

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**COLEGIO DE AGRICULTURA, ALIMENTOS Y NUTRICIÓN
DEPARTAMENTO: AGROEMPRESAS**

**DETERMINACIÓN DE MÉTODOS PARA PRODUCCIÓN DE
MORTIÑO (*Vaccinium floribundum Kunth*), CON FINES DE
PROPAGACIÓN Y PRODUCCIÓN COMERCIAL**

VIVIANA VICTORIA MUÑOZ JIMENEZ

**PROYECTO DE GRADO PRESENTADO AL DEPARTAMENTO DE
AGROEMPRESAS COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN AGROEMPRESAS**

QUITO

DICIEMBRE DE 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 Comercial**

Viviana Victoria Muñoz Jiménez

Mario Caviedes, Doctor
Director del proyecto

.....

Venancio Arahana, Ph. D.
Miembro del Comité del Proyecto

.....

Eduardo Uzcátegui, Ph. D.
Coordinador de Agroempresas

.....

Michael Koziol, Ph. D.
Decano del Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición

.....

Quito, Diciembre de 2004

© Derechos de autor
Viviana Victoria Muñoz Jiménez
2004

DEDICATORIA

A Dios, mi todo, le entrego el presente trabajo y mi vida entera.

Dedico a mis padres este triunfo, el primer peldaño de mi vida, cumplido con esfuerzo y sacrificio, el mismo que se los devuelvo por la confianza que ellos depositaron en mí.

Viviana V. Muñoz J.

AGRADECIMIENTO

A Dios, mi padre, por la oportunidad que en la vida me dio, prepararme para servir más y mejor.

Mi sincero agradecimiento al Dr. Mario Caviedes, tutor de la presente investigación, quien supo orientarme y apoyarme en la realización de la misma.

A Venancio Arana Ph. D. y al Ing. Carlos Ruales quienes acertadamente dirigieron el contenido práctico de este trabajo. A Andrea Arias, B.S.

A Eduardo Uzcátegui, Ph. D. coordinador de Agroempresas; a Lourdes Torres Ph. D. coordinadora de Biotecnología; profesores que supieron entregarme su ciencia y experiencia en forma desinteresada.

Un agradecimiento especial a las personas que en forma directa e indirecta trabajaron junto a mí, brindándome sus conocimientos científicos o prácticos con los que concluí con éxito mi carrera.

A toda mi familia quienes me apoyaron y trabajaron a mi lado.

Viviana V. Muñoz J.

RESUMEN

El mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*), es una fruta nativa de los páramos ecuatorianos que no se ha establecido como cultivo para comercializarlo.

Antiguamente, este producto tenía su importancia dentro de la alimentación ecuatoriana, pero con el pasar de los tiempos su consumo ha disminuido y la planta también ha comenzado a desaparecer.

El hecho de que no se ha domesticado a esta planta se debe a que no se cuenta con un método para propagar las plantas, por lo que se ha experimentado con tres posibles técnicas.

La primera se refiere al estaquillado, reproducción asexual, en donde se trata de enraizar estacas de aproximadamente 25 cm. para lograr una planta nueva.

La propagación por microestacas es también una reproducción asexual, que se encarga de enraizar pequeñas estacas, de un tamaño menor a 5 cm., pero de una forma aséptica.

Finalmente la propagación in Vitro por semillas, que es un método sexual, en donde se trata de obtener plantas a través de semillas, pero en un medio de cultivo y dentro de un laboratorio.

De acuerdo con los resultados obtenidos de cada uno de los tres procedimientos, se sabe que no fueron eficientes; aspectos que no deben ser una barrera para continuar el estudio de esta fruta, ya que se podría convertir en un cultivo muy rentable.

Se recomienda investigar sobre las necesidades de horas frío, temperatura y humedad que requiere la planta en lo que se refiere al método in Vitro.

ABSTRACT

The mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*) is a bush native from the Ecuadorian highlands which has not been cultivated for commercial purposes.

In the past, this product was an important food in Ecuador, but recently its consumption has decreased and the plant as well has begun to disappear.

This plant has not been domesticated because a method to propagate the mortiños has not been developed. Therefore, experiments have been made with three possible techniques.

The first one uses cuttings that were 25 cm. long, asexual reproduction, in which mortiño cuttings are buried in order to get a new plant.

Propagation through micro-cuttings is also an asexual reproduction method, which consists in burying small cuttings of a size smaller than 5 cm, but in an aseptic way.

Finally there is the in vitro propagation through seeds, which is a sexual method, in which the plant is obtained from seeds, but in a cultivation environment and in the laboratory.

The results obtained from each of the above mentioned procedures, have not been successful; however these outcomes should not be an impediment for the continuation of studies of this bush, because this could become a very profitable crop.

Regarding the in Vitro method, it is recommended to investigate about the needs of hours of light, temperature and humidity required by the bush.

CONTENIDO

| | Página |
|--|---------------|
| 1.- Introducción..... | 1 |
| 2.- Justificación..... | 3 |
| 3.- Objetivos..... | 5 |
| 3.1.- Objetivo general..... | 5 |
| 3.2.- Objetivos específicos..... | 5 |
| 4.- Estudio técnico..... | 6 |
| 4.1.- Localización geográfica..... | 6 |
| 4.2.- Métodos de propagación..... | 7 |
| 4.2.1.- Propagación vegetativa..... | 8 |
| 4.2.1.1.- Estaquillado..... | 8 |
| a. Materiales..... | 9 |
| b. Procedimiento..... | 9 |
| 4.2.1.2.- Propagación por microestacas..... | 11 |
| a. Materiales..... | 12 |
| b.- Equipos..... | 13 |
| c.- Procedimiento..... | 13 |
| 4.2.2.- Reproducción sexual..... | 15 |
| 4.2.2.1.- Germinación de semillas in Vitro..... | 15 |
| a. Sales inorgánicas..... | 16 |
| b. Compuestos orgánicos..... | 16 |
| b.1. Sacarosa..... | 16 |
| b.2. Hormonas y reguladores de crecimiento..... | 17 |
| b.3. Vitaminas..... | 17 |
| c. Soportes inertes..... | 17 |
| d. Materiales..... | 17 |
| e. Equipos..... | 19 |
| f. Procedimiento..... | 19 |
| f.1. Preparación del medio de cultivo..... | 20 |
| f.2. Preparación de soluciones para esterilización..... | 21 |
| f.2.1. Preparación de alcohol al 70%..... | 21 |
| f.2.2. Preparación de Hipoclorito de Sodio al 2.5 %..... | 22 |
| f.3. Siembra in Vitro de semillas de mortiño..... | 22 |
| f.4. Primer subcultivo..... | 23 |
| f.5. Segundo subcultivo..... | 24 |
| f.6. Tercer subcultivo..... | 24 |
| 5.- Estudio de costos..... | 25 |
| 5.1. Estaquillado..... | 25 |
| 5.2. Microestacas..... | 26 |
| 5.3. Germinación in Vitro..... | 27 |
| 6.- Resultados..... | 29 |
| 6.1. Estaquillado..... | 29 |
| 6.2. Microestacas..... | 30 |
| 6.3. Germinación de semillas in Vitro..... | 31 |
| 7.- Conclusiones..... | 33 |
| 8.- Recomendaciones..... | 35 |
| 9.- Anexos..... | 36 |

| | |
|------------------------|----|
| 10.- Glosario..... | 37 |
| 11.- Bibliografía..... | 40 |

INDICE DE FOTOS

| | |
|---|----|
| Foto 1.- Mortiño: fruto..... | 1 |
| Foto 2.- Mortiño: flor y fruto..... | 5 |
| Foto 3.- Estaca de mortiño..... | 11 |
| Foto 4.- Recipiente plástico con microestacas..... | 14 |
| Foto 5.- Materiales utilizados en germinación in Vitro..... | 21 |
| Foto 6.- Mortiño in Vitro..... | 23 |
| Foto 7.- Estaca viva de mortiño..... | 30 |
| Foto 8.- Microestacas muertas..... | 31 |
| Foto 9.- Semillas germinadas (vista aérea)..... | 31 |
| Foto 10.- Plántulas de mortiño in Vitro..... | 32 |
| Foto 11.- Mortiño: flor..... | 36 |
| Foto 12.- Mortiño: fruto..... | 36 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Estudio de costos de estaquillado..... | 25 |
| Tabla 2: Estudio de costos de microestacas..... | 26 |
| Tabla 3: Estudio de costos de germinación in Vitro..... | 27 |

1.- INTRODUCCIÓN

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), de la familia *Ericaceae*, llamado también uva de monte, es una fruta nativa de los páramos ecuatorianos. (Loján, 2003). (Foto 1)



Foto 1.- Mortiño: fruto

Crece en el norte de Sudamérica y es similar en su forma al *V. ovatum* de Norteamérica, *V. corfertum* Kunth de México y *V. consanguineum* Klotzch del sur de México y América Central.

Para el nombre científico se utilizó la palabra *Vaccinium* que proviene del latín "vaccinus", que significa vaca; aunque la relación entre el mortiño y las vacas parezca rara se piensa que se nombró al arbusto así, ya que estos mamíferos se alimentaban de este fruto.

Esta fruta se desarrolla de forma silvestre en los campos y montañas; pero, no se ha establecido como cultivo comercial. Se lo puede encontrar en las partes altas de la

Cordillera, es decir en los páramos que van desde El Ángel en la provincia del Carchi hasta El Tambo en la provincia del Cañar.

En el exterior, el mortiño ecuatoriano es conocido como *Andean Blueberry* y se cree que es una especie a la que se mejoró para obtener el *blueberry*; por lo que hay que aclarar que estas dos plantas tienen el mismo género pero la especie es diferente.

El principal productor, consumidor e importador mundial de blueberries es Estados Unidos y le sigue Canadá. Importan la fruta durante todo el año, aunque es mayor en el otoño. Chile, Nueva Zelanda, Argentina y México son los principales proveedores de blueberry para estos países. De acuerdo con datos estadísticos se sabe que Chile exportó 2`347.517 Kg. de blueberry cultivado en el año 2000 a Estados Unidos, mientras que en ese mismo año no se importó nada de Argentina.

Japón y algunos países de Europa son consumidores de blueberry pero en menor escala. El blueberry tiene la ventaja que se encuentra en el mercado por casi ocho meses, contrario a *Andean Blueberry* que solo lo hace por dos meses, los mismos que son Octubre y Noviembre.

En épocas pasadas este producto tenía importancia dentro de la alimentación ecuatoriana y era muy común encontrarlo por los campos de la sierra, pero con el pasar de los tiempos su consumo ha disminuido y la planta también ha comenzado a desaparecer.

De esta fruta se logra una sola cosecha al año que va de octubre a noviembre; se lo consume en fresco y cabe señalar que su mayor demanda es por el Día de los Difuntos (Noviembre 2) para preparar la colada morada. (Loján, 2003)

Durante el año se puede conseguir mortiño, aunque con un costo elevado, en lugares cercanos a los páramos, por ejemplo en Machachi pero en pequeñas cantidades; en la provincia de Imbabura es un poco más factible adquirir la fruta. Es casi imposible hacerlo en Quito o ciudades más distantes. Usualmente lo venden por libra y en la fecha actual tiene el valor de 2 dólares por libra.

2.- JUSTIFICACIÓN

No existe el cultivo comercial de esta fruta, lo que se debe a que tampoco se cuenta con un método para propagar las plantas, ya que como se mencionó anteriormente, estas crecen de manera silvestre en los páramos del país.

El *Andean blueberry* es más pequeño que el *blueberry*, pero al lograr obtener plantas para establecer un cultivo comercial la diferencia de tamaño no importaría, ya que se lo presentaría al mercado mundial con la debida especificación de que no es la misma fruta; pero como en todo producto, este debe ser de calidad, lo que en gran parte depende de las plantas de donde se coseche la fruta y porque no decir de la poscosecha también.

En el país, esta fruta tiene acogida en una época específica del año y siempre para el mismo uso; sin embargo, se podría ampliar el consumo si a este producto se lo destinara para la agroindustria, como pueden ser mermeladas, jugos, pasteles, comida para bebés, etc; de la misma forma que se hace con el *blueberry*. De esta manera, la demanda aumentaría, ya que no todas las personas consumen la tradicional colada morada; es decir, que se lo trataría de introducir a nivel nacional y no solo en la región andina como hasta ahora ha sido. Cabe mencionar que en una porción de 142 gr. de mortiño se puede encontrar un aporte nutricional de 1% de grasas, 9% de carbohidratos, 14% de fibra y 15% de vitamina C.

Si se encontraría un método adecuado para propagar esta planta y de esa manera establecer un cultivo comercial, se podría explotar al mortiño como cultivo nuevo para una gran parte de la población, ya que posee muchas ventajas; por ejemplo, no presenta problemas fitosanitarios mayores, no se han reportado plagas o enfermedades que ataquen al cultivo ya que es muy resistente. Se lo podría exportar sin mayores problemas ya que no se ve afectado por la mosca de la fruta. En la industria tiene la ventaja de que no necesita ser cortado o pelado, por lo que es de uso sencillo y no produce pérdidas ya que se explota todo el producto.

Aparte de las ventajas que presenta esta fruta como tal, es necesario señalar que al encontrar un adecuado método de propagación y por ende lograr domesticar a la planta, se podría cultivarla de manera que exista producción durante la mayor parte de año y no solo

en los meses ya especificados; por lo que se pensaría en la posibilidad de exportarla ya que al ser un cultivo relativamente nuevo para un gran grupo de personas, se diría que tiene futuro.

Estudios realizados han demostrado que esta fruta es muy buena para la medicina natural; sirve para tratar irritaciones en la boca, garganta o encías; para esto se hierve la fruta en agua y el líquido se utiliza para hacer gargarismos. (Loján, 2003)

Es casi imposible creer que el mortiño nacional desplace al blueberry y no se trata de eso, el presente estudio, pretende desarrollar un posible método para su propagación y de esa manera, poder domesticarlo, con la visión de obtener una fruta de calidad.

3.- OBJETIVOS



Foto 2.- Mortiño: Flor y fruto

3.1.- Objetivo general

Desarrollar un sistema adecuado de propagación de plantas de mortiño, con la visión de poder producirlo comercialmente.

3.2.- Objetivos específicos

- Obtener un protocolo adecuado para desarrollar plantas in Vitro.
- Determinar la factibilidad de producir plantas mediante el uso del método vegetativo de estacas.
- Analizar el método de propagación con micro - estacas, como una posible técnica de enraizamiento para obtener plantas de mortiño a partir de estos pequeños esquejes.
- Estimar los costos de producción de plantas por cada uno de los tres métodos.

4.- ESTUDIO TÉCNICO

4.1.- Localización geográfica

La Unidad de Producción Agropecuaria (UPA), donde se desarrolló una parte de la investigación, se encuentra en la Parroquia El Chaupi, Cantón Mejía, Provincia de Pichincha. Geográficamente se localiza entre los 0°35'00" latitud Sur y 78°40'00" longitud Oeste; el terreno tiene una topografía plana en un 98% y ligeramente ondulada en un 2%.

La propiedad esta ubicada en las estribaciones de la cordillera occidental hacia la subida al cerro Corazón, donde cuenta con una conformación ecológica de bosque Húmedo Montano Bajo y tiene un promedio anual de precipitaciones entre los 1000 a 2000 mm y registra una temperatura media anual entre los 12 y 18 ° C.

Los suelos a altitudes superiores a los 3000 m.s.n.m. y en pendientes de volcanes son arenosos de color negro, de textura franco arenosa fina, con una capacidad de retención de agua menor al 20 %. Se cultiva sobre estos suelos principalmente pastizales y papas.

La vegetación natural en las partes montañosas de esta zona está compuesta por especies como: sarar (*Weinmania sp*), guabisay (*Podocarpus sp*), arrayán (*Arrayan eugenia sp*). En sitios de derrumbes o intervención humana se desarrolla aliso (*Aliso agnus*), guarumo (*Cecropia spp*) y bambú (*Chusquea sp*). En arbustos se encuentra: chilca (*Baccharis spp*), huántug (*Datura sp*) y lechero (*Euphorbia sp*). Los principales pastizales son: kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y ryegrass (*Lolium sp*).

Las condiciones climáticas de esta formación vegetal son favorables para la agricultura y ganadería, aunque no está exenta de heladas, sobre todo en las madrugadas durante el verano. Se desarrolla en esta formación los cultivos de maíz, papas, trigo; lo que se realiza principalmente por pequeños productores. Los sectores de grandes haciendas se dedican a la ganadería de leche.

Otra parte de la investigación se llevó a cabo en dos de los laboratorios de la Universidad San Francisco de Quito; los mismos que fueron el Laboratorio de Biotecnología y el de Manejo Integrado y Desarrollo Vegetal.

El laboratorio de Biotecnología consta con el equipo y material que fue necesario para realizar la investigación. En su interior tiene un cuarto de cultivo que posee las condiciones de luz, temperatura y humedad requeridas para el desarrollo de una parte de la experimentación; el cuarto de cultivo tiene una temperatura promedio de 25 a 28 ° C, una humedad relativa que oscila entre 73 y 75%; a esto se le suma la luz fluorescente que ayuda a que esta habitación permanezca abrigada.

Por otra parte está el laboratorio de Manejo Integrado y Desarrollo Vegetal, que al igual que el laboratorio antes señalado posee todos los materiales y facilidades necesarias para llevar a cabo parte de la experimentación de esta investigación.

Es importante señalar que la Universidad se encuentra en el Valle de Cumbayá a 2400 m.s.n.m.; a quince minutos de distancia de la ciudad de Quito.

4.2.- Métodos de propagación.

La fruta del presente estudio es el mortiño criollo que se encuentra en los páramos ecuatorianos, el mismo que es llamado *Andean Blueberry*; es importante señalar que en el país existe también otro mortiño que es el *V. crenatum* que es muy similar el *V. floribundum*, pero es más grande y rastrero. (Loján, 2003)

Para el desarrollo de esta investigación se probaron tres posibles métodos, los que tenían la finalidad de encontrar una vía adecuada para domesticar la fruta y convertirla en un cultivo comercial; dos de ellos correspondieron a propagación vegetativa, es decir asexual y el tercero fue germinación de semillas in Vitro, que vendría a ser reproducción sexual.

4.2.1.- Propagación vegetativa

4.2.1.1.- Estaquillado

Este tipo de multiplicación antigua es uno de los métodos más comunes de obtención de plantas; esta técnica señala que al tomar una parte vegetativa de la planta, en este caso se puede hablar de ramas, y colocarla en un medio adecuado se puedan originar raíces y por ende una nueva planta completa. (Calderón, 1993)

Como toda propagación, el estaquillado tiene aspectos favorables y desfavorables, por lo que es de importancia señalarlos; por lo que entre las ventajas se puede encontrar:

- Obtención de un clon, es decir una planta que posea todas las características de la madre para perpetuar el genotipo.
- Uniformidad en las plantas.
- Reproducción de plantas con difícil acceso a las semillas.
- Disminución de tiempo en la obtención de plantas.
- Procedimiento sencillo.
- Producción de un gran número de plantas a partir de una sola.
- Requerimiento de un pequeño espacio físico.
- Costo relativamente bajo. (Guzmán, 1988; Calderón, 1993)

Como se puede ver, los beneficios de este método son varios, pero siempre se encuentra pequeños inconvenientes, entre los que se puede citar:

- Bajo nivel de prendimiento en algunas especies.
- No se logra precocidad.
- Difícil acoplamiento de la nueva raíz a condiciones adversas. (Calderón, 1993)

La selección de una estaca depende del criterio de quien realice el experimento, por lo que se ha dividido en tres categorías que son:

1. De acuerdo con la parte seleccionada: rama, raíz, hoja.

2. De acuerdo con su estado: lignificado o herbáceo.
3. De acuerdo a la época del año: invierno, verano, otoño, primavera. (Lecourte, 1989)

a. Materiales

- Planta madre de mortiño
- Estacas
- Tierra negra de páramo
- Tierra tratada
- Enraizador (Hormonagro # 1)
- Enraizador (Hakaphos)
- Fundas plásticas pequeñas
- Agua
- Recipiente desechable
- Guantes
- Rotulador

b. Procedimiento

Como ya se ha mencionado, para esta parte de la investigación se utilizaron estacas provenientes de ramas. Pero al no tener un protocolo establecido para este arbusto se optó por seguir un método aplicado en la mayor cantidad de plantas que se reproducen de esta forma.

En el mes de enero del año 2004 se comenzó con la propagación de plantas de mortiño por medio de estacas, en el sector del Chaupi en el cantón Mejía. Se hicieron pruebas con sesenta estacas, las mismas que se dividieron en cuatro grupos de 15 para ser sometidas a diferentes tratamientos y de esa manera comprobar cual de los métodos es mejor para el enraizamiento.

Primer grupo.- Las primeras 15 estacas se tomaron de una planta madre proveniente del sector del Chaupi. Cada una de ellas fue tratada con un enraizador, en este caso Hormonagro, y plantada en tierra de páramo.

El primer paso fue la preparación del enraizador; este químico posee en su composición una hormona, la auxina que promueve la formación de raíces. Como este viene en polvo fue necesario colocarlo en un recipiente desechable para disolverlo en una proporción de 3 a 1, es decir, por cada tres porciones del químico se debe añadir una de agua; de esta manera se obtuvo una solución bastante espesa. Este procedimiento se debe hacer con mucho cuidado ya que el producto es un poco tóxico; se recomienda eliminar el sobrante del preparado. (Vademécum Agrícola, 2000)

Posterior a esto, en fundas plásticas se colocó tierra negra cernida de páramo, del propio lugar donde se desarrollan estas plantas. Se tomó cada una de las estacas que tenían un largo aproximado de 25 centímetros, a las que se les sacó la mayoría de sus hojas y se sumergió alrededor de 2.5 cm. de su base en la mezcla del enraizador antes preparado; luego se procedió a colocarlas en las fundas contenían la tierra a una profundidad de unos 10 cm. (Foto 3)

Las quince fundas con estacas fueron rotuladas y colocadas en un lugar apropiado donde recibían sol y estaban protegidas de la lluvia, granizo y heladas que son características de este sector.

Segundo grupo.- Las siguientes 15 estacas recibieron el mismo tratamiento antes señalado pero la variante fue que en lugar de utilizar tierra negra, se usó una tierra tratada que viene con humus y arena de río; se utilizó también Hormonagro y se rotuló las fundas.

Tercer grupo.- Se tomaron otras 15 estacas y se las colocó en tierra de páramo pero lo que varió en este procedimiento fue el enraizador. Se utilizó Hakaphos, que en estructura es similar al Hormonagro y también posee auxinas. Con este también se procedió con la proporción 3 a 1. Y lo demás se siguió de la manera señalada en el primer grupo.



Foto 3.- Estaca de mortiño

Cuarto grupo.- Finalmente se tomaron las últimas 15 estacas y se colocaron en la tierra con nutrientes. Estas fueron tratadas con Hakaphos, y se las rotuló como a todas.

Como se puede ver, el procedimiento fue el mismo, lo que varió fue el material utilizado; con esto se quería averiguar si alguno de estos elementos contribuye en un mejor desarrollo de la planta o no interviene en nada. Estas estacas permanecieron en observación por un período aproximado de 2 meses, con la finalidad de comprobar si se regeneraban y daban como resultado nuevas plantas.

4.2.1.2- Propagación por microestacas

El método de propagación por microestacas se refiere a una técnica aséptica y controlada que se caracteriza por la reproducción de plantas a través de órganos de las mismas como

pueden ser tallos o ramas. Esta técnica requiere del uso de laboratorios y también de los equipos necesarios para poder realizar un control adecuado del desarrollo de la planta.

Tiene la finalidad de programar la producción de las plantas para todo el año, es decir que se elimina la estacionalidad ya que al ser un método de cultivo controlado y de laboratorio, se puede ensayar y aplicar elementos que hagan que el crecimiento y desarrollo de la planta sea más rápido y uniforme.

Una de las principales desventajas que muestra este procedimiento está relacionada con los costos elevados que representa su ejecución, lo que se debe muchas veces a que el cultivo no amerita tanto gasto. A esto se suma el hecho de que pueden aparecer organismos patógenos y enfermedades que han sido desconocidas y que pueden proliferar.

Este tipo de reproducción tomó el nombre de cultivo de puntas de tallo, el mismo que se parece a la reproducción por estacas con la diferencia que esto se realiza en un medio esterilizado y con microestacas es decir, con pequeñas porciones de tallos o ramas. El tamaño de los elementos puede variar entre 0.1 mm. hasta mayores de 2 cm., en donde se utilizan puntas meristemáticas o tallos con hojas inmaduras respectivamente. (Hartmann, 1982)

Se puede decir que la multiplicación por este método depende básicamente de las hormonas que se utilicen, principalmente de las auxinas y citoquininas. Las auxinas tienen la finalidad de enraizar las estacas mientras que las citoquininas están relacionadas directamente con la división celular. (Pérez, 1994)

a. Materiales

- Microestacas de mortiño
- Turba
- Recipientes plásticos con tapa
- Alcohol al 70 %
- Alcohol al 96 %

- Algodón
- Mascarilla
- Hipoclorito de Sodio
- Vasos de precipitación
- Pipetas graduadas
- Enraizador – Hormonagro # 1
- Citoquinina – Citoquin
- Nitrofosca foliar
- Agua destilada y autoclavada

b. Equipos

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Cuarto de almacenamiento

c. Procedimiento

Como ya se explicó anteriormente, la micropropagación que se efectuó por medio de puntas de tallo se desarrolló de la siguiente manera:

En el laboratorio de Manejo Integrado y Desarrollo vegetal se esterilizó la turba en el autoclave, para lo que fue necesario colocar dentro de la misma varios vasos de precipitación que contenían turba; todo el tratamiento duró aproximadamente una hora. Es importante señalar que también se autoclavó el agua destilada. Para lograr la esterilización se debió llegar a una temperatura de 121°C.

Una vez estéril la turba, se la dejó enfriar y se la transfirió hacia la cámara de flujo laminar que estuvo previamente encendida y desinfectada con alcohol al 70 %, ahí se colocó la turba en cuatro recipientes de plástico de color negro que tenían tapas transparentes, lo que facilitó el control del cultivo; estos plásticos fueron desinfectados dentro de la cámara de flujo laminar con alcohol al 70 % para evitar algún tipo de contaminación.

En cada recipiente se colocaron 30 microestacas que tenían una longitud aproximada de 4 cm. Estos elementos fueron tomados de las partes superiores de las ramas de plantas madre de mortiño. En el laboratorio se los lavó con agua corriente para eliminar la tierra y en ese momento se sacaron las hojas que estaban en exceso.

Luego se las llevó en frascos a la cámara de flujo donde se las lavó con agua destilada estéril y posterior a esto se sometió a una desinfección, por no más de 30 segundos, con hipoclorito de sodio a una concentración de 2.5 %, se eliminó el hipoclorito de sodio y se lavó con agua destilada estéril.

Después de esta desinfección se colocó en la base de la pequeña estaca un poco de hormonagro, que es un enraizador que en su composición posee auxinas y se plantó cada una de las estacas en los cuatro recipientes, siguiendo este mismo procedimiento. (Foto 4)



Foto 4.- Recipiente plástico con microestacas

Una vez plantadas las 120 microestacas se preparó una solución que tenía fertilizante y otra que tenía el fertilizante combinado con la citoquinina.

El fertilizante sólido que se utilizó fue Nitrofosca foliar. Se colocó 1.29 gr. de nitrofosca en medio litro de agua destilada estéril y se aplicó de manera foliar a dos de los recipientes. A los otros dos recipientes se los aplicó la misma solución pero con la adición de 0.5 ml de citoquinín líquido que es la citoquinina, con la idea de provocar la formación de nuevo brotes. (Esta aplicación se realizó por dos meses, una vez por semana).

Los recipientes fueron llevados al cuarto de almacenamiento y permanecieron ahí alrededor de 60 días.

4.2.2.- Reproducción Sexual

4.2.2.1.- Germinación de semillas in Vitro

La germinación in Vitro es un método que tiene la finalidad de producir nuevas plantas mediante el aislamiento de semillas y la subsiguiente siembra de las mismas en un medio que posea los nutrientes adecuados que les permita crecer y desarrollarse hasta lograr una planta completa.

Este medio debe poseer todos los elementos nutritivos que se encuentran en la tierra; en otras palabras, la planta debe estar creciendo en un ambiente que le proporcione lo que requiere como en su hábitat natural, en el campo.

Este método tiene la finalidad de producir miles de plantas iguales a la madre en un medio totalmente aséptico, es decir, libre de cualquier tipo de contaminantes y en corto tiempo; pero con la posibilidad de que después de un período de desarrollo adecuado de la planta, se la pueda aclimatizar; es decir, que deben tener la capacidad de habituarse a la tierra cuando se realice el trasplante.

El cultivo in Vitro puede generar plantas desde células o secciones de tejidos, esto se debe al hecho de que las células de las plantas son totipotentes, lo que significa que tienen la capacidad de generar una planta de una sola célula, con lo que se puede comprobar que las plantas nuevas serán iguales a la progenitora; para lo que se le debe proveer a la célula de condiciones externas adecuadas.

Algunas de las ventajas de este método de propagación son:

- Obtención de plantas en un corto período de tiempo
- Propagación de plantas sin enfermedades
- Disminución del área de cultivo.
- Eliminación de la estacionalidad de los cultivos.
- Propagación de especies en vías de extinción.
- Producción de plantas que con los métodos tradicionales no se propagan.

- Obtención de nuevas características en plantas.
- Utilización de pequeñas cantidades de material vegetal.

Se pueden considerar también algunos factores que limitan este método, y son:

- Costo elevado por cada planta
- Se requiere de personal capacitado
- Problemas en la aclimatización de las plantas
- Pérdida en la diversidad.
- Problemas en la formación de raíces. (Torres, L. 2004 *)

Para el cultivo in Vitro es importante señalar que el medio de cultivo debe poseer elementos que son fundamentales para la planta, los que son:

a. Sales inorgánicas.- Aquí se encuentran los macronutrientes que son: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio. También intervienen elementos como el boro, cobalto, cobre, manganeso, yodo, hierro y zinc que corresponden a los micronutrientes. De estos dos grupos se forman soluciones concentradas por separado, las que deben ser almacenadas en un refrigerador.

En este trabajo se utilizaron las soluciones de Murashige y Skoog (1962), es decir el medio conocido como MS, el mismo que contiene la concentración de sal más alta con respecto a otros medios. Es importante señalar que el hierro se prepara por separado en forma de quelato; esto se realiza porque tiende a formar precipitados; y debe ser guardado en frascos oscuros. (Hartmann, 1982)

b. Compuestos orgánicos.- Se puede hablar básicamente de dos tipos de compuestos que son:

b.1. La fuente de carbono, como la *sacarosa*, que debe estar en un rango del 1 al 5 % con respecto a la cantidad de medio que se va a preparar.

* Comunicación personal.

b.2. Hormonas y reguladores de crecimiento.- Llamados también fitohormonas y entre las más importantes se puede mencionar: auxinas, citoquininas y giberelinas.

Las auxinas son sustancias que se relacionan con el ácido indolacético (IAA); estos reguladores tiene la finalidad de estimular la formación de raíces adventicias y laterales; intervienen en el cuajado de los frutos, producen elongación de las células y ensanchamiento de los tejidos; así como retardan la abscisión de hojas y frutos, etc. En la agricultura es muy utilizada para el enraizamiento de estacas.

Las citoquininas están relacionadas con la división celular, promueven la inducción de retoños adventicios y axilares, a la vez que impiden el desarrollo de raíces.

Las giberelinas son hormonas que se relacionan con el ácido giberélico, y tienen la finalidad de sustituir las necesidades de frío; inducen la partenocarpia, retrasan la maduración de los frutos; provocan la elongación del tallo; interviene en el crecimiento de yemas y meristemas, y también estimulan la germinación de semillas. (Pérez, 1994)

b.3. Vitaminas.- Para algunos tejidos vegetales, generalmente están presentes las tiamina, piridoxina, el ácido nicotínico y el inositol. A estos se les puede sumar el ácido pantoténico y la biotina. Estas vitaminas son solubles en agua y se preparan en soluciones concentradas.

c. Soportes inertes.- Aquí se encuentra el agar; este es un polvo que proviene de algunas especies de algas rojas. Al unirse con el agua, este forma una especie de gelatina que tiene la capacidad de absorber nutrientes, los mismos que serán el alimento de la planta que se colocará sobre este medio. El agar se utiliza cuando el medio de cultivo es sólido ya que al calor se derrite, pero a temperatura ambiente se hace semisólido; este no aporta nutrientes, pero brinda soporte a la nueva planta. (Hartmann, 1982)

d. Materiales

1. Semillas de mortiño
2. Medio MS

Macronutrientes

| Sustancia | Solución stock (gr/lt) | MS (mg/lt) |
|--------------------------------------|------------------------|------------|
| NH ₄ NO ₃ | 16,5 | 1,65 |
| KNO ₃ | 19,0 | 1,9 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 4,4 | 440 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 3,7 | 370 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,7 | 170 |

Micronutrientes

| Sustancia | Solución stock (mg/lt) | MS (mg/lt) |
|---|------------------------|------------|
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 2.230,0 | 22,3 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 860,0 | 8,6 |
| H ₃ BO ₃ | 620,0 | 6,2 |
| KI | 83,0 | 0,83 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 25,0 | 0,25 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 2,5 | 0,025 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 2,5 | 0,025 |
| FeSO ₄ ·H ₂ O | 2.780,0 | 27,8 |
| Na ₂ EDTA | 3.730,0 | 37,3 |

Vitaminas

| Sustancia | Solución stock (gr/lt) | MS (mg/lt) |
|------------------|------------------------|------------|
| Ácido nicotínico | 0,01 | 0,5 |
| Tiamina | 0,002 | 0,1 |
| Piridoxina | 0,01 | 0,5 |
| Mio inositol | 2 | 100 |
| Glicina | 0,04 | 2 |

Hierro.- 10 ml/lt

Agar Sigma.- 7 gr/lt

Azúcar.- 30 gr/lt

3. Medio AM.- Corresponde a la mitad de la cantidad de los elementos del medio MS; excepto el agar.
4. Agua destilada
5. Agitador magnético
6. Hidróxido de sodio
7. Matraz
8. Probetas graduadas

9. Alcohol al 70 %
10. Alcohol al 96 %
11. Algodón
12. Mascarilla
13. Hipoclorito de Sodio
14. Tween 20
15. Frascos de 250 cc
16. Vasos de precipitación
17. Bisturí
18. Pinzas
19. Mechero
20. Tamiz
21. Caja petri
22. Ligas
23. Plástico
24. Giberelinas – GA3
25. Jeringuilla
26. Filtro miliporo
27. Micropipetas
28. Puntas de micropipetas

e. Equipos

1. Autoclave
2. Cámara de flujo laminar
3. Cuarto de cultivo

f. Procedimiento

Se realizó el cultivo in Vitro de semillas de mortiño. El medio de cultivo que se usó fue el de Murashige y Skoog (MS), el mismo que contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta. Además de este medio se utilizó el AM que en su composición contiene la mitad de todos los elementos que se encuentran en el MS.

- Es necesario tomar en cuenta que todo el siguiente procedimiento requiere de mucha asepsia ya los materiales se pueden contaminar fácilmente, por lo que es recomendable la utilización de un mandil y una mascarilla, a lo que se suma el lavado de manos y la desinfección de las mismas con alcohol.

f.1. Preparación del medio de cultivo.

Se utilizaron dos medios de cultivo diferentes, uno fue el MS y el otro fue AM. En doce frascos de vidrio de 250 cc se colocó de manera equitativa 25 ml. respectivamente. (Pierik, 1990)

Para la elaboración de 1lt del medio MS:

- ❑ Con la ayuda de probetas graduadas, en un vaso de precipitación, se colocaron las soluciones stock preexistentes en las siguientes cantidades: 100 ml de MS macro elementos, 50 ml de MS de compuestos orgánicos, 10 ml de micro elementos, 10 ml de hierro que va como un quelato y 30 g de sacarosa.
- ❑ A la solución formada se le agregó alrededor de 300 ml de agua destilada, y se le colocó un agitador magnético para uniformizar la mezcla.
- ❑ La solución formada debía tener un pH de 5.8, pero al realizar la medición del mismo se observó que este era menor (pH 3.75) por lo que se utilizó NaOH para subir el pH hasta que llegó a 5.8. (Cada vez que se use y deje de usar el medidor de pH hay que lavarlo con agua destilada).
- ❑ El preparado se colocó en un matraz que contenía 7 gr. de agar Sigma y se lo aforó con agua destilada.
- ❑ Se taparon los Erlenmeyers pero no muy ajustados y se llevaron a esterilizar por un tiempo de alrededor de 20 minutos en el autoclave a 121°C.
- ❑ Después de este tiempo se sacaron del autoclave y se los dejó enfriar.
- ❑ Mientras los Erlenmeyers se enfriaban, se esterilizó la cámara de flujo laminar con alcohol. (Foto 5)
- ❑ Dentro de la cámara de flujo laminar ya esterilizada se colocaron frascos de vidrio con tapa que previamente habían sido esterilizados y se colocó en ellos el medio de

cultivo elaborado. La cantidad colocada fue alrededor de 25 ml. Luego se procedió a tapar el frasco

- Una vez tapados los frascos se los sacó de la cámara, se los etiquetó, y finalmente se los llevó al cuarto de cultivo donde se encontraban unos anaqueles destinados para estos preparados.

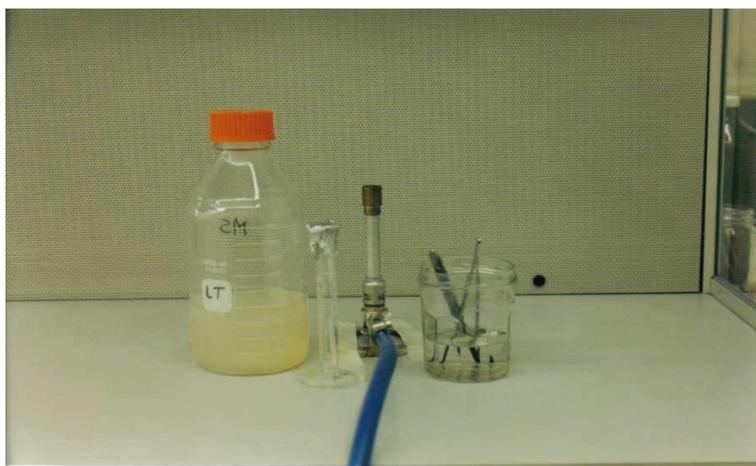


Foto 5.- Materiales utilizados en germinación in Vitro

Para elaborar 1 lt del medio AM se siguió el mismo procedimiento que con MS, lo que varió fueron las cantidades del medio de cultivo, las mismas que tuvieron los siguientes valores:

- 50 ml de MS macro elementos, 25 ml de MS de compuestos orgánicos, 5 ml de micro elementos, 5 ml de hierro que va como un quelato, 15 g de sacarosa y finalmente 7 gr. de agar.
- Al mezclar los componentes de este medio de cultivo se obtuvo un pH de 4.6. el mismo que se subió a 5.82 con NaOH.

f.2. Preparación de soluciones para esterilización

f.2.1. Preparación de Alcohol al 70 %

Para obtener este alcohol se utilizó un alcohol existente al 96 %, el mismo que se diluyó con agua destilada para bajar su concentración a 70 %.

f.2.2. Preparación de Hipoclorito de Sodio al 2.5 %

Para obtener este Hipoclorito de Sodio se utilizó uno ya existente al 5 % y se lo diluyó hasta obtener la concentración requerida.

f.3. Siembra in Vitro de semillas de mortiño

- ❑ En la cámara de flujo laminar, que previamente debió ser limpiada y puesta a funcionar, se colocaron todos los materiales estériles a utilizarse dentro de cámara y se procedió a realizar el trabajo.
- ❑ Se tomaron las semillas y se las colocaron en un vaso de precipitación, se les agregó alcohol al 70% hasta cubrirlas, y se dejó ahí por tres minutos.
- ❑ Pasado ese tiempo se procedió a lavar las semillas con agua destilada estéril, para lo que previamente se debió eliminar el alcohol.
- ❑ Una vez lavadas las semillas se eliminó el agua y se colocó Hipoclorito de Sodio al 2.5%, el mismo que se le agregaron alrededor de 5 gotas de “Tween 20”, ahí permanecieron sumergidas las semillas por 15 minutos.
- ❑ Al cabo de los 15 minutos se eliminó el Hipoclorito de Sodio y se procedió a lavar las semillas, las que fueron colocadas en un tamiz que se desinfectó con alcohol; se hicieron cinco lavados con la finalidad de eliminar completamente el Hipoclorito de Sodio y el “Tween 20” que se pudo haber quedado en las semillas.
- ❑ Cuando las semillas ya estuvieron lavadas se las tomó con una pinza que fue flameada con alcohol en el mechero para esterilizarla y se las colocó en los frascos que contenían el medio de cultivo. Fueron puestas de forma superficial hasta que el fondo del frasco quedó cubierto. Se colocaron en seis frascos las semillas, en cuatro de MS y el dos de AM; no se puede precisar la cantidad exacta de semillas puestas, pero se estimó que en cada frasco se pusieron alrededor de 50 semillas.
- ❑ Después de la siembra se cubrió la abertura de los frascos con papel plástico el mismo que fue asegurado con una liga, se los identificó y se los transfirió al cuarto de cultivo donde las semillas se desarrollarían.

f.4. Primer subcultivo

Dos meses después de la siembra de las semillas se estimó que más del 95 % de ellas germinaron. Tanto en el medio MS como en el AM, las nuevas plantas habían alcanzado una altura de 0.5 cm. (Foto 6), es decir que no se desarrollaron mucho, pero se pudo ver que las sembradas en AM eran un poquito más grandes que las sembradas en el otro medio. Debido a su escasez de tamaño se decidió hacer subcultivos, y se estableció que se harían en el medio AM; para lo que se procedió de la siguiente manera:

- Una vez encendida y desinfectada la cámara de flujo laminar, se colocaron en la misma todos los materiales estériles a utilizarse.
- De los frascos que contenían las plántulas de mortiño se retiró el plástico.
- Con una pinza desinfectada se tomó con cuidado una plántula y se introdujo una sección del tallo de la planta en un nuevo frasco que contenía el medio AM; y de la misma forma se procedió con 20 plántulas más.
- Finalmente se cubrió la abertura de los frascos con papel plástico el mismo que fue asegurado con una liga, se los identificó y se los transfirió al cuarto de cultivo donde las semillas se desarrollarán.

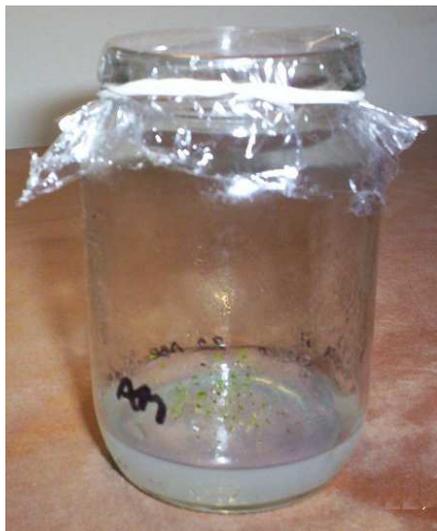


Foto 6.- Mortiño in Vitro

f.5. Segundo subcultivo.

Aproximadamente a los 45 días del primer subcultivo se pudo apreciar que las plantas no habían crecido mucho, por lo que se decidió agregarle al medio de cultivo, por separado, giberelinas en las siguientes cantidades: 0.5 ppm; 1 ppm; 2 ppm; 3 ppm; 4 ppm; 5 ppm y 10 ppm.

Después de hacer los siete cálculos se supo que se necesitaba alrededor de 3 ml de la hormona; la misma que fue tomada con una jeringuilla desde el recipiente que la contenía, luego se la filtró con un filtro miliporo y se depositó la hormona en un vaso de precipitación; posterior a esto, con las micropipetas se tomó la cantidad señalada y se colocó en el medio AM respectivo. Y se procedió de la misma forma que ya se señaló en el subcultivo anterior, con la diferencia de que en cada frasco se colocaron solamente 3 plantas de las que germinaron en la primera siembra. Se debe señalar que no es posible autoclavar esta hormona, por que se pierde en su mayoría, por esta razón solo se filtra.

f.6. Tercer subcultivo

15 días después del anterior subcultivo se vio que la cantidad de hormonas utilizadas anteriormente no tuvo ningún efecto por lo que se decidió aplicar cantidades mayores, que fueron 20 ppm, 30 ppm y 50 ppm. Se realizó el mismo procedimiento que en el subcultivo previo, con la diferencia que la cantidad de hormonas requerida aumento, ya que se necesitó casi 8 ml de giberelina filtrada.

5.- ESTUDIO DE COSTOS

5.1. Estaquillado

Tabla 1.- Estudio de costos del estaquillado

| MATERIALES DIRECTOS | | | | |
|----------------------------------|--------------|----------|--------------|--------------|
| | Unidades | Cantidad | V. unitario | V. total |
| Mortiño (estacas) | Estacas | 60 | 0,1 | 6 |
| Tierra negra de páramo | Tierra/funda | 30 | 0,184 | 5,52 |
| Tierra tratada | Tierra/funda | 30 | 0,25 | 7,5 |
| Fundas plásticas | Funda | 60 | 0,016 | 0,96 |
| Enraizador (Hormonagro 1) | Gramos | 10 | 0,029 | 0,29 |
| Enraizador (Hakaphos) | Gramos | 10 | 0,004 | 0,04 |
| Agua | Litro | 1 | 0,4 | 0,4 |
| Recipiente desechable | Recipiente | 1 | 0,2 | 0,2 |
| Par de guantes | Guantes | 1 | 1 | 1 |
| | | | Total | 21,91 |

| MANO DE OBRA DIRECTA | | | | |
|------------------------------|------------|-------------|-----------------|---------------|
| | Por día \$ | Por hora \$ | # horas | V. total/hora |
| Honorario del técnico | 80 | 10 | 2 | 20 |
| Jornal de obrero | 8 | 1 | 2 | 2 |
| | | | Total \$ | 22 |

| COSTOS INDIRECTOS | |
|----------------------|-----|
| Útiles de escritorio | 0,3 |
| Agua (2 meses) | 10 |

| | |
|---------------------------|--------------|
| TOTAL INVERTIDO \$ | 54,21 |
|---------------------------|--------------|

| | |
|--------------------------|---------------|
| COSTO UNITARIO \$ | 0,9035 |
|--------------------------|---------------|

5.2. Microestacas

Tabla 2.- Estudio de costos de microestacas

| DEPRECIACION DE EQUIPOS | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------|-----------|-------------|----------|----------|----------|-----------|---------|---------------|
| | Costo Histórico | Vida útil | % Dep. LRIT | Dep. año | Dep. mes | Dep. día | Dep. hora | # horas | V. utilizado |
| Autoclave | 3000 | 10 años | 10% | 300 | 25,0 | 0,83 | 0,035 | 0,017 | 0,035 |
| Cámara de flujo laminar | 12000 | 10 años | 10% | 1200 | 100,0 | 3,33 | 0,139 | | 1,389 |
| Balanza | 1000 | 10 años | 10% | 100 | 8,3 | 0,28 | 0,012 | | 0,012 |
| Cuarto de cultivo (8 meses) | 1000 | 20 años | 20% | 100 | 8,3 | 0,28 | | | 16,667 |
| Total \$ | | | | | | | | | 18,102 |

| MATERIALES | | | | |
|---------------------------|--------------|----------|-------------|----------------|
| | Unidades | Cantidad | V. unitario | V. total |
| Mortiño (microestacas) | Microestacas | 120 | 0,05 | 6 |
| Turba | kilogramo | 1 | 2,28 | 2,28 |
| Recipientes plásticos | Recipiente | 4 | 0,88 | 3,52 |
| Agua destilada | Litro | 1 | 0,4 | 0,4 |
| Alcohol | Litro | 2 | 1,25 | 2,5 |
| Algodón | Gramos | 30 | 0,5 | 0,5 |
| Hipoclorito de sodio | Litro | 0,25 | 6 | 1,5 |
| Enraizador (Hormonagro 1) | Gramos | 10 | 0,029 | 0,29 |
| Citoquin | mililitros | 0,5 | 0,23 | 0,115 |
| Nitrofosca | Gramos | 1,29 | 0,0013 | 0,00167 |
| Total \$ | | | | 17,1067 |

| OTROS INSUMOS | | | | |
|----------------------------------|----------|----------|-------------|-------------|
| | Unidades | Cantidad | V. unitario | V. total |
| Roseador plástico | Roseador | 1 | 3,5 | 3,5 |
| Probeta graduada | Probeta | 1 | 1,2 | 1,2 |
| Pipeta | Pipeta | 1 | 1,2 | 1,2 |
| Vaso de precipitación | Vaso | 8 | 4,5 | 36 |
| Total estimado de consumo | | | | 41,9 |
| 10 % valor estimado \$ | | | | 4,19 |

| MANO DE OBRA DIRECTA | | | | |
|-----------------------|------------|-------------|---------|---------------|
| | Por día \$ | Por hora \$ | # horas | V. total/hora |
| Honorario del técnico | 80 | 10 | 5 | 50 |

| COSTOS INDIRECTOS | |
|-------------------------|-----|
| Útiles de escritorio \$ | 0,2 |
| Luz (2 meses) \$ | 6,9 |

| | |
|---------------------------|---------------|
| TOTAL INVERTIDO \$ | 96,499 |
| COSTO UNITARIO \$ | 0,804 |

5.3. Germinación In Vitro

Tabla 3.- Estudio de costos de germinación in Vitro

| DEPRECIACION DE EQUIPOS | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------|-----------|-------------|----------|----------|----------|-----------|---------|---------------|
| | Costo Histórico | Vida útil | % Dep. LRIT | Dep. año | Dep. mes | Dep. día | Dep. hora | # horas | V. utilizado |
| Autoclave | 30000 | 10 años | 10% | 3000 | 250,0 | 8,33 | 0,347 | 0,174 | 0,347 |
| Cámara de flujo laminar | 12000 | 10 años | 10% | 1200 | 100,0 | 3,33 | 0,139 | | 1,389 |
| Agitador eléctrico | 500 | 10 años | 10% | 50 | 4,2 | 0,14 | 0,006 | | 0,006 |
| pH-metro | 3000 | 10 años | 10% | 300 | 25,0 | 0,83 | 0,035 | | 0,035 |
| Balanza | 1000 | 10 años | 10% | 100 | 8,3 | 0,28 | 0,012 | | 0,012 |
| Micropipetas | 300 | 10 años | 10% | 30 | 2,5 | 0,08 | 0,003 | | 0,003 |
| Cuarto de cultivo (8 meses) | 1000 | 20 años | 20% | 100 | 8,3 | 0,28 | | | 66,667 |
| Total \$ | | | | | | | | | 68,458 |

| MATERIALES | | | | |
|-------------------------------|-------------|----------|-------------|---------------|
| | Unidades | Cantidad | V. unitario | V. total |
| Mortiño (semillas) | Libra | 1 | 1 | 1 |
| Medio MS | Litro | 1 | 2,1 | 2,10 |
| Medio AM | Litro | 1 | 1,05 | 1,05 |
| Agua destilada | Litro | 1 | 0,4 | 0,4 |
| Hidróxido de sodio | Gramos | 5 | 0,03 | 0,15 |
| Alcohol | Litro | 2 | 1,25 | 2,5 |
| Algodón | Gramos | 30 | 0,5 | 0,5 |
| Mascarilla | Mascarilla | 1 | 0,5 | 0,5 |
| Hipoclorito de sodio | Litro | 0,25 | 6 | 1,5 |
| Tween | Gotas | 5 | 0,111 | 0,55 |
| Frascos 250 cc | Frascos | 17 | 0,13 | 2,13 |
| Ligas | Ligas | 17 | 0,00147 | 0,025 |
| Plástico | Metro | 10 | 0,018 | 0,18 |
| Giberelinas | Gramos | 1 | 33,5 | 33,5 |
| Jeringuilla | Jeringuilla | 2 | 0,22 | 0,44 |
| Filtro miliporo | Filtro | 2 | 7,7 | 15,4 |
| Micropipeta | Micropipeta | 1 | 0,003 | 0,003 |
| Punta de Micropipeta amarilla | Puntas | 6 | 0,016 | 0,1 |
| Punta de Micropipeta azul | Puntas | 4 | 0,025 | 0,1 |
| Total \$ | | | | 62,128 |

| OTROS INSUMOS | | | | |
|----------------------------------|----------|----------|-------------|-------------|
| | Unidades | Cantidad | V. unitario | V. total |
| Matraz Erlenmeyer | Matraz | 4 | 1,2 | 4,8 |
| Probeta graduada | Probeta | 1 | 1,2 | 1,2 |
| Pinza | Pinza | 1 | 18,7 | 18,7 |
| Caja petri | Caja | 2 | 1 | 2 |
| Bisturí | Bisturí | 1 | 8 | 8 |
| Vaso de precipitación | Vaso | 5 | 4,5 | 22,5 |
| Total estimado de consumo | | | | 57,2 |
| 10 % valor estimado \$ | | | | 5,72 |

| MANO DE OBRA DIRECTA | | | | |
|------------------------------|------------|-------------|---------|---------------|
| | Por día \$ | Por hora \$ | # horas | V. total/hora |
| Honorario del técnico | 80 | 10 | 13 | 130 |

| COSTOS INDIRECTOS | |
|--------------------------|------|
| Útiles de escritorio \$ | 0,2 |
| Luz (8 meses) \$ | 27,5 |

| | |
|---------------------------|----------------|
| TOTAL INVERTIDO \$ | 294,006 |
|---------------------------|----------------|

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| Semillas germinas por frasco: | 47 |
| Número de frascos: | 6 |

| | |
|--------------------------|--------------|
| Costo unitario \$ | 1,043 |
|--------------------------|--------------|

6.- RESULTADOS

6.1. Estaquillado

Al hacer una evaluación de las cuatro prácticas que se desarrollaron en este método se puede establecer que no hubo diferencia en los resultados obtenidos.

De acuerdo al seguimiento que se hizo a cada una de las estacas, se puede precisar que comenzaron a morir por secamiento alrededor de 45 días después de la siembra. Aquellas que fueron sembradas en tierra preparada y enraizadas con Hakaphos, fueron las que se secaron primero en su totalidad.

Cinco días después se secaron por completo las estacas sembradas en tierra preparada pero con Hormonagro como enraizante.

Es importante señalar que las estacas que más sobrevivieron son aquellas sembradas en tierra propia del páramo, sin diferencia alguna entre las enraizadas con Hormonagro o Hakaphos; pero finalmente murieron 29 de ellas, sin emitir raíces; se podría pensar que esto sucedió debido a que en su hábitat natural, estas plantas, crecen en esta tierra, y los elementos que tiene son los que el mortiño necesita.

Han pasado 10 meses de la siembra y solo una de las estacas permanece viva, esta formaba parte de las 15 sembradas en tierra de páramo con hormonagro, lo que significa que se tuvo éxito en 1.6 %. Actualmente mide 25.2 cm. y posee 6 hojas como material verde. (Foto 7)



Foto 7.- Estaca viva de mortiño

6.2. Microestacas

Dos meses después de sembrar las 120 microestacas, se determinó que este método de enraizamiento no dio resultado, ya que no sobrevivió ninguna de ellas y tampoco emitió raíces.

Al inicio del segundo mes de siembra se comenzó a eliminar las microestacas por dos motivos; el primero fue que algunas de ellas se contaminaron por falta de asepsia durante las fertilizaciones semanales; y la segunda razón, quizás la más importante, radicó en el hecho de que las estacas morían por secamiento. Ninguna de ellas demostró síntoma alguno de haber logrado el enraizamiento. (Foto 8)

También es importante señalar que a pesar del uso de citoquinina, que fue de 0.5 ml., no se logró la formación de nuevos brotes.



Foto 8.- Microestacas muertas

6.3. Germinación de semillas in Vitro

Con este método, fue un éxito la germinación de las semillas, ya que se obtuvo un 95 % de plántulas, pero el problema surgió en el desarrollo de las mismas. (Foto 9)



Foto 9.- Semillas germinas (Vista aérea)

No se logró en estos 8 meses de experimentación, que las plantas alcancen un tamaño mayor al de los 3 centímetros y esto fue en el mejor de los casos, ya que muchas de ellas no miden más de 0.5 cm. (Foto 10)

De acuerdo a mediciones se sabe que el rango de tamaño varía entre los 0.5 cm. y 3 cm. Se puede precisar que las cantidades distintas de giberelinas utilizadas en cada uno de los subcultivos, no repercutió en lo más mínimo en el crecimiento de las mismas; las cantidades fueron: 0.5 ppm; 1 ppm; 2 ppm; 3 ppm; 4 ppm; 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm y 50 ppm.

Si se quiere realizar una comparación entre las plantas que se encuentran en el medio inicial con las que se ha hecho subcultivos, no se puede notar la diferencia en cuanto a tamaño, ya que se ven muy similares; pero si se puede apreciar que las plantas en subcultivo son un poco menos vigorosas que las de la primera siembra.

Algunas de las plantas que fueron sometidas a subcultivo murieron, lo que se debió al estrés causado por el transplante, factor que no se vio en todos los recipientes.



Foto 10.- Plántulas de mortiño in Vitro

7.- CONCLUSIONES

Al finalizar esta investigación se puede asegurar, que ninguno de los tres métodos realizados fueron eficientes para propagar plantas de mortiño con fines comerciales.

El estaquillado proporcionó una regeneración del 1.6 %, lo que no es un parámetro aceptable para establecer este método como idóneo. Puede pensarse que esta única estaca que aun vive lo ha logrado debido a la tierra donde fue sembrada y a esto le sumaría el hecho de que las estacas sembradas en tierra negra fueron las que más tiempo sobrevivieron.

La experimentación de las microestacas tuvo un 0% de respuesta, por lo que se puede concluir con que este método no es útil para el mortiño.

La germinación de semillas in Vitro muy eficiente con respecto a germinación, pero no es conveniente como método de propagación, ya que lo que se quiere es un desarrollo rápido y como se puede ver, en ocho meses de experimentación no se ha logrado un tamaño apropiado para las plantas.

Al referirnos a los costos de obtención, está claro que el estaquillado es el más conveniente, pero de acuerdo a los resultados, la propagación in Vitro es la que más resultados favorables demostró, sin embargo este método aumentaría los costos de producción, los mismos que debería ser evaluados para establecer si este método es rentable o no.

Como ya se ha comprobado, no se encontró un método adecuado de propagación, talvez esa es la razón por la que esta planta sigue en estado silvestre. Se dice que los indígenas cortan un segmento de tallo de la planta lo siembran y de ahí se emiten las raíces; por lo que se ha averiguado, este procedimiento empírico da buenos resultados y se ha demostrado, pero no se consideró que este medio se lo pueda establecer como un posible método de propagación a gran escala ya que se tendrían que eliminar gran cantidad de plantas para obtener 3333 tallos, número adecuado para una hectárea.

Este estudio ha permitido establecer algunos parámetros apropiados que ayudarán a la realización de otros estudios, si se quiere evaluar y medir la eficiencia de métodos de propagación vegetativa de plantas de mortiño.

8.- RECOMENDACIONES

En el estaquillado sería aconsejable tratar con una mayor cantidad de enraizador por estaca.

En la germinación in Vitro se debería investigar sobre las necesidades requeridas por la planta en lo que se refiere a horas frío, temperatura y humedad; ya que como se explicó, al no existir un protocolo propio para esta planta, se hizo esta investigación basándose en experimentaciones y protocolos existentes.

9.- ANEXOS

9.1. Mortiño: flor



9.2. Mortiño: fruto



10.- GLOSARIO

Aclimatizar.- Adaptar a una planta a un clima y condiciones diferentes al que se encuentra.

Aforar.- Calcular la cantidad o volumen de agua que se deposita en un recipiente.

Agar.- Especie de gelatina vegetal que se obtiene de algas y se utiliza como medio de cultivo de bacterias o plantas.

Asepsia.- Libre de gérmenes.

Autoclave.- Recipiente o equipo metálico, hermético, que se utiliza para esterilizar por medio de vapor.

Auxinas.- Hormonas vegetales que están relacionadas con el enraizamiento.

Callo.- Neoformación de células, o de tejido cicatrizal, originada como consecuencia de una herida.

Cámara de flujo laminar.- Espacio cerrado por tres lados y abierto al frente que tiene la finalidad de evitar posibles infecciones. Este equipo toma aire del exterior, lo filtra para esterilizarlo y lo pasa al interior de la cámara; como el paso de aire es continuo, no se puede considerar la existencia de microorganismos en su interior.

Citoquininas.- Hormonas vegetales que afectan la división celular.

Clon.- Conjunto de individuos que descienden de un único individuo, por vía vegetativa o asexual.

Domesticar.- Hacer de una planta silvestres, un cultivo comercial

Elongación.- Aumento en la longitud de partes de la planta.

Enraizamiento.- Se refiere a la acción de enraizar una estaca.

Escisión.- División o rompimiento.

Estacas.- Rama que se siembra en tierra para que eche raíces.

Estaquillado.- Separar de una vegetal un órgano o parte de este para generar una nueva planta, es decir reproducir lo que le falta para constituir otra planta.

Fitohormonas.- Hormonas vegetales.

Genotipo.- Conjunto de genes que determinan las características de un individuo.

Germinación in Vitro.- Reproducción de plantas de forma aséptica en laboratorio a partir de semillas cultivadas.

Giberelinas.- Hormonas vegetales que tienen como finalidad principal inducir el alargamiento de entrenudos.

Humus.- Abono obtenido de la descomposición de materias orgánicas de origen generalmente vegetal.

Macronutrientes.- Elementos químicos requeridos por la planta en grandes cantidades.

Microestacas.- Se refiera a estacas de tamaños inferiores a 5 cm.

Micronutrientes.- Elementos químicos requeridos por la planta en pequeñas cantidades.

Micropropagación.- Producción de plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas.

Partenocarpia.- Formación del fruto sin previa fecundación.

Patógeno.- Organismo o elemento que provoca enfermedades.

Propagación vegetativa.- Reproducción en donde no intervienen los dos progenitores; llamada reproducción asexual.

Protocolo.- Secuencia de actividades que se realizan para completar un proceso. Se le podría considerar como una receta.

Protoplastos.- Unidad básica funcional, formada por el citoplasma y que encierra el núcleo dentro de si.

Puntas meristemáticas.- Parte más pequeña de la punta del tallo.

Quelato.- Compuesto formado por quelación, es decir fijación de un ión metálico por un complejo orgánico, que forma con el un compuesto soluble, pero no disociable.

Solución stock.- Solución concentrada.

Soportes inertes.- Se refiere al medio en donde se va sostener y desarrollar la nueva planta.

Tallos adventicios.- Tallo que nace en un punto donde generalmente no se desarrollan.

Totipotencia.- Calidad de una célula poco diferenciada y capaz de llevar a cabo gran número de funciones o de originar células de muy diversos tipos.

Turba.- Carbón combustible, negruzco, ligero, esponjoso, producido por materias vegetales más o menos carbonizadas.

UPA.- Unidad de Producción Agropecuaria

Yemas.- Brote o renuevo en forma de botón escamoso que aparece en el tallo de las plantas cuando las hojas todavía están envueltas unas sobre otras.

11.- BIBLIOGRAFIA

1. Calderón, Esteban. Fruticultura General, El Esfuerzo del Hombre. México: Limusa, 1993.
2. Guzmán, José. Cría de Injerto de Frutales. Venezuela: Editores EspaSande SRL, 1988.
3. Hartmann, Hudson. Propagación de Plantas, Principios y Prácticas. México: Compañía Editorial Continental S.A., 1982.
4. Lecourte, Marc. El Estaquillado, Guía Práctica de Multiplicación d las Plantas. España: Ediciones Mundi Prensa, 1989.
5. Loján, Leoncio. El Verdor de los Andes Ecuatorianos, Realidades y Promesas. Ecuador: SOBOC Grafic, 2003.
6. Pérez, Félix. Introducción a la Fisiología Vegetal. España: Ediciones Mundi Prensa, 1994.
7. Pierik, R. Cultivo in Vitro de Plantas Superiores. España: Ediciones Mundi Prensa, 1990.
8. Torres, Lourdes. Agrobiotecnología. Comunicación Personal. Ecuador: 2004.
9. Vademécum Agrícola 2000. Ecuador: Sexta Edición, Editar, 2000.