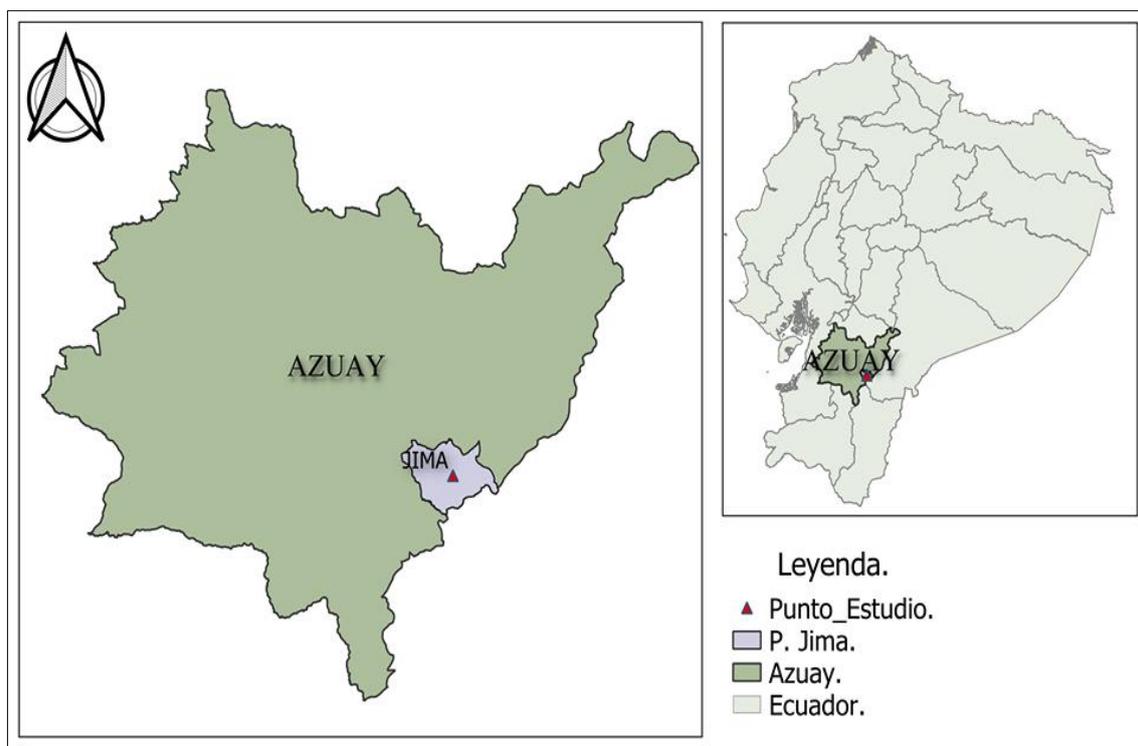


Fig. 1. Mapa de ubicación geográfica de la provincia del Azuay, la parroquia Jima, comunidad de Zhipta

5.2 Propagación sexual

5.2.1 Recolección de frutos

Los frutos fueron recolectados de plantas silvestres de *M. rupestris*, en sus dos primeros estados fenológicos (tierno, semi maduro), (Fig.2) mismas que presentaban condiciones óptimas (libre de daños físicos, mal formaciones). Transcurridos 30 días, se realizó nuevamente la recolección de frutos de joyapa, en su tercer estado fenológico (maduro) (Fig.2) Estos fueron llevados al laboratorio para la extracción de semillas.

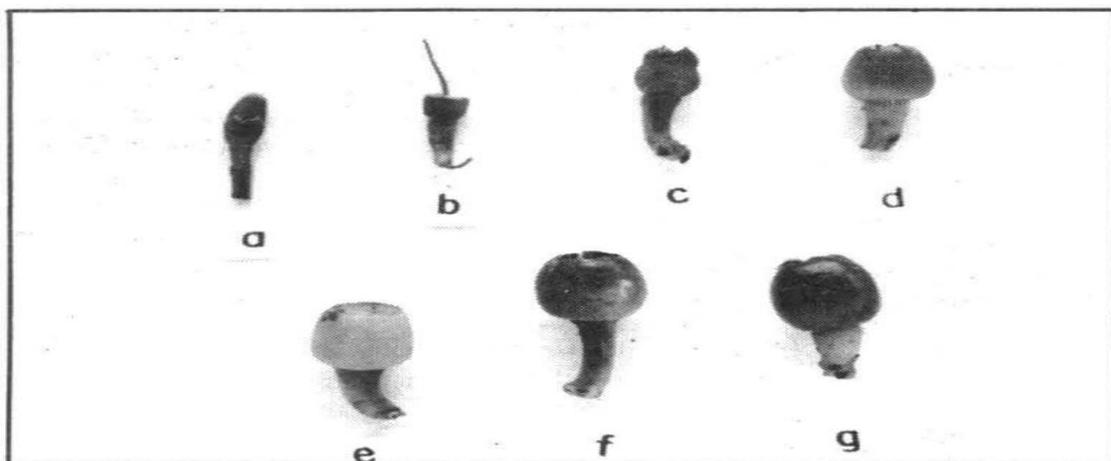


Fig. 2. Etapas del desarrollo del fruto de joyapa (*M. rupestris*): (a) Capullo floral (b) flor (c) Estadio inicial del desarrollo; (d) fruto de 8-9 mm diámetro; (e) fruto de 12 mm diámetro; (f) Semimaduro; (g) fruto Maduro.

Fuente: (Valencia & Carillo, 1991)

5.2.2 Desinfección de semillas

Como primer paso, se realizó un lavado de las semillas, utilizando jabón líquido con suficiente agua destilada, repitiendo este proceso tres veces. Posteriormente las semillas fueron sumergidas en alcohol al 5% por un lapso de tiempo de 3 minutos, inmediatamente fueron enjuagadas con agua destilada, este método de desinfección fue establecido a través de un previo ensayo realizado.

5.2.3 Preparación del Ácido Giberélico

Se procedió a la preparación de las seis concentraciones de AG₃ incluido el control (0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm). Para este caso el ácido que se utilizó fue el AG₃ comercial con una concentración del 10%, este se diluyó en 500 ml de agua destilada para todos los casos.



Luego, las semillas fueron sometidas a los diferentes tratamientos por 24 horas, para posteriormente ser sembradas.

5.2.4 Siembra

Transcurrido el tiempo de inmersión de las semillas estas fueron colocadas en cajas petri previamente esterilizadas, preparadas con papel absorbente humedecido en su totalidad con agua destilada. Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones de 25 semillas cada una. Dando un total de 100 semillas por tratamiento, 600 semillas por fase fenológica y de 1800 semillas para todo el proyecto (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de AG₃ utilizadas en la propagación sexual de *M. rupestris*.

Estados Fenológicos	Concentraciones por estado fenológico
Tierno	C0 (0 ppm)
	C1 (200 ppm)
Semimaduro	C2 (400 ppm)
	C3 (600 ppm)
Maduro	C4 (800 ppm)
	C5 (1000 ppm)

5.2.5 Germinación

A partir de la segunda semana de realizada la siembra, se pudo observar la ruptura de testa y la presencia de hojas, iniciando así el porcentaje de germinación en sus diferentes estados fenológicos.

5.2.6 Repique de plántulas

Finalmente las plántulas obtenidas en las cajas Petri durante un periodo de 60 días, fueron repicadas a bandejas de germinación, los parámetros que se utilizaron para la determinación de para lo que se utilizó, turba “Berguer BM2” como sustrato, misma que presentó un pH de inoculación de 5.2 a 6.0, entre sus principales ingredientes (musgo de turba, perlita, vermiculita, piedra caliza, humectante no iónico, carga inicial de fertilizantes estándar), en esta etapa se mantuvieron por 90 días más.

5.2.7 Sombreado

Las bandejas de germinación fueron colocadas en un espacio que presentaba poca luminosidad dentro del laboratorio de semillas y fueron cubiertas con plástico de color



transparente con soportes de madera, a manera de pequeños invernaderos, esto con el objetivo de regular la temperatura y mantener la humedad de las plántulas.

5.2.8 Cuidados culturales

5.2.8.1 Riego

Durante el primer mes de germinación de plántulas en cajas petri, el riego se realizó cada dos días con agua destilada en las primeras horas del día. Posteriormente desde el segundo mes el riego se lo realizaba según la necesidad que presentaban las plántulas. Una vez repicadas a bandejas de germinación estas plántulas fueron regadas con agua simple según su necesidad.

5.2.8.2 Limpieza de material en descomposición

Esta práctica se llevó a cabo durante los 60 días de germinación en las cajas Petri dentro del laboratorio, ya que un porcentaje de plántulas de ciertos tratamientos mostraron inicios de pudrición (cambio de coloración, necrosis en su totalidad).

5.3 Propagación asexual

5.3.1 Recolección del material vegetativo

La recolección del material vegetal (ramas), se realizó de plantas seleccionadas, en las primeras horas de la mañana, esto con el objetivo de evitar pérdidas de agua durante las horas de máxima insolación. Se tomaron ramas sanas, jóvenes, libres de daños mecánicos o presencia de enfermedades, para esto se utilizó como principal indicador su coloración (rojiza), que en este caso fueron las que presentaron mayor cantidad de brotes vegetativos. Luego las ramas fueron llevadas en fundas de plástico y envueltas en papel periódico humedecido hasta el laboratorio de biotecnología.

5.3.2 Desinfección del material

Torres, Trujillo, & Arahana, (2010) realizaron un estudio en mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) especie de la familia Ericaceae, donde utilizaron alcohol al 70% e hipoclorito de sodio de sodio (NaCl) al 2.5% por 10 minutos para la etapa de desinfección. Basados en esta metodología, se pudo acoplar un protocolo propicio para la desinfección de nuestra especie.



Los explantes que se utilizaron para el estudio fueron apicales, debido a que ensayos antes realizados con yemas axilares no mostraron resultados positivos, las yemas apicales fueron lavadas inicialmente de manera superficial (chorro de agua) por 5 minutos, se utilizó jabón líquido y se procedió a enjuagar con agua destilada hasta que no haya quedado residuos de jabón. Luego, dentro de la cámara de flujo, se procedió a sumergir los explantes en alcohol al 70 % por 1 minuto, pasaron a hipoclorito de sodio (NaCl) al 1,0 % por 3 minutos y nuevamente los explantes fueron sumergidos en alcohol al 70 % por 1 minuto, finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada, bajo condiciones de asepsia en el laboratorio.

5.3.3 Preparación del medio de cultivo (MS)

Cave aclara que al iniciar este paso se procedió a utilizar el medio previamente preparado con cuatro diferentes concentraciones de AG₃, incluido el control (0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm) esto con el objetivo de poder determinar cuál de estas concentraciones resultaría benéficas para la propagación de meristemas, pero los resultados que se obtuvieron fueron negativos.

Por lo cual nos basamos en la metodología que utilizaron Torres et al., (2010) con ciertas modificación. Se trabajó con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) a la mitad de su concentración en sales, el medio fue enriquecido con dos hormonas AG₃ (0,5 mg/l) y BAP (1 mg/l) presentó un pH de 5,5 lo cual es considerado como un pH propicio para trabajar, finalmente se dispenseo 5 ml del medio en tubos de ensayo.

5.3.4 Siembra de meristemas

Para la siembra se procedió a la delimitación de yemas apicales, donde utilizando el estéreo microscopio se fueron extrayendo los primordios foliares hasta llegar al meristema, mismo que se caracterizaba por presentar una tonalidad clara semi transparente.

La siembra de meristemas se realizó dentro de la cámara de flujo, se agregaron 3 gotas de estreptomicina a los mismos, esto para evitar la contaminación por bacterias, luego fueron colocados en los tubos de ensayo y sellados de manera segura, para posteriormente



ser llevados hacia el cuarto de germinación que presentó ciertas condiciones favorables para su establecimiento (aproximadamente 10 horas del día, a una temperatura de 19 °C).

5.3.5 Repique de meristemas

A los 8 días de realizada la siembra, se procedió a realizar un refrescamiento nuevamente de los meristemas prendidos, en un medio de cultivo (MS) enriquecido con dos hormonas AG₃ (0,5 mg/l) y Ácido Bencilaminopurina (1 mg/l) ya que se observó decoloraciones, así como disminución en su desarrollo, por este motivo, el proceso se repitió cada 8 días durante 3 semanas consecutivas.

A la cuarta semana de realizado el último repique de los cuatro meristemas prendidos, estos fueron repicados a un medio de cultivo (MS), mismo que contenía AIB (Ácido Indolbutírico) a una concentración de 1 mg/l, lo que originó resultados negativos.



6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Propagación sexual

Para la propagación sexual se aplicó un DCA (Diseño Completamente al Azar) presentando como factores de evaluación los tres estados fenológicos (tierno, semi maduro, maduro) con seis tratamientos de AG₃ y cuatro repeticiones de 25 semillas cada una.

Se realizó un análisis de varianza (ADEVA) y para el análisis del nivel de significancia se utilizó la prueba de Tukey al 5 %. Para aquellos datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad se aplicó pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis).

6.2 Propagación asexual

Para la propagación asexual se realizó una prueba no paramétrica (U de Mann-Whitney), donde se evaluaron dos muestras independientes (Testigo, Concentración de AG₃).

6.3 Variables analizadas

6.3.1 Propagación sexual

- Número de semillas germinadas a los 30 días y 60 días (conteo visual).
- Longitud de raíz y tallo a los 30 y 60 días de la germinación (escalimetro digital).
- Altura de plántulas a los 90 días (escalimetro digital).
- Cantidad de materia seca a nivel foliar y radicular a los 90 días (estufa).

6.3.2 Propagación asexual

- Número de meristemas prendidos por tratamiento de AG₃ (conteo visual).
- Altura plántula por tratamiento (escalimetro digital).
- Número de yemas enraizadas por tratamiento (AIB).

7. RESULTADOS

7.1 Propagación sexual (semillas)

7.1.1 Porcentaje de germinación de semillas de *M. rupestris* (Joyapa) según sus estados fenológicos a los 30 y 60 días.

Mediante la aplicación de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se pudo observar que no existen diferencias estadísticas significativas entre los estados fenológicos evaluados tanto a los 30 como 60 días.

Sin embargo, cabe recalcar que el estado semi maduro fue el que presentó mejor respuesta al momento de germinación. Mostrando para los 30 días los siguientes resultados: estado semi maduro 44,13% (DE= 1,45) estado maduro 42,77% (DE= 3,91) y estado tierno 41,10% (DE= 2,08) (Fig. 3).

La tendencia se mantuvo a los 60 días, durante el cual el estado semimaduro mostro mayor porcentaje de germinación 41,53% (DE= 9,55) seguido por el estado maduro 39,98% (DE= 14,62) y el estado tierno 37,18% (DE= 8,56) (Fig. 3).

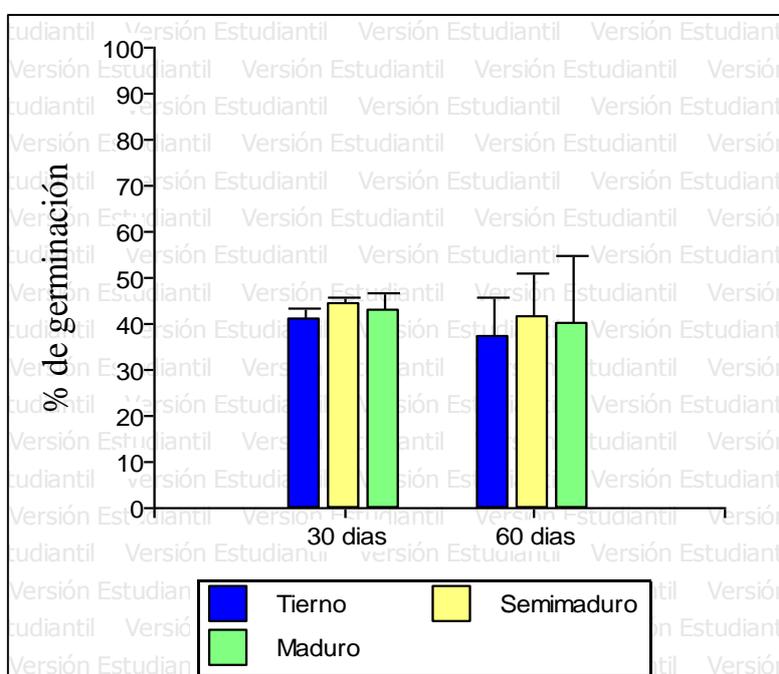


Fig. 3. Porcentaje de germinación de semillas de *Macleania rupestris* en los diferentes estados fenológicos a los 30 y 60 días, n=4, desviación estándar.

7.1.2 Porcentaje de germinación de semillas de *M. rupestris* bajo el efecto del Ácido Giberélico (AG₃).

7.1.2.1 Germinación de semillas bajo tratamientos de AG₃, estado tierno a los 30 días.

Se pudo observar mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$) que las siguientes concentraciones, 400 ppm 84,23% seguido de 800 ppm 77,94% y 600 ppm 74,93% registraron los mejores porcentajes de germinación a diferencia del control, el cual presentó el porcentaje más bajo 39,77% presentando así diferencia estadística (Fig. 4).

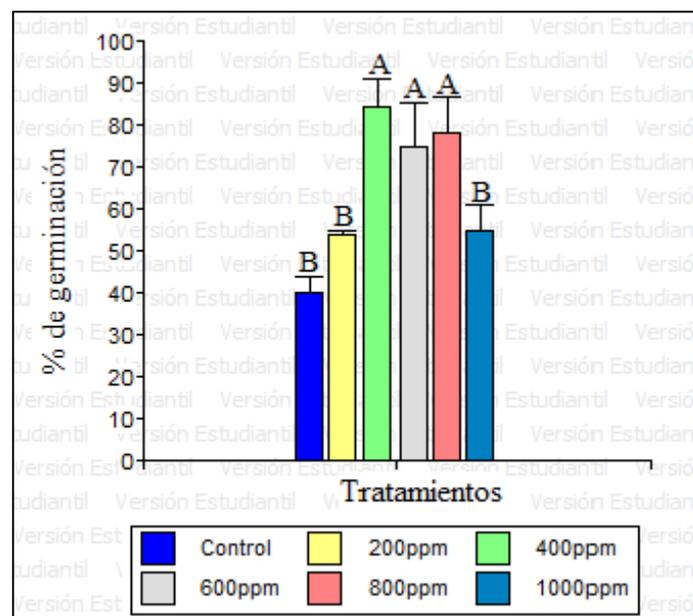


Fig. 4. Porcentaje de germinación de semillas de *M. rupestris* en el estado tierno a los 30 días, $n=4$, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos de ácido giberélico AG₃ aplicados.

7.1.2.2 Germinación de semillas bajo tratamientos de AG₃, estado semi maduro a los 30 días.

La prueba de Tukey ($p < 0,05$) aplicada para este estado fenológico, identificó como mejores concentraciones de AG₃ a, 400 ppm 56,71% 600 ppm 54,89% y 1000 ppm 52,65% mismas que presentaron los mayores porcentajes de germinación frente al control que mostró el porcentaje más bajo 42,39% mostrando diferencias estadísticas (Fig. 5).

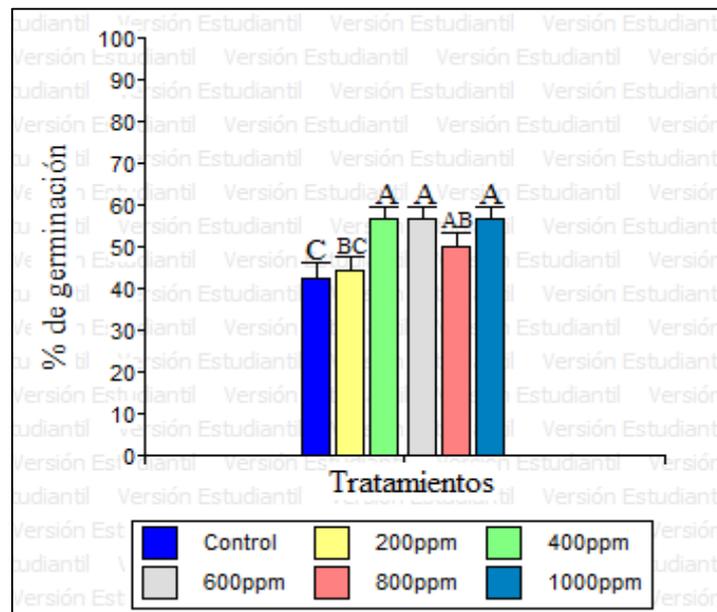


Fig. 5. Porcentaje de germinación de semillas de *M. rupestris* en el estado semi maduro a los 30 días, $n=4$, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos de ácido giberélico AG₃ aplicados.

7.1.2.3 Germinación de semillas bajo tratamientos de AG₃, estado maduro a los 30 días.

Mediante la aplicación de la prueba de Tukey ($p < 0,05$) para el estado fenológico maduro, se obtuvo como mejor concentración la de 200 ppm 64,68% ya que mostró el porcentaje más alto de germinación a comparación de las concentraciones de 800 ppm 36,25% seguida del control 39,53% y de 1000 ppm 40,27% las cuales fueron los porcentajes más bajos al momento de la germinación, mostrando diferencias estadísticas (Fig. 6).

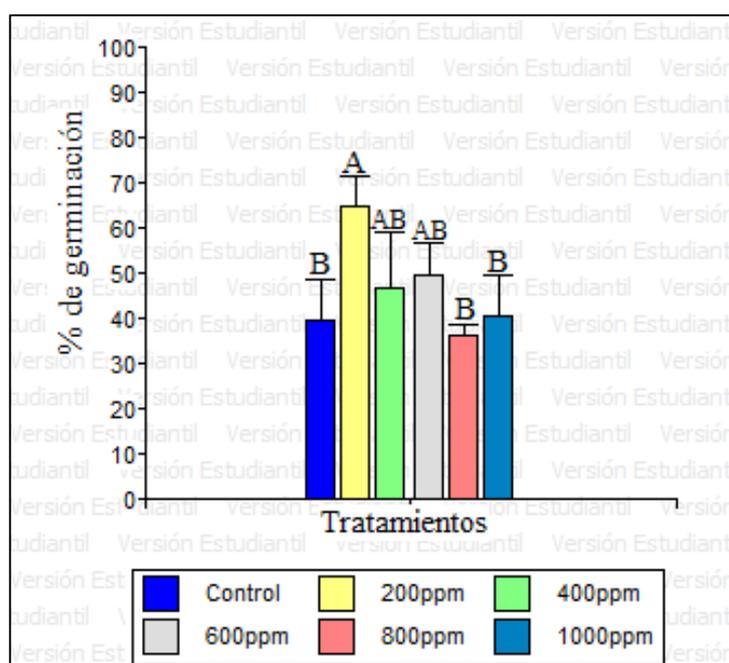


Fig. 6. Porcentaje de germinación de semillas de *M. rupestris* en el estado maduro a los 30 días, $n=4$, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos de ácido giberélico AG₃ aplicados.

7.1.3 Porcentaje de germinación de semillas bajo el efecto del Ácido Giberélico (AG₃)

7.1.3.1 Germinación de semillas bajo tratamientos de AG₃, estado tierno a los 60 días

A través de la prueba de Tukey ($p < 0,05$) aplicada para esta variable, se pudo identificar como los mejores resultados a las siguientes concentraciones: 400 ppm 73,23 % seguida de 800 ppm 69,07% y 600 ppm 59,74%, a diferencia del control 37,18% que fue el tratamiento que presentó el menor porcentaje de germinación, mostrando diferencias estadísticas (Fig. 7).

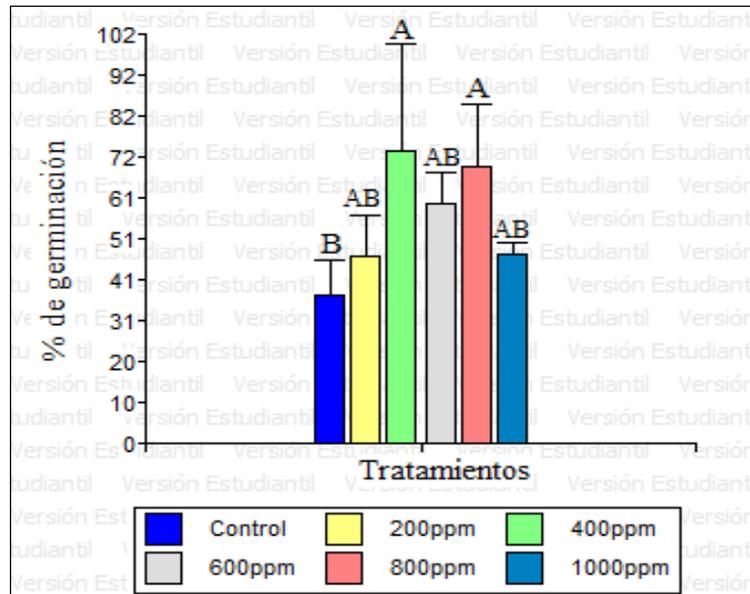


Fig. 7. Porcentaje de germinación de semillas de *M. rupestris* en el estado tierno a los 60 días, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos de ácido giberélico AG₃ aplicados.

7.1.3.2 Germinación de semillas bajo tratamientos de AG₃, estado semi maduro a los 60 días

Como se pudo apreciar para el análisis del estado fenológico semi maduro, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($H(5) = 16,12, p < 0,05$). Donde las concentraciones de AG₃ que mejores resultados presentaron fueron: 1000 ppm (51,18%) 400 ppm (51,17%) y 200 ppm (48,47%) a diferencia del control (38,05%) y 800 ppm (35,35%) que mostró los resultados más bajos mostrando diferencias estadísticas (Fig. 8).

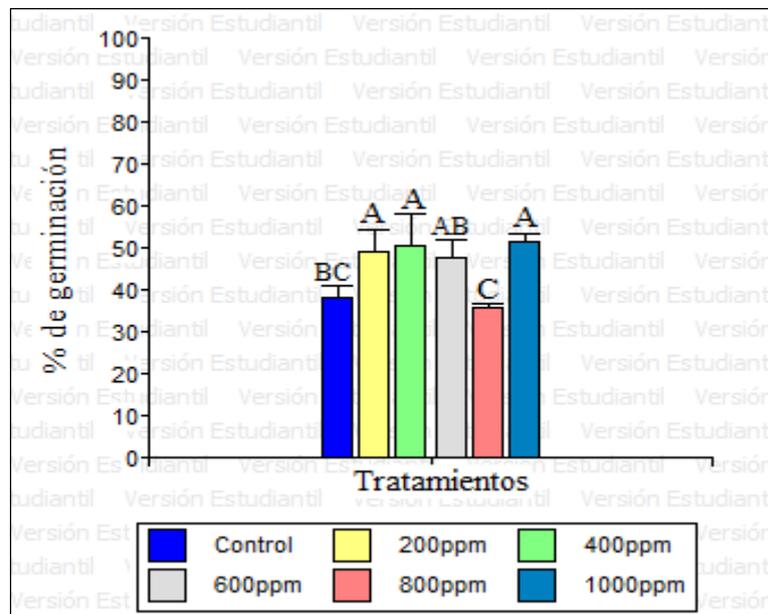


Fig. 8. Porcentaje de germinación de semillas de *M. rupestris* en el estado semi maduro a los 60 días, $n=4$, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos de ácido giberélico AG_3 aplicados.

7.1.3.3 Germinación de semillas bajo tratamientos de AG_3 , estado maduro a los 60 días.

Mediante la aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis ($H(5) = 20,00$, $p = 0,0012$) para el análisis de esta variable, se evidenció como mejores concentraciones de AG_3 a 200 ppm (72,13%) y 400 ppm (59,36%) mientras que el control (37,22%) mostró el resultado más bajo al momento de la germinación, mostrando diferencias estadísticas (Fig. 9).

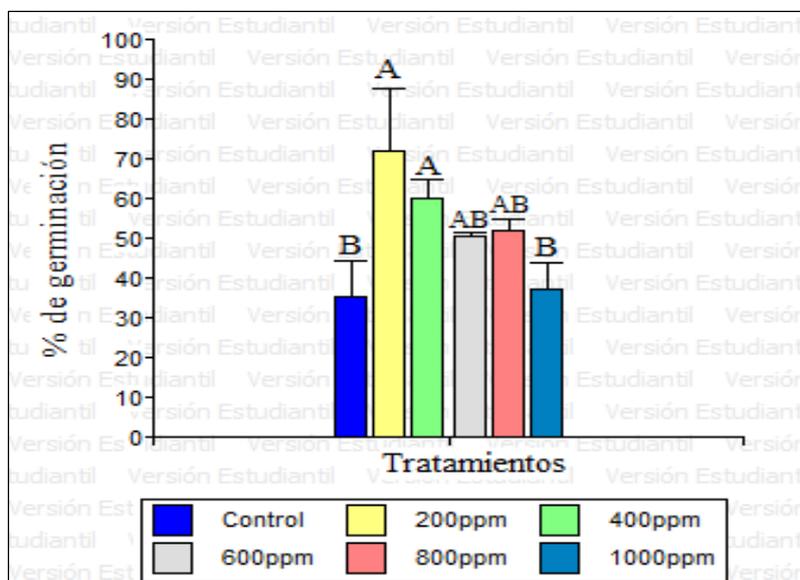


Fig. 9. Porcentaje de germinación de semillas de *M. rupestris* en el estado maduro a los 60 días, $n=4$, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos de ácido giberélico AG₃ aplicados.

7.1.4 Longitud de raíz de plántulas de *M. rupestris* (Joyapa) en sus diferentes estados fenológicos

7.1.4.1 Longitud de la raíz bajo tratamientos de AG₃, estado tierno a los 30 días

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis evidenció que los datos analizados mediante la misma, presentaron diferencias estadísticas significativas ($H(5) = 11,30$, $p = 0,0451$) siendo las concentraciones de 400 ppm (2,50%) y 600 ppm (0,57%) las que mejores resultados mostraron, a diferencia del control (0,04%) y 1000 ppm (0,15%) que en este caso fueron los valores longitudinales más bajos (Fig. 10).

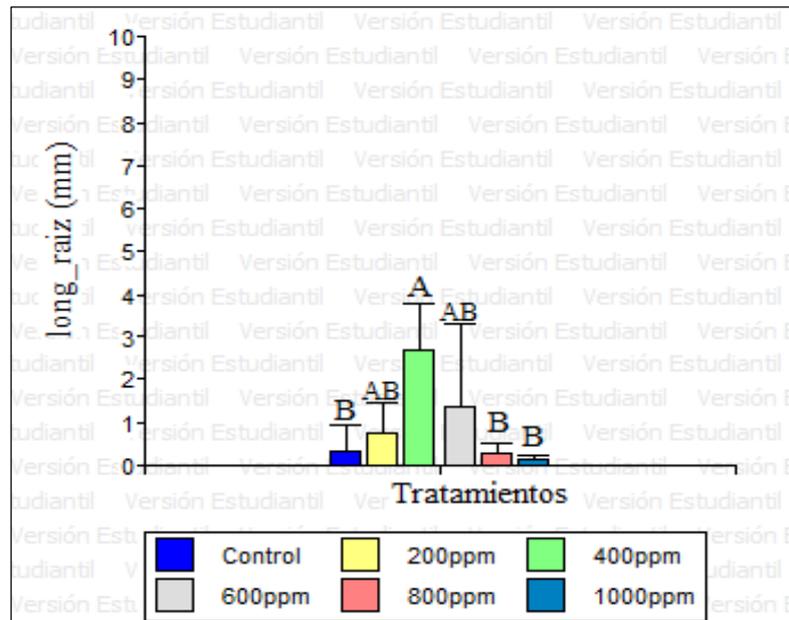


Fig. 10. Longitud de raíz (mm) de plántulas de *M. rupestris*, en el estado tierno a los 30 días, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.4.2 Longitud de la raíz bajo tratamientos de AG₃, estado semi maduro 30 días

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis aplicada para este análisis, mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($H(5) = 11,91, p = 0,0339$). Donde las concentraciones de 400 ppm (0,26%) y 1000 ppm (0,13%) arrojaron los resultados más altos en cuanto a longitudes, en comparación al control (0,01%) y 200 ppm (0,03%) que mostraron los resultados más bajos (Fig. 11).

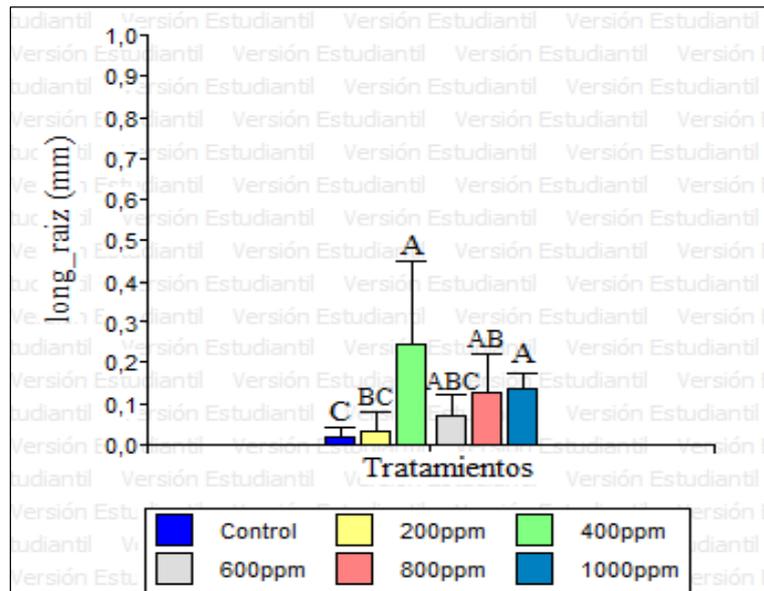


Fig. 11. Longitud de raíz (mm) de plántulas de *M. rupestris* en el estado semi maduro a los 30 días, bajo la aplicación de AG₃ n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.4.3 Longitud de la raíz bajo tratamientos de AG₃, estado maduro 30 días

En este estado, la prueba aplicada Kruskal-Wallis mostró que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos aplicados ($H(5) = 14,91, p = 0,0104$). Por lo que los mejores valores longitudinales fueron 1000 ppm (0,77%) 200 ppm (0,69%) 400 ppm (0,67%) a diferencia de 600 ppm (0,24%) y el control (0,26%) que presentó los resultados más bajos (Fig. 12).

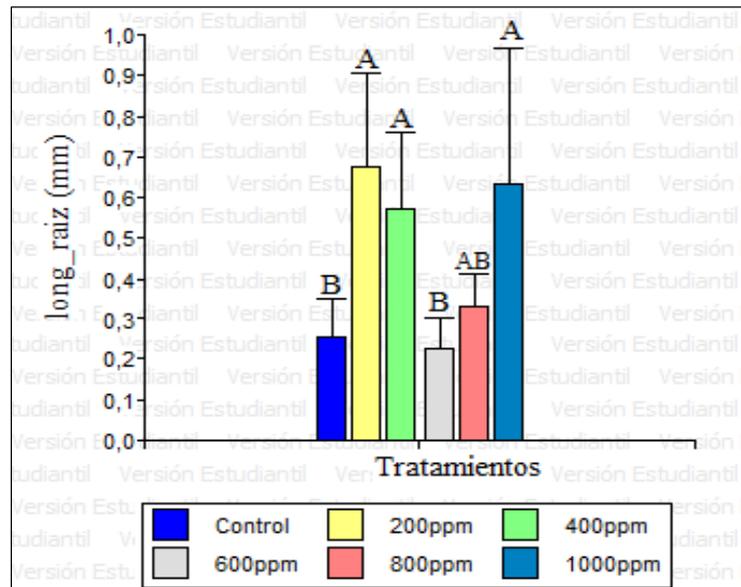


Fig. 12. Longitud de raíz (mm) de plántulas de *M. rupestris* en el estado maduro a los 30 días, bajo la aplicación de AG₃ n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.5 Longitud de raíz de plántulas de *M. rupestris* (Joyapa) en sus diferentes estados fenológicos.

7.1.5.1 Longitud de la raíz bajo tratamientos de AG₃, estado tierno a los 60 días

Mediante la prueba Kruskal-Wallis el estado fenológico tierno presentó diferencias estadísticas significativas ($H(5) = 11,43$, $p = 0,0435$) siendo las concentraciones 800 ppm (4,70%) y 600 ppm (4,27%) las que mostraron buenos resultados en comparación de 200 ppm (2,52%) y 1000 ppm (2,35%) que presentaron los más bajos resultados en cuanto a longitudes (Fig. 13).

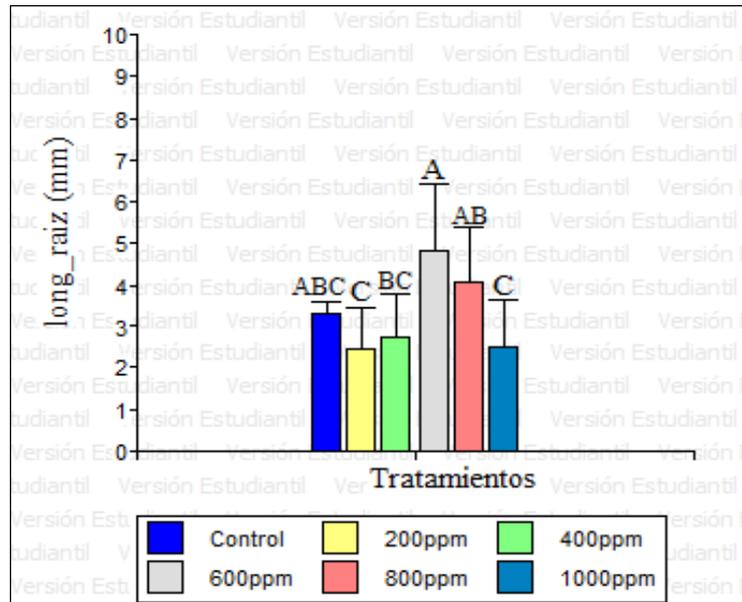


Fig. 13. Longitud de raíz (mm) de plántulas de *M. rupestris* para el estado tierno a los 60 días, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.5.2 Longitud de la raíz bajo tratamientos de AG₃, estado semi maduro a los 60 días

En el presente estado fenológico se pudo apreciar que las concentraciones de 400 ppm (2,72%) y 600 ppm (1,84%) evidenciaron los mejores resultados en cuanto a longitudes. Mientras que, 200 ppm (0,05%) fue la longitud más baja, esto se pudo corroborar según la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis que mostro diferencia estadística significativa ($H(5) = 14,95, p = 0,0104$) (Fig. 14).

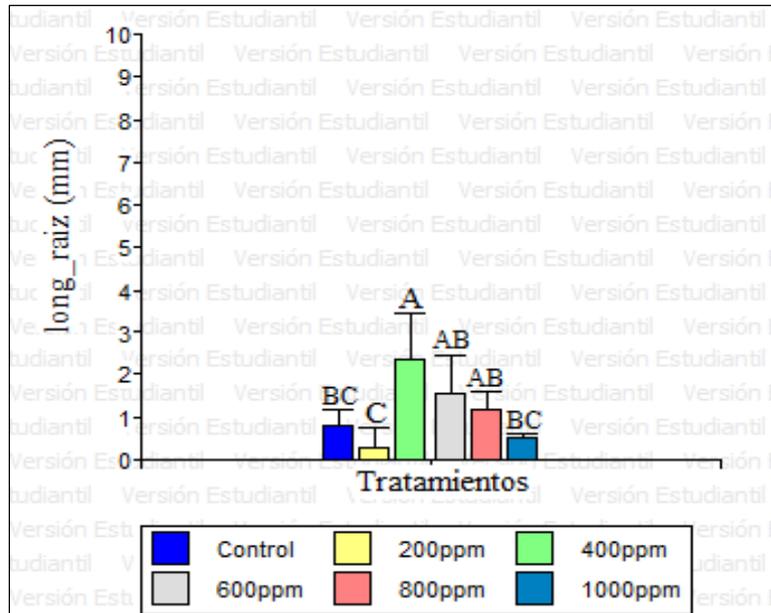


Fig. 14. Longitud de raíz (mm) de plántulas de *M. rupestris* para el estado semi maduro a los 60 días, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.5.3 Longitud de la raíz bajo tratamientos de AG₃, estado maduro a los 60 días

La prueba de Kruskal-Wallis evidenció que si existe diferencia estadística significativa ($H(5) = 11,06$, $p = 0,0498$) entre los tratamientos aplicados para el estado maduro, donde 200 ppm (1,54%) 600 ppm (1,06%) y 1000 ppm (1,05%) fueron las concentraciones que mejores longitudes reportaron a diferencia de 800 ppm (0,68%) que presentó la longitud más baja (Fig. 15).

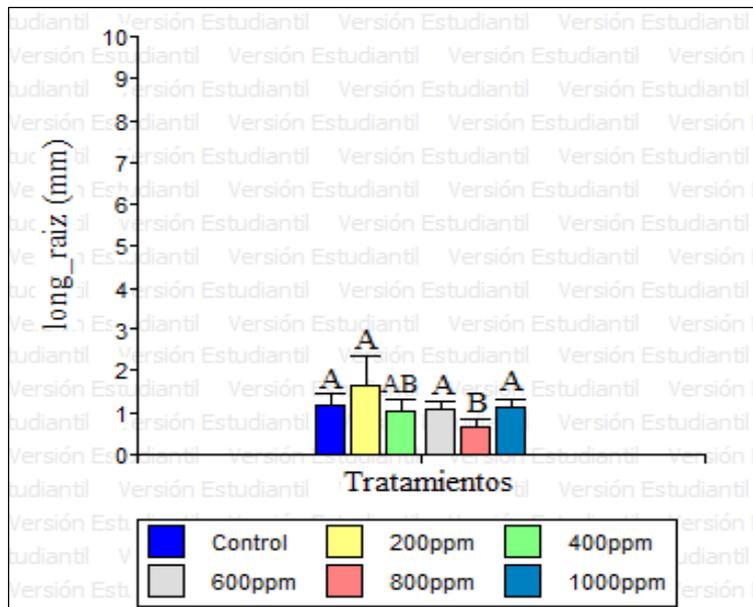


Fig. 15. Longitud de raíz (mm) de plántulas de *M. rupestris* para el estado maduro a los 60 días, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.6 Altura de plántulas de *M. rupestris* (Joyapa) a los 30 días en sus diferentes estados fenológicos.

7.1.6.1 Altura de plántulas bajo tratamientos de AG₃, estado tierno a los 30 días

Mediante la aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis, se obtuvo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($H(5) = 19,39$, $p = 0,0016$). Donde los mejores resultados fueron: 400 ppm (10,21%) y 800 ppm (5,51%) en comparación a 200 ppm (3,72%) y el control (3,76%) que presentaron los resultados más bajos (Fig. 16).

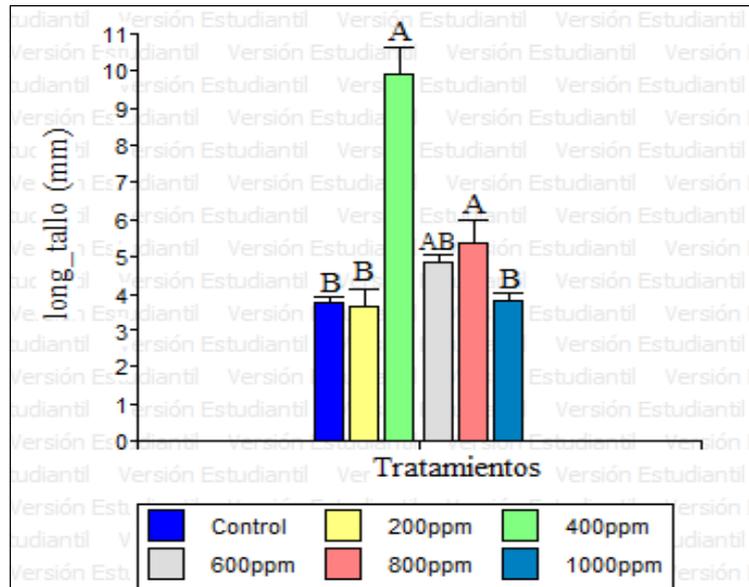


Fig. 16. Altura de plántulas (mm) de *M. rupestris* para el estado tierno a los 30 días, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos

7.1.6.2 Altura de plántulas bajo tratamientos de AG₃, estado semi maduro a los 30 días

Según la prueba de Kruskal-Wallis presentó diferencia estadística significativa ($H(5) = 16,35, p = 0,0059$), por ello las siguientes concentraciones 400 ppm (3,68%) seguida de 1000 ppm (3,60%) y 200 ppm (3,43%) mostraron los mejores resultados en cuanto a longitud a diferencia del control (1,94%) y 800 ppm (2,31%) que presentaron los resultados más bajos (Fig. 17).

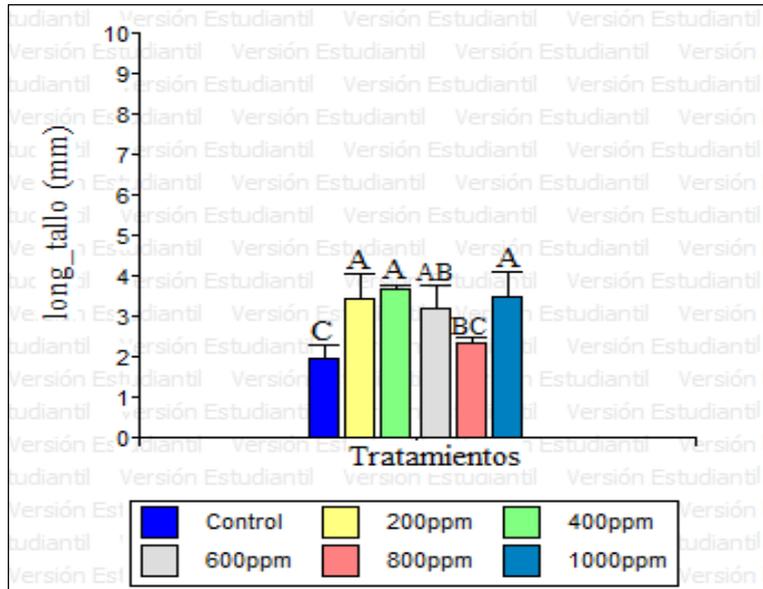


Fig. 17. Altura de plántulas (mm) de *M. rupestris* para el estado semi maduro los 30 días, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.6.3 Altura de plántulas bajo tratamientos de AG₃ estado maduro a los 30 días

Mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, se observó que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos aplicados ($H(5) = 15,69$, $p = 0,0078$) para el estado maduro, donde las concentraciones de 200 ppm (7,45%) y 400 ppm (6,69%) fueron las más altas en longitud de tallos en comparación de 1000 ppm (5,62%) que mostro el resultado más bajo (Fig. 18).

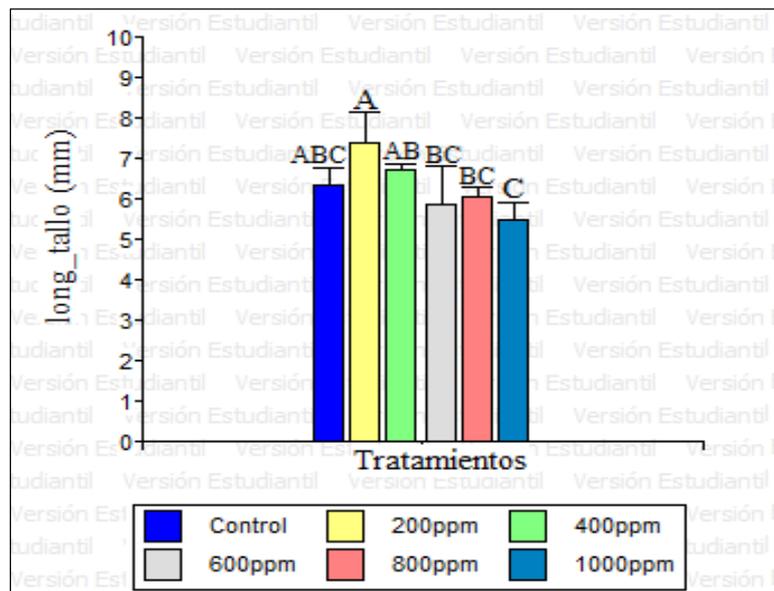


Fig. 18. Altura de plántulas (mm) de *M. rupestris* para el estado maduro a los 30 días, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.7 Altura de plántulas de *M. rupestris* (Joyapa) a los 60 días, en sus diferentes estados fenológicos.

7.1.7.1 Altura de plántulas bajo tratamientos de AG₃, estado tierno a los 60 días

Los datos registrados en el estado tierno, arrojaron los siguientes resultados: las concentraciones de 800 ppm (10,32%) y 400 ppm (10,23%) mostraron los más altos resultados de longitud de tallo, a comparación de 200 ppm (7,77%) que presento el más bajo resultado. Estos resultados fueron corroborados mediante la aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis, misma que evidenció diferencias estadísticas significativas ($H(5) = 13,81$, $p = 0,0169$) entre los tratamientos aplicados (Fig. 19).

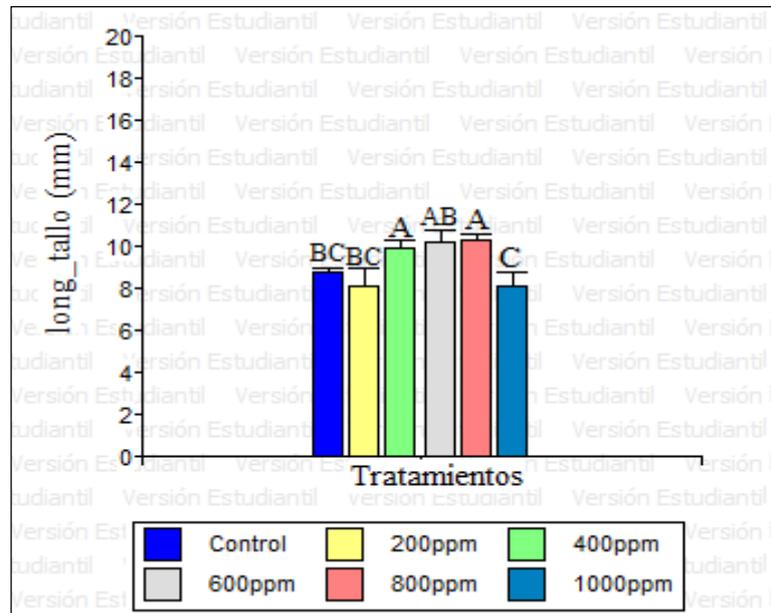


Fig. 19. Altura de plántulas (mm) de *M. rupestris* para el estado tierno a los 60 días, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.7.2 Altura de plántulas bajo tratamientos de AG₃, estado semi maduro a los 60 días

Mediante la prueba Kruskal-Wallis se evidenció que existe diferencia estadística significativa ($H(5) = 18,37, p = 0,0025$) presentando las mejores longitudes de tallo las concentraciones 400 ppm (8,29%) y 200 ppm (7,84%), por otra parte, las concentraciones más bajas fueron: el control (4,76%) y 800 ppm (5,69%) (Fig. 20).

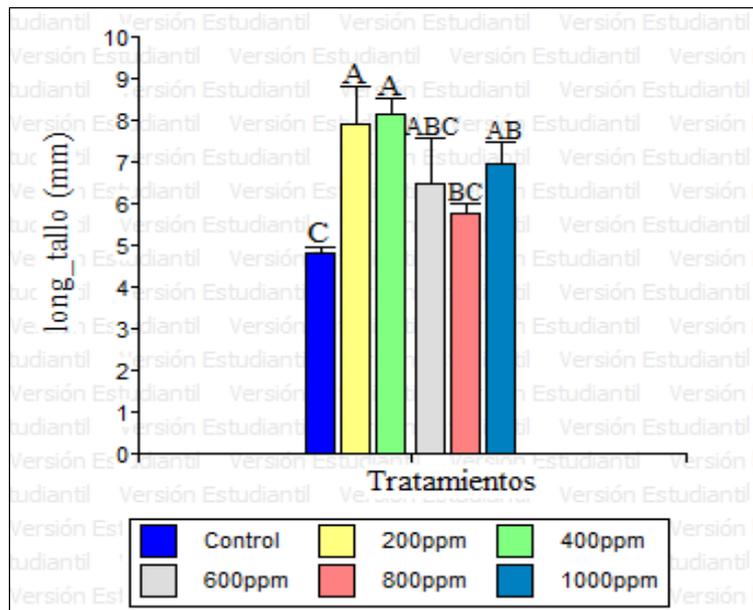


Fig. 20. Altura de plántulas (mm) de *M. rupestris* para el estado semi maduro a los 60 días, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.7.3 Altura de plántulas bajo tratamientos de AG₃, estado maduro a los 60 días

Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se pudo observar que existe diferencias estadísticas significativas ($H(5) = 12,13$, $p = 0,0329$) entre los tratamientos aplicados. Donde las concentraciones de 1000 ppm (8,82%) y 200 ppm (8,47%) evidenciaron los mejores valores longitudinales a diferencia de 600 ppm (7,27%) y 400 ppm (7,59%) que presentaron los más bajos resultados (Fig. 21).

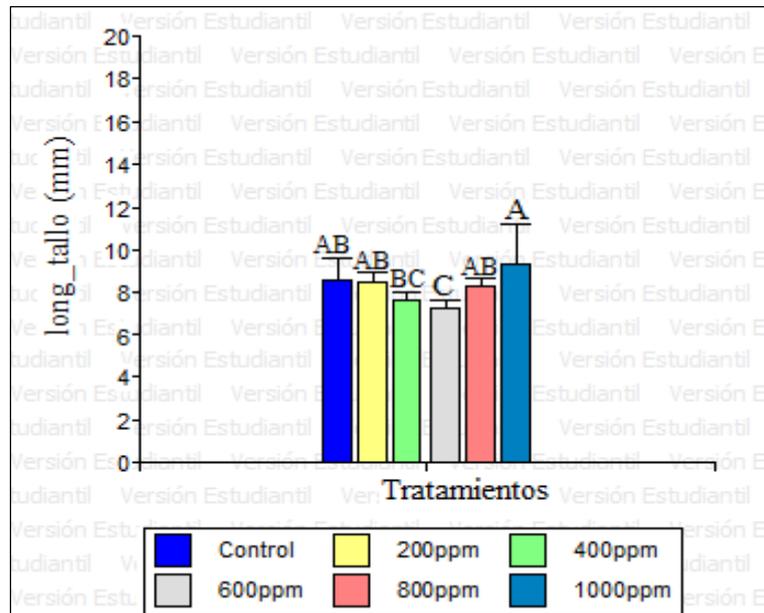


Fig. 21. Altura de plántulas (mm) de *M. rupestris* para el estado maduro a los 60 días, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.8 Altura de plántulas de *M. rupestris* (Joyapa) a los 90 días de su repique en sus diferentes estados fenológicos.

7.1.8.1 Altura de plántulas bajo tratamientos de AG₃, estado tierno

Los datos registrados para altura de plántulas a los 90 días, mostraron diferencias estadísticas significativas ($H(5) = 15,83, p=0,0073$) al aplicar la prueba Kruskal-Wallis, presentando como mejores concentraciones 800 ppm (10,99%) y 600 ppm (10,24%) que tuvieron las mejores longitudes en comparación de 400 ppm (6,03%) que fue la concentración que más bajos resultados presento (Fig. 22).

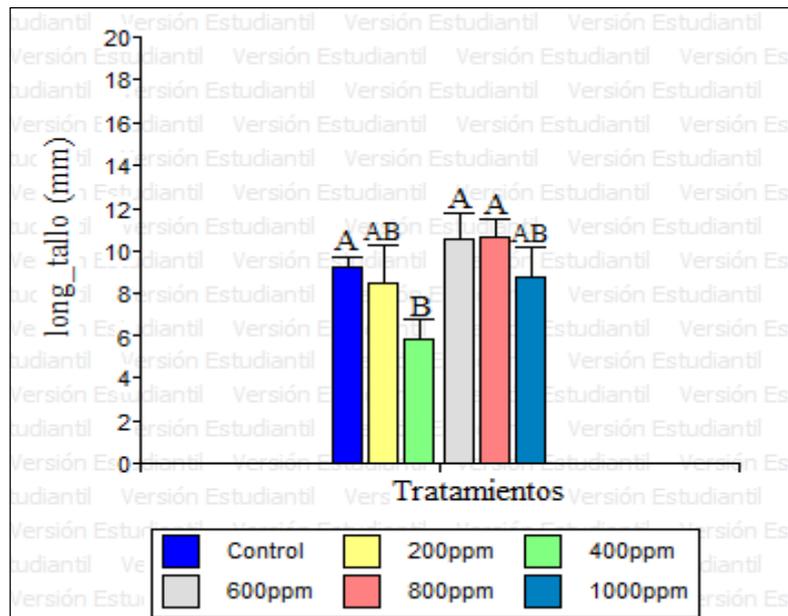


Fig. 22. Altura de plántulas (mm) de *M. rupestris* en el estado tierno a los 90 días de su repique a bandejas de germinación, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.8.2 Altura de plántulas bajo tratamientos de AG₃, estado semi maduro

Según la prueba de Kruskal-Wallis, los tratamientos aplicados presentaron diferencias estadísticas significativas ($H(5) = 12,80$, $p = 0,0253$) evidenciando como mejores concentraciones 400 ppm (8,89%) y 600 ppm (7,34%) mismas que mostraron las mejores longitudes de tallo, por otra parte las concentraciones que más bajos resultados presentaron fueron el control (5,14%) seguido de 800 ppm (5,90%) (Fig. 23).

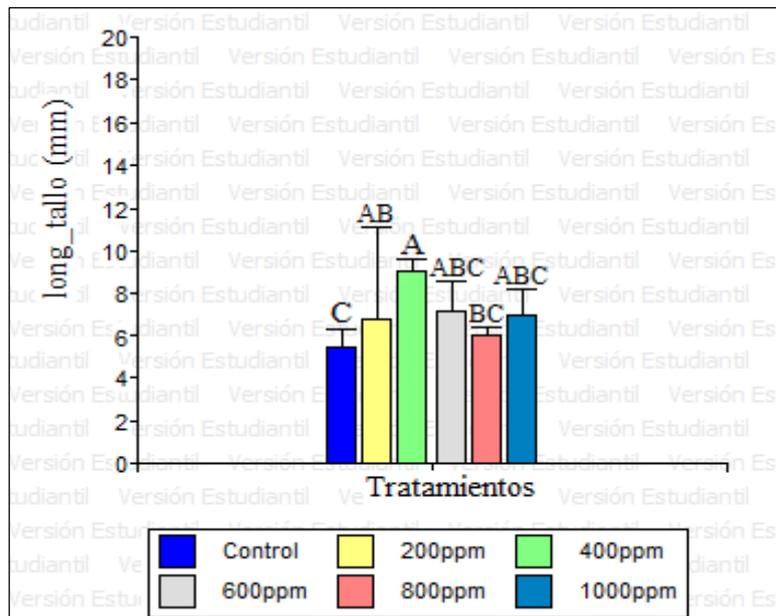


Fig. 23. Altura de plántulas (mm) de *M. rupestris* en el estado semi maduro a los 90 días de su repique a bandejas de germinación, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.

7.1.8.3 Altura de plántulas bajo tratamientos de AG₃, estado maduro

La prueba de Kruskal-Wallis determinó que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos utilizados ($H(5) = 13,42$, $p = 0,0197$) mientras que las concentraciones de 1000 ppm (9,02%) seguida del control (8,93%) presentaron los mejores resultados en cuanto a valores longitudinales a diferencia de 600 ppm (7,89%) y 400 ppm (8,28%) que reportaron los resultados más bajos (Fig. 24).

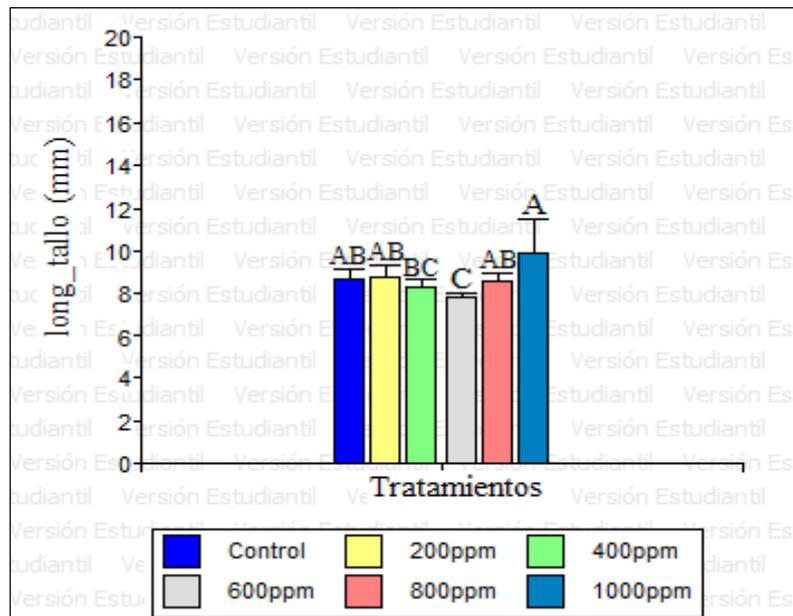


Fig. 24. Altura de plántulas (mm) de *M. rupestris* en el estado maduro a los 90 días de su repique a bandejas de germinación, bajo la aplicación de AG₃, n=4, desviación estándar. Los diferentes rangos muestran diferencias significativas entre los tratamientos.



7.1.9 Análisis de peso seco a nivel foliar y radicular de plántulas de Joyapa a los 90 días

Mediante la aplicación de la fórmula: % de humedad= $((pi-pf) / pi * 100)$ donde pi=peso inicial y pf= peso final. Se calculó el porcentaje de pérdida de humedad a nivel radicular y foliar de *M. rupestris*, las muestras frescas fueron llevadas al laboratorio y puestas a secar en la estufa a 72 °C por 24 horas, para determinar la pérdida de humedad de las mismas (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Peso fresco y seco de raíces (mg) de plántulas de *M. rupestris* a los 90 días.

Estados Fenológicos	Peso fresco raíz (mg)	Peso seco raíz (mg)	Porcentaje de pérdida de humedad
Tierno	13,37	3,26	75,62%
Semimaduro	34,93	33,29	4,70%
Maduro	5,13	1,25	75,63%

Tabla 3. Peso fresco y seco de hojas (mg) de plántulas de *M. rupestris* a los 90 días.

Estados Fenológicos	Peso fresco hojas (mg)	Peso seco hojas (mg)	Porcentaje de pérdida de humedad
Tierno	189,23	10,93	94,22%
Semimaduro	73,75	6,73	90,87%
Maduro	154,62	69,74	54,90%

7.2 Propagación asexual (meristemas)

7.2.1 Efecto del AG₃ sobre el desarrollo de meristemas de *M. rupestris*

Los datos registrados para esta variable fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Mann Whitney, misma que mostró que existe diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos aplicados ($p= 0,0079$) (Tabla 4).

Tabla 4. Prueba Mann Whitney porcentaje de meristemas desarrollados a los 15 días.

Tratamientos	Medianas
Testigo	26,57
AG ₃ (0,5 mg/l)	50,77

Los meristemas sembrados con AG₃ presentaron el 50,77% de brotación en comparación del tratamiento testigo a los 15 días de sembrados en el medio MS.

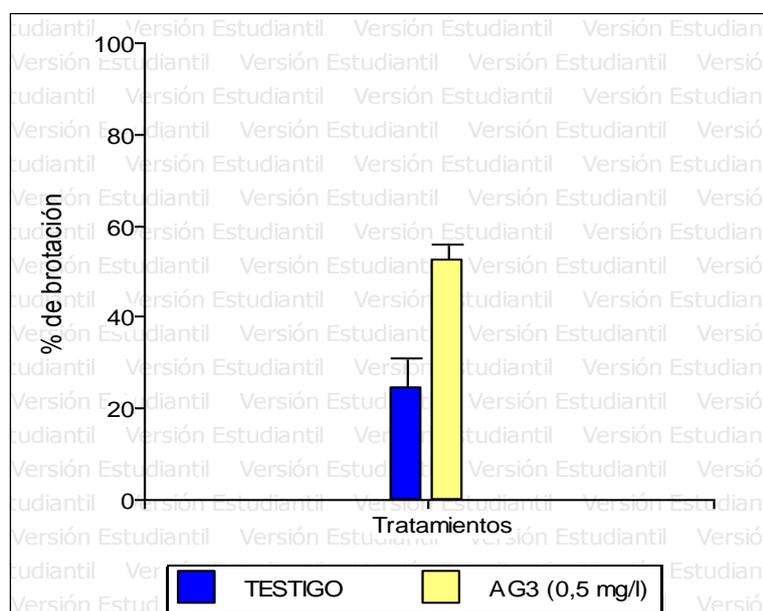


Fig. 25. Porcentaje de brotación de meristemas de *M. rupestris* bajo la aplicación de ácido giberélico AG₃ a los 15 días de sembrados, $n=4$, desviación estándar.



7.2.2 Altura de plántulas procedentes de meristemas de *M. rupestris* bajo el efecto de AG₃

A partir de los 15 días de sembrados los meristemas, se realizó el repique a un medio de cultivo MS enriquecido con AG₃ (0,5 mg/l) y BAP (Bencilaminopurina) (1 mg/l), esto por 3 semanas consecutivas. Al evaluar la altura se observó una pérdida progresiva de plántulas, debido posiblemente a la falta de elementos nutritivos en el medio (Tabla 5).

Tabla 5. Altura de plántulas de *M. rupestris* en medio MS enriquecido con AG₃ y BAP.

N° de plántulas	2 semana (mm)	3 semana (mm)	4 semana (mm)	N° de hojas
1	0,1	0,2	0,3	1
2	0,3	0,3	0,4	0
3	0,4	0,6	0,7	2
4	0,2	0,4	0,6	2
5	0,4	0,5		
6	0,3			
7	0,4			
8	0,2			
9	0,4			



8. DISCUSIÓN

La ausencia de protocolos para la propagación sexual y asexual de *M. rupestris* se ha considerado como uno de los obstáculos más importantes al momento de utilizar esta especie en diferentes ámbitos (Veloza et al., 2014).

Al evaluar el porcentaje de germinación de semillas de joyapa procedentes de frutos en tres estados fenológicos (tierno, semi maduro y maduro) se encontró que no existe diferencia estadística significativa entre estados, lo que difiere con lo obtenido por Calvo, (2012) quien menciona que el estado apto para la obtención de semillas de calidad, viabilidad y respuesta germinativa se encuentra en el fruto con mayor grado de madurez.

Un elemento importante a destacar es que a pesar de que no haya existido diferencia entre los tres estados fenológicos en el momento de germinación, las semillas del fruto tierno reaccionaron de mejor manera al AG₃ en sus diferentes concentraciones ya que anatómicamente la sarcotesta de la semilla está formada por una capa de células parenquimatosas ricas en mucilago, misma que aumenta a medida que el fruto se desarrolla.

Según Serna et al., (2017) mencionan que uno de los principales efectos que causa AG₃ es la activación de una o más señales de transducción para las respuestas por parte de los genes, mismos que se traducen como tal en la elongación celular. Esto se pudo evidenciar en las plántulas obtenidas en los diferentes estados fenológicos, los mismos que fueron evaluados con diferentes concentraciones de AG₃.

El uso de biorregulador (AG₃), indujo un mayor porcentaje de germinación en el estado tierno, concordando con lo manifestado por Buitrago, Rincón, Balaguera, & Ligarreto, (2015) quienes utilizan el AG₃ en mortiño (*Vaccinium meridionale* Kunth), para incrementar el poder de germinación del 50 al 90% en los primeros 30 días. Donde según Gutiérrez & Camacho (2011) esto beneficiará al método de propagación que más problemas involucra al momento de su germinación.

Luego de la germinación, el desarrollo de las plántulas tuvo un crecimiento lento en sus tres estados fenológicos, estos resultados son similares al obtenido por Corzo, (2014), quien afirma que la propagación sexual de *M. rupestris* es muy lenta.



De igual manera, Muñoz, (2004) indica en un estudio realizado en el Mortiño, especie que también pertenece a la familia de las *Ericáceas* que después de ocho meses de germinadas las semillas estas presentaron tamaños muy reducidos concordando con lo obtenido en esta investigación.

Esto podría ser a causa de que la joyapa se encuentra en zonas altas de paramos y sub paramos, las cuales presentan condiciones extremas de altas y bajas temperaturas, suelos deficientes de nutrientes y variaciones de humedad, por lo cual presentan metabolismos lentos para adaptarse.

Teniendo en cuenta la respuesta que tuvo *M. rupestris* a la propagación utilizando meristemas apicales, donde se utilizó AG₃ (0,5 mg/l) en un medio MS enriquecido con BAP (1 ppm) favoreció en la etapa de establecimiento y desarrollo de brotes vegetativos, estos resultados guardan relación con lo obtenido por Tabares, (2004) quien utilizó un medio MS suplementado con BAP (2ppm) y AG₃ (1ppm) en yemas vegetativas observando una brotación mayor al 60%. No obstante, para su segunda fase de establecimiento la cantidad de plántulas fue decreciendo por problemas de oxidación, siendo esta uno de los principales problemas que impidió continuar con la siguiente etapa (uso de AIB para enraizamiento) este problema podría deberse a la edad de la planta madre del cual se extrajeron los meristemas como lo indica Rache et al, (2010)



9. CONCLUSIONES

Luego de terminada la presente investigación se concluye que:

1. Al evaluar la germinación de semillas de *M. rupestris* en sus diferentes estados fenológicos, se pudo demostrar que no existen diferencias estadísticas significativas entre los estados fenológicos, ya que a los 30 días se obtuvieron los siguientes porcentajes: tierno (41,10 %) semi maduro (44,13 %) y maduro (42,77 %) es así que la tendencia continua a los 60 días: tierno (37,18 %) semi maduro (41,53%) y maduro (39,98%). Sin embargo, el estado fenológico semi maduro fue el más representativo para ambos casos.
2. Las concentraciones de AG₃ aplicadas en los diferentes estados fenológicos, mostraron los mejores resultados en el estado tierno, en las concentraciones de 400 ppm (84,23 %) y 800 ppm (77,94 %), comparadas con el control que fue el menor porcentaje de germinación presentó (39,77). El efecto del AG₃ en la germinación de semillas se evidenció también en la variable altura de plántulas que se midió a los 90 días, presentando mayor altura las concentraciones de 400 y 800 ppm.
3. En el desarrollo de meristemas la concentración de AG₃ que mostró resultados en el prendimiento de meristemas (50,77 %) fue la de 0,5 mg/l aplicada en un medio MS. En el caso del AIB se utilizó una concentración única estándar (1 mg/l) sin obtener resultados favorables.



10. RECOMENDACIONES

Luego de concluida la presente investigación se recomienda:

1. Definir de manera más precisa los estados fenológicos del fruto utilizando otros indicadores de madurez (grados brix, firmeza, etc.)
2. En la propagación sexual, se recomienda estudiar el efecto del alcohol utilizado como método de desinfección, sobre la germinación de semillas.
3. Utilizar la concentración de 400 ppm de AG_3 para la inducción de germinación de semillas de joyapa en estado fenológico tierno.
4. Una vez obtenidas las plántulas por semilla someter a un proceso progresivo de aclimatización hasta las condiciones propias de su hábitat.
5. Para la propagación asexual, se recomienda seleccionar explantes de plantas jóvenes (1 a 2 años de edad) y con buenas condiciones sanitarias, determinando el estado fenológico ideal para la obtención de yemas apicales con miras a obtener meristemas de calidad.
6. Evaluar diferentes concentraciones de AG_3 para el desarrollo de meristemas *in vitro*, considerando la mejor concentración obtenida en esta investigación (0,5 mg/l).
7. Probar diferentes concentraciones de AIB para el enraizamiento de explantes obtenidas de meristemas *in vitro*.
8. Evaluar diferentes medios de cultivo y su enriquecimiento con vitaminas para inducir enraizamiento de explantes obtenidas de meristemas *in vitro*.



11. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, L. (2015). Comparación histológica foliar de *Gaultheria anastomosans* (L. f.) Kunth de la familia Ericaceae presente en bosque de niebla y páramo del parque ecológico matarredonda vía Bogotáchoach.
- Afanador, A. M. (2005). Propagación in vitro a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. (clavel). *Pontificia Universidad Javeriana*, 137.
- Alarcón, A., & Ferrera, y R. (1999). Propagación de plantas frutícolas *.
- Aldaz, L., & Ochoa, J. (2011). Propagación Asexual de diez especies forestales y arbustivas en el Jardín Botánico "Reinaldo Espinosa", 113. Retrieved from [http://dspace.unl.edu.ec/bitstream/123456789/5348/1/Propagación asexual de diez especies forestales y arbustivas en el jardín botánico.pdf](http://dspace.unl.edu.ec/bitstream/123456789/5348/1/Propagación%20asexual%20de%20diez%20especies%20forestales%20y%20arbustivas%20en%20el%20jardín%20botánico.pdf).
- Altieri, M. A., Jordan, M., Mayor, U., Pompelli, M. F., Ramírez, R., Stansly, P. A., ... Wyckhuys, K. (2010). Sociedad Colombiana de ciencias hortícolas – SCCH Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia – UPTC Editor Fánor Casierra – Posada, 4(1), 1–136.
- Aramendiz, H., & Cardona, C. E. (2005). Influencia del ácido indolbutírico y ácido naftalenoacético sobre el enraizamiento de esquejes de Caña Flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) Effect of indolebutyric acid and naphthalenacetic acid on rooting of arrow cane (*gynerium sagittatum* aubl.), 5–13.
- Boni, S. M. (2016). Evaluación de un sustrato orgánico para el enraizamiento de las estacas de joyapa (*Macleania rupestris*).
- Braha, S., & Rama, P. (2016). The Effects of Indol Butyric Acid and Naphthalene Acetic Acid of Adventitious Root formation to Green Cuttings in Blueberry cv. (*Vaccinium corymbosum* L.), (Septiembre), 1–4. <https://doi.org/10.21275/v5i7.ART2016324>.
- Buitrago, C., Rincón, M., Balaguera, H., & Ligarreto, G. (2015). Tipificación de Diferentes Estados de Madurez del Fruto de Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7521–7531. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n1.47840>.
- Calvo, D. (2012). Caracterización morfológica y fisiológica de semillas y plántulas de *Macleania rupestris* (Kunth) A.C. Smith, 1–46.
- Correa, J., & Jácome, J. (2015). Propagación sexual y asexual de las especies Montaña cuadrangularis Schultz Bipontianus y Verbsina crassiramea S.F. con fines de restauración en el bosque Andino las Mercedes.
- Corzo, D. (2014). Estudio del comportamiento poscosecha de *Macleania rupestris* packaging and temperature conditions.
- Dávila, D. (2001). Las Ericáceas en la web: Neotropical blueberries; The plant family Ericaceae. *Biota Colombiana*, 2(3), 291–293.



- Durán, S., Veloza, C., Magnitskiy, S., & Lancheros, H. (2013). Evaluation of uva camarona (*Macleania rupestris* Kunth A . C . Smith) propagation with air layering. *Agronomía Colombiana*, 31(1), 18–26.
- Evans, R. C., & Vander Kloet, S. P. (2010). Comparative analysis of hypocotyl development in epiphytic, lignotuber-forming, and terrestrial *Vaccinieae* (Ericaceae). *Botany*, 88(6), 556–564. <https://doi.org/10.1139/B10-031>.
- Gutierrez, B. (1991). Hongos fitopatogenos encontrados en hojas, flores y frutos de *Macleania rupestris* (H.B.K.) l.c. Smith, 257–260.
- Gutiérrez, V., & Camacho, D. (2011). Evaluación de las estrategias de propagación de la especie *Vaccinium floribundum* (familia Ericaceae) presente en el paramo cruz verde, 84.
- Jiménez, Silva, Borges, F. (2016). Comunicación corta conservación in vitro del cultivo de clavel español.
- Latsague Vidal, M., Sáez, P., & Yáñez, J. (2009). Efecto del ácido indolbutírico en la capacidad rizogénica de estacas de *Eucryphia glutinosa*. *Bosque (Valdivia)*, 30(2), 102–105. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002009000200006>.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, 26–33. Recuperado de www.argenbio.org.
- Malagón, E., & Ussa, J. (2002). Implementacion y determinacion de la produccion inicial de un modulo agropecuario para el piso alto andino, municipio de Cogua, 7(i).
- Malajovich, M., & Soares Mann, V. (2013). Micropropagación en el laboratorio educacional. *Biotecnología: Enseñanza y Divulgación, II*, 1–9.
- Manrique, J., & Caballero. (2009). Evaluación del efecto del medio MS y la temperatura en el desarrollo de propágulos de *Marchantia polymorpha* L. (Marchantiaceae) bajo condiciones in vitro y ex vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 85–104. Recuperado de <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3105415&orden=242926&info=link%5Cnhttp://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3105415.pdf%5Cnhttp://dialnet.unirioja.es/servlet/extart?codigo=3105415>.
- Minchala, J., Eras, V., Muñoz, L., Yaguana, M., Poma, R., & Delgado, G. (2013). Propagación sexual y asexual de cuatro especies forestales nativas y promisorias de la region sur del Ecuador, 1–140.
- Muñoz, V. (2004). Universidad San Francisco de Quito Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición Departamento: Agroempresas hoja de aprobación de tesis Determinación de Métodos para Producción de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), con Fines de Propagación y Producción. Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/864/1/75820.pdf>.
- Olaya, Sorany. (2012). Caracterización morfológica de *Cavendishia bracteata* y *Macleania rupestris* (Ericaceae) en la sabana de Bogotá.



- Osuna, H., Osuna, A., & Fierro, A. (2016). Manual de propagación de plantas superiores. Recuperado de http://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/manual_plantas.pdf.
- Pinilla, C. Desarrollo del fruto de banano (musa AAA), en uraba effect of gibberellic acid on the growth and development of banana fruit (musa AAA), en Uraba, 30–36.
- Ram, B. (2016). Botánica . Generalidades , Morfología y Anatomía de plantas superiores.
- Reyna, C. (2012). Evaluación del potencial antioxidante de joyapa (*Macleania rupestris*), y aplicación en el procesamiento de alimentos.
- Rodríguez, S. Rodríguez, R., Antana, S., Rmando, A., & Amos, R. (2010). Efecto del ácido giberélico sobre la producción hidropónica del tomate variedad Gabriela, IV(2).
- Saldívar, P., Laguna, A., Gutiérrez, F., & Domínguez, M. (2010). Ácido giberélico en la germinación de semillas de Jaltomata procumbens (Vav.) J. L. Gentry. *Agronomía Mesoamericana*, 21(2), 327–331. Recuperado de 155.210.209.81/redalyc-seam/articulo.oa?id=43720093012.
- Sanchez, A., Suárez, E., Razzela, M., Amaya, Y., Colmenares, B., & Ortega, J. (2009). Efecto del ácido indolbutírico sobre el enraizamiento de acodo aéreos de guayabo (*Psidium guajava* L.) en el municipio Baralt, Venezuela. Evaluación preliminar. *UDO Agrícola*, 9(1), 113–120. Recuperado de <http://www.bioline.org.br/pdf?cg09095>.
- Santamaría, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, F., & Yugsi, E. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional, 16(2), 5–13.
- Santiago, A., Loor, M., María, D., Cazar, E., & Cuenca, R. (2014). Evaluación del potencial inhibidor de las enzimas α y β glucosidasa en algunos frutos nativos del Ecuador. Recuperado de <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/3605/1/10287.pdf>.
- Serna, A., Hurtado, A., & Ceballos, N. (2017). Efecto del ácido giberélico en el crecimiento , rendimiento y calidad del tomate bajo condiciones controladas.
- Talaat, I., Khattab, H., & Ahmed, A. (2014). Changes in growth , hormones levels and essential oil content of Ammi visnaga L . plants treated with some bioregulators. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(4), 355–365. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.10.008>
- Torres, M., Trujillo, D., & Arahana, V. (2010). Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 2(2). Recuperado de <https://doi.org/10.18272/aci.v2i2.27>
- Valencia, M., & Carillo, N. (1991). Anatomía del fruto de *Macleania rupestris* (H.B.K) A.C. Smith (Uva Camarona). *Agronomía Colombiana*, 8(1988), 286–305.



- Vazquez, V. (2006). Sistema de Información Científica dosis y épocas de aplicación de ácido giberélico en la floración y cosecha del mango .
- Vega, A., & Muñoz, C. (1994). Presencia de micorrizas en Ericaceas en Chile. *Agricultura Técnica*. Recuperado de <http://www.inia.cl/medios/biblioteca/agritec/NR17174.pdf>
- Veloza, C., Durán, S., Magnitskiy, S., & Lancheros, H. (2014). Rooting Ability of Stem Cuttings of *Macleania rupestris* Kunth A.C. Sm., a South American Fruit Species. *International Journal of Fruit Science*, 14(4), 343–361. <https://doi.org/10.1080/15538362.2014.897889>

12. ANEXOS

Anexo 1: Selección del material vegetal (ramas y frutos) de *M. rupestris*, para la propagación sexual.



Imagen 1. Plantas de *Macleania rupestris*



Imagen 2. Flores de *M. rupestris*

Anexo 2: Recolección de frutos de la especie *M. rupestris* en sus tres estados fenológicos (tierno, semi maduro, maduro).



Imagen 3. Frutos de joyapa estado tierno



Imagen 4. Frutos de joyapa estado semi maduro



Imagen 5. Frutos joyapa estado maduro



Imagen 6. Frutos maduros

Anexo 3: Fase de laboratorio, extracción de semillas, prueba de viabilidad y siembra de las mismas.



Imagen 7. Extracción de semillas



Imagen 8. Prueba de viabilidad

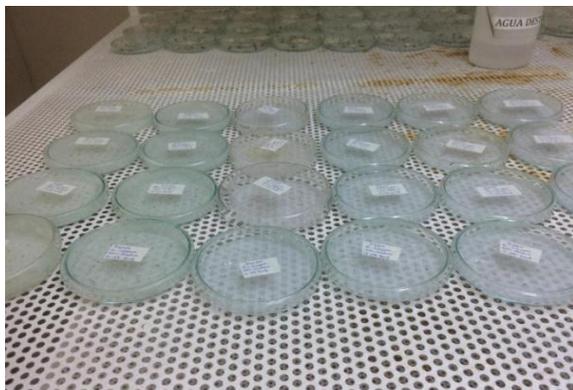


Imagen 9. Siembra de semillas



Imagen 10. Semillas en papel absorbente



Imagen 11. Plántulas a los 30 días



Imagen 12. Plántulas a los 60 días

Anexo 4: Repique de plántulas hacia bandejas de germinación a los 60 días y su desarrollo transcurridos 90 días.



Imagen 13. Plántulas a los 90 días



Anexo 5: Recolección de material vegetativo (ramas) de *M. rupestris* para la propagación asexual.



Imagen 14. Plantas de *M. rupestris*



Imagen 15. Ramas de joyapa

Anexo 6: Material vegetativo (explantes de joyapa) clasificado.



Imagen 16. Ramas jóvenes



Imagen 17. Tamaño del explante

Anexo 7: Fase de laboratorio, extracción y siembra de meristemas, toma de datos de plántulas finales.



Imagen 18. Extracción de meristemas

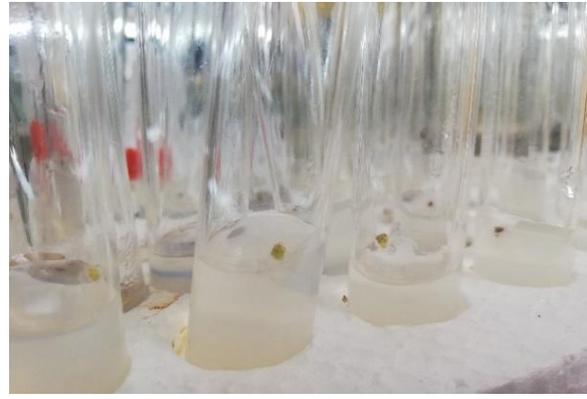


Imagen 19. Siembra de meristemas



Imagen 20. Meristemas a los 8 días



Imagen 21. Meristemas a los 16 días

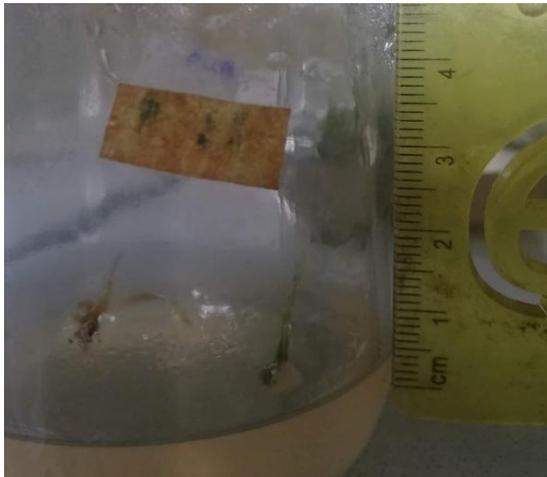


Imagen 22. Meristemas a los 24 días



Imagen 23. Meristemas a los 32 días



Imagen 24. Desarrollo de plántulas 1

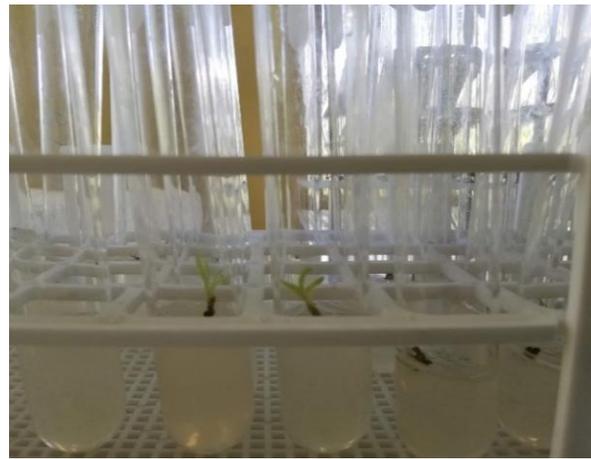


Imagen 25. Desarrollo de plántulas 2