



**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS**
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA

FECHA DE PRESENTACIÓN: Julio 2010

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Biotecnología

PROYECTO: Multiplicación y estudios especiales *in vitro*

ACTIVIDAD: Establecimiento de un protocolo para la propagación masiva *in vitro* de cabuya azul (*Agave americana* L.) y cabuya blanca (*Furcraea andina* Trel.)

UBICACIÓN: Provincia : Pichincha
Cantón : Mejía
Parroquia : Cutuglagua

AUTOR: Egda. Orfa Hipatia Criollo Figueroa

COAUTORES: Ing. Jacqueline Benítez
Dr. Eduardo Morillo

COLABORADORES : Empresa UYAMA FARM

DURACIÓN: 12 meses

FECHA DE INICIO: Agosto 2010

FECHA DE TERMINACIÓN: Julio 2011

PRESUPUESTO: USD 4944.01

FINANCIAMIENTO: INIAP 21.4 %
TESISTA 78.6 %

1. ANTECEDENTES

Las Agaváceas son productoras de fibras duras que se obtienen principalmente de especies pertenecientes a los géneros *Agave*, *Furcraea*, *Sansevieria* y *Phormium*. El uso de fibras de agave para confeccionar cordeles y redes se originó en México hace unos 9000 años. Más tarde, ciertas Agaváceas se utilizarían en la preparación de bebidas refrescantes y fermentadas (León, 1987).

Las Agaváceas son plantas altas, de tallo simple o ramificado, que poseen a menudo hojas suculentas. Se encuentran distribuidas en el clima tropical, subtropical, temperado y principalmente en regiones áridas del Viejo y Nuevo Mundo desde una altura de 0 hasta 3500m (Cerón, 2003). La familia consta de 25 géneros y 637 especies (Judd *et al.*, 2007).

La información sobre la producción mundial de la familia Agavaceae es escasa. Existen valores económicos reportados de especies específicas tales como sisal (*Agave sisalana*) y el henequén (*Agave fourcroydes*), cifras estimadas en alrededor de 300 000 toneladas, valoradas en USD 75 millones, donde los mayores productores son Brasil, Tanzania y Kenia (FAO, 2009). Según datos de la Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones (CORPEI), en el año 2008, la exportación de cabuya en el Ecuador fue de USD 144 mil y 17.39 toneladas, donde los principales productos fueron cuerdas y cordajes de fibra (CORPEI, 2009).

En el Ecuador, se han reconocido dos especies pertenecientes a la familia Agavaceae para la elaboración de fibras: la cabuya negra (*Agave americana* L.) y la cabuya blanca (*Furcraea andina* Trel.) (Macía, 2006). En el país, estas dos especies se encuentran distribuidas en las provincias del Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, Azuay, Cañar, Loja, Guayas y Manabí (FAO, 1994).

La cabuya negra es también conocida como maguey, penca, chahuar (De la Torre *et al.*, 2008). Según White, citado por Correa y Bernal (1989), *Agave americana* es nativa del Ecuador, pero según Howard, citado por Gupta (1995), la planta es originaria de México. Esta hierba es la materia prima para la obtención industrial de un licor llamado “chawar mishki” (pulque), líquido que al ser fermentado se obtiene una bebida alcohólica (Domínguez *et al.*, 2008). Las poblaciones de la región andina del Ecuador han utilizado el maguey como alimento para humanos y animales, materiales (obtención de fibra), medicinal (tratar afecciones de los riñones, resfriados, como antisépticos) y medioambiental (formando parte de cercas vivas y como abono) (De la Torre *et al.*, 2008).

La cabuya blanca, perteneciente al género *Furcraea*, es una planta nativa del Ecuador (De la Torre *et al.*, 2008). Los pobladores andinos extraen la fibra de las hojas para la elaboración de bolsos, cuerdas, costales y alfombras (Macía, 2006), la fibra también es utilizada para fabricar pulpa y papel (Aguilar *et al.*, 2007).

En nuestro país se ha dado un decrecimiento de los rendimientos por hectárea y del volumen de producción de estas cabuyas como consecuencia de la falta de asistencia técnica en el manejo del cultivo (FAO, 2009).

Por otro lado, el crecimiento de las Agaváceas es muy lento, tienen bajas tasas de reproducción asexual y su reproducción sexual limitada, además durante su producción presenta problemas de polinización y viabilidad de las semillas. Es por esto que, las cabuyas difícilmente pueden ser multiplicadas masivamente por métodos convencionales (Dominguez *et al.*, 2008).

La aplicación de la biotecnología en especies de agaváceas direccionada hacia el desarrollo de procesos de cultivo y propagación *in vitro* ha sido la alternativa para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación, principalmente de especies de importancia industrial y en peligro de extinción (Dominguez *et al.*, 2008).

Desde 1974, existe publicaciones de propagación *in vitro* para ciertas especies del género *Ágave* tales como *Agave sisalana*, *A. fourcroydes*, *A. atrovirens*, *A. tequilana*, entre otras; especies que han sido estudiadas por su importancia económica (Ammirato *et al.*, 1990). En el género *Furcraea*, agronomía colombiana (2006) publicó un estudio para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* B. a partir de ápices caulinares procedentes de bulbillos, desarrollando así un procedimiento efectivo para la demanda comercial (Martínez *et al.*, 2006).

Los trabajos consultados muestran que el cultivo *in vitro* se ha logrado a partir de meristemos axilares o a través de organogénesis o embriogénesis somática indirecta en especies del género *Ágave* y *Furcraea* (Dominguez *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

El cultivo a gran escala de las cabuyas permitiría comercializar sus derivados como fibras duras, bebidas fermentadas y para la elaboración de papel. A diferencia de las fibras sintéticas, las fibras duras obtenidas de las cabuyas se degradan en menor tiempo, motivo por el cual no contaminan el medio ambiente. Por otro lado, la siembra de las cabuyas en las zonas áridas y semiáridas del país permitiría el aprovechamiento de aquellas áreas improductivas que no han sido utilizadas por las características del suelo.

El establecimiento de un protocolo para la propagación *in vitro* de cabuya azul y cabuya blanca permitiría obtener un mayor número de plantas en menor tiempo, lo cual no puede ser conseguido por técnicas tradicionales de cultivo, además las plantas de cabuya *in vitro* tendrán características similares a la planta madre, estarán libres de hongos y bacterias y poseerán un sistema radical desarrollado.

En la presente investigación se establecerá un protocolo y una propuesta para la producción *in vitro* de dos especies para las que no existe la metodología establecida, la cabuya azul y la cabuya blanca, con la finalidad de establecer un procedimiento eficiente para la propagación masiva de estas dos especies, con perspectivas al desarrollo de la producción de agaváceas en el país.

OBJETIVOS

3.1. General

- 3.1.1. Establecer un protocolo para la propagación intensiva *in vitro* de cabuya azul (*Agave americana* L.) y cabuya blanca (*Furcraea andina* Trel.).

3.2. Específicos

- 3.2.1. Evaluar protocolos para la desinfección de explantes de cabuya azul y cabuya blanca.
- 3.2.2. Evaluar reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones que permita obtener la mayor tasa de multiplicación *in vitro* de cabuya azul y cabuya blanca.
- 3.2.3. Evaluar medios para el enraizamiento de cabuya azul y cabuya blanca.
- 3.2.4. Realizar un plan de producción *in vitro* de cabuya azul y cabuya blanca y análisis económico según los protocolos seleccionados.

HIPÓTESIS

H₀: La cabuya azul y cabuya blanca no responden eficientemente a la propagación masiva *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Características del sitio experimental

5.1.1. Ubicación

La investigación se realizará en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Cutigliagua, a una latitud de 00°22'00" S y longitud de 78°28'00" W.

* Datos proporcionados por la Estación Meteorológica Ixobamba, perteneciente al Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI, 2010).

5.1.2. Condiciones experimentales específicas del laboratorio de cultivo *in vitro*

Temperatura promedio : 25-28 ±1°C
Fotoperiodo : 16 horas

5.2. Materiales

5.2.1. Material vegetal

- Plantas completas de cabuya azul (*Agave americana* L.) y cabuya blanca (*Furcraea andina* Trel.).

5.2.2. Materiales de campo

- Pala
- Guantes de goma
- Fundas Ziploc

5.2.3. Materiales de laboratorio

- | | |
|-------------------------|---------------------|
| - Material de disección | - Frascos de vidrio |
| - Mechero Bunsen | - Servilletas |
| - Probetas | - Papel toalla |
| - Micropipeta | - Papel aluminio |

5.2.4. Equipos de laboratorio

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| - Autoclave | - Agitador orbital |
| - Cámara de flujo laminar | - Balanza de precisión |
| - Destilador de agua | - pH-metro |
| - Microondas | - Refrigeradora |

5.2.5. Reactivos

- | | |
|---------------------------|-------------------------------|
| - Tween 20 | - Tiamina |
| - Alcohol potable | - Mio-inositol |
| - Ácido cítrico | - Ácido Indol acético (AIA) |
| - Ácido ascórbico | - Benciladenina (BA) |
| - Agar | - Citoquinina (KIN) |
| - Medio Murashige y Skoog | - Ácido naftalenacético (ANA) |
| - Sulfato de adenina | - Ácido indol butírico IBA |

5.2.6. Materiales y equipos de oficina

- Computadora
- Marcadores
- Papel Bond

5.3. Etapas del Experimento

5.3.1. Etapa 0: Fase Preparativa

5.3.1.1. Selección de plantas donadoras

Para la cabuya azul y blanca, se seleccionarán plantas madres de 1.5 a 2.0 m de altura y de 1.0 a 2.0m de diámetro, las cuales deberán ser vigorosas y presentar follaje sin lastimaduras, además no tener enfermedades visibles. Las plantas serán colectadas en los predios de la empresa UYAMA FARM, ubicados en el cantón Mira al suroeste de la provincia del Carchi. La ciudad de Mira se encuentra a 2.450 msnm y tiene una pluviosidad anual de 636 mm.

5.3.2. Etapa 1: Establecimiento *in vitro*

En esta etapa las plantas seleccionadas serán sometidas a tres tratamientos de desinfección para posteriormente ser cultivadas en un medio de introducción.

5.3.2.1. Factores en estudio

Especies de Agavaceae (e)

e1 = Cabuya blanca (*F. andina*)

e2 = Cabuya Azul (*A. americana*)

Métodos de desinfección del explante (d)

d1= Desinfección con Agy-Gent y Benlate (Blanco *et al.*, 2004)

d2 = Desinfección con Hipoclorito de Sodio (Rodríguez *et al.*, 2007)

d3= Desinfección con Hipoclorito de Calcio (Martínez *et al.*, 2006)

Los protocolos de desinfección detallados (d1, d2 y d3) se encuentran en el anexo 9.1.

5.3.2.2. Tratamientos

Se realizará seis tratamientos en la etapa 1, los cuales se indican en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos resultantes para el establecimiento de un protocolo de desinfección para cabuya azul y cabuya blanca.

Tr.	Codificación	Descripción
T1	E1d1	Cabuya Blanca sometida a desinfección con Agry-Gent y Benlate
T2	E1d2	Cabuya Blanca sometida a desinfección con Hipoclorito de Sodio
T3	E1d3	Cabuya Blanca sometida a desinfección con Hipoclorito de Calcio
T4	E2d1	Cabuya azul sometida a desinfección con Agry-Gent y Benlate
T5	E2d2	Cabuya azul sometida a desinfección con Hipoclorito de Sodio
T6	E2d3	Cabuya azul sometida a desinfección con Hipoclorito de Calcio

5.3.2.3. Unidad experimental

La unidad experimental estará constituida de un frasco de vidrio de 5.6 cm de diámetro por 9.0 cm de alto con 30 ml de medio de cultivo y un explante (el ápice caulinar) de las especies en estudio.

5.3.2.4. Análisis estadístico

Se realizará un arreglo factorial de 2x3 dispuesto en un diseño completamente al azar (DCA) con 8 observaciones. El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un protocolo de desinfección se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 2. ADEVA para el establecimiento de un protocolo de desinfección para cabuya azul y cabuya blanca.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de libertad (GL)
Total	47
Tratamientos	(5)
Especie de agavaceae (e)	1
Método de desinfección (d)	2
E x D	2
Error Experimental	42

5.3.2.5. Análisis funcional

Se calculará el coeficiente de variación y realizará la prueba de Tukey al 5%, para las variables en estudio que presenten diferencias estadísticas significativas.

5.3.2.6. Variable y métodos de evaluación

5.3.2.6.1. Porcentaje de contaminación (%)

Se establecerá mediante la relación porcentual entre el número explantes contaminados y el número total de explantes introducidos, como se indica en la siguiente fórmula. Se evaluará a los 15 y 30 días de siembra.

$$\text{Porcentaje de contaminación} = \frac{\text{Número de explantes contaminados}}{\text{Número de explantes introducidos}} \times 100$$

5.3.2.6.2. Porcentaje de explantes vivos

Se contabilizará el número de explantes vivos (de color vivaz y sin tejido dañado) del total de explantes introducidos a los 20 días de siembra y se obtendrá la relación porcentual.

$$\text{Porcentaje de explantes vivos} = \frac{\text{Número de explantes vivos}}{\text{Número de explantes introducidos}} \times 100$$

5.3.2.7. Manejo específico del experimento

5.3.2.7.1. Material vegetal

A partir de plantas madres que se seleccionarán en la *etapa 0*, se colectarán plantas hijas de un tamaño uniforme de 20 a 40 cm de longitud. Las plantas que se obtendrán de campo se colocarán en una funda plásticas con cierre hermético, para evitar la deshidratación hasta ser trasladada al laboratorio.

5.3.2.7.2. Obtención del explante

De los bulbillos seleccionados se eliminarán las hojas con una cuchilla limpia hasta obtener el ápice de 4 a 5 cm de longitud. Posteriormente, el explante se lavará en una solución de agua corriente más jabón líquido. Este procedimiento se realizará en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

5.3.2.7.3. Desinfección del explante

Los explantes se someterán a los tratamientos de desinfección indicados en el *Cuadro 1*. El protocolo de desinfección detallado se presenta en *Anexo 9.1*.

5.3.2.7.4. Cultivo de explantes

A los explantes desinfectados, en una cámara de flujo laminar de aire esterilizado y con la ayuda de un bisturi y pinzas estériles, se procederá a eliminar las hojas en desarrollo hasta obtener ápices caulinares de 0.7 a 1.0 cm de longitud, que comprende el meristemo, los primordios foliares y las primeras hojas en desarrollo, basado en el estudio de Martínez *et al.* (2006). Posteriormente se cultivarán en un medio de introducción modificado (MIM) descrito por Rodríguez *et al.* (2007), para el cultivo de tallo y yemas axilares para *Agave inaequidens* Koch. El medio de introducción se señala en el Anexo 9.2. Este medio se suplementará con 5% de agua de coco para inducir la división celular en tejidos diferenciados (Roca *et al.*, 1993). El pH del medio se ajustará a 5.7 y consecutivamente, se esterilizará en autoclave a 121°C y 15 lb (1.5Kg cm⁻²) de presión durante 15 minutos (Roca *et al.*, 1993).

5.3.2.7.5. Incubación

Los frascos sembrados se colocarán en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 25±1°C de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo (Martínez *et al.*, 2006), durante 30 días.

5.3.3. Etapa II: Multiplicación *in vitro*

En la etapa II se espera probar nueve medios de cultivo para la multiplicación de cabuya blanca y cabuya azul, donde se evaluará que tratamiento da mayor número de brotes.

5.3.3.1. Factores en Estudio

5.3.3.1.1. Especies de Agavaceae (E)

- E1 = Cabuya blanca (*F. andina*)
- E2 = Cabuya Azul (*A. americana*)

5.1.1.1.1. Medio de Multiplicación (m)*:

- m1 = MIM + 1 mg/L BA + 0.5 mg/L de ANA
- m2 = MIM + 3 mg/L BA + 0.5 mg/L de ANA
- m3 = MIM + 1 mg/L BA + 1.0 mg/L de ANA

* BA: benciladenina; ANA: ácido naftalenacético; KIN: kinetina; MIM: Medio de introducción modificado, descrito en el cuadro 3.

- **m4** = MIM + 3 mg/L BA + 1.0 mg/L de ANA
- **m5** = MIM + 1 mg/L KIN + 0.5 mg/L de ANA
- **m6** = MIM + 3 mg/L KIN + 0.5 mg/L de ANA
- **m7** = MIM + 1 mg/L KIN + 1.0 mg/L de ANA
- **m8** = MIM + 3 mg/L KIN + 1.0 mg/L de ANA
- **m9** = MIM

En los medios de multiplicación en estudio se investigará las fitohormonas BA, KIN y ANA, basado en publicaciones de Agaváceas descritos por Domínguez *et al.* (2008), Rodríguez *et al.* (2008) y Martínez *et al.* (2006).

5.3.3.2. Tratamientos

Se realizará 18 tratamientos en la etapa de multiplicación, los cuales se detallan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Tratamientos (Tr.) establecidos en este estudio para la determinación de un medio de multiplicación para cabuya azul y cabuya blanca

Tr.	Codificación	Descripción
T1	E1m1	Cabuya Blanca cultivada en: MIM + 1 mg/L BA + 0.5 mg/L de ANA
T2	E1m2	Cabuya Blanca cultivada en: MIM + 3 mg/L BA + 0.5 mg/L de ANA
T3	E1m3	Cabuya Blanca cultivada en: MIM + 1 mg/L BA + 1.0 mg/L de ANA
T4	E1m4	Cabuya Blanca cultivada en: MIM + 3 mg/L BA + 1.0 mg/L de ANA
T5	E1m5	Cabuya Blanca cultivada en: MIM + 1 mg/L KIN + 0.5 mg/L de ANA
T6	E1m6	Cabuya Blanca cultivada en: MIM + 3 mg/L KIN + 0.5 mg/L de ANA
T7	E1m7	Cabuya Blanca cultivada en: MIM + 1 mg/L KIN + 1.0 mg/L de ANA
T8	E1m8	Cabuya Blanca cultivada en: MIM + 3 mg/L KIN + 1.0 mg/L de ANA
T9	E1m9	Cabuya Blanca cultivada en: MIM (Testigo)
T10	E2m1	Cabuya Azul cultivada en: MIM + 1 mg/L BA + 0.5 mg/L de ANA
T11	E2m2	Cabuya Azul cultivada en: MIM + 3 mg/L BA + 0.5 mg/L de ANA
T12	E2m3	Cabuya Azul cultivada en: MIM + 1 mg/L BA + 1.0 mg/L de ANA
T13	E2m4	Cabuya Azul cultivada en: MIM + 3 mg/L BA + 1.0 mg/L de ANA
T14	E2m5	Cabuya Azul cultivada en: MIM + 1 mg/L KIN + 0.5 mg/L de ANA
T15	E2m6	Cabuya Azul cultivada en: MIM + 3 mg/L KIN + 0.5 mg/L de ANA
T16	E2m7	Cabuya Azul cultivada en: MIM + 1 mg/L KIN + 1.0 mg/L de ANA
T17	E2m8	Cabuya Azul cultivada en: MIM + 3 mg/L KIN + 1.0 mg/L de ANA
T18	E2m9	Cabuya Azul cultivada en: MIM (Testigo)

5.3.3.3. Unidad experimental

La unidad experimental estará constituida de un frasco de vidrio de 5.6cm de diámetro por 9.0cm de alto con 30 ml de medio de multiplicación y un explante de las especies en estudio.

5.3.3.4. Análisis estadístico

Se realizará un arreglo factorial de 2x9 dispuesto en un diseño completamente al azar (DCA) con 5 observaciones. El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un medio de multiplicación se presenta en el Cuadro 4.

Cuadro 4. ADEVA para el establecimiento de un Medio de multiplicación para cabuya azul y cabuya blanca

Fuente de Variación (F de V)	Grados de libertad (GL)
Total	89
Tratamientos	(17)
Especies (e)	1
Medios de multiplicación (m)	8
E x M	8
Error Experimental	72

5.3.3.5. Análisis funcional

Se calculara el coeficiente de variación y realizará la prueba de Tukey al 5%, para las variables en estudio que presenten diferencias estadísticas significativas.

5.3.3.6. Variables y métodos de evaluación

5.3.3.6.1. Número de explantes regenerados (%)

Se contará el número de explantes regenerados por cada tratamiento. Se evaluará a la cuarta y octava semana de siembra.

5.3.3.6.2. Número de explantes con brotes (%)

Se contabilizará los explantes que presenten brotes por cada tratamiento. Se evaluará a la cuarta y octava semana de cultivo.

5.3.3.6.3. Número promedio de brotes axilares

Se contará el número de brotes axilares de cada explante y se obtendrá un promedio del número de brotes axilares por cada tratamiento, a la cuarta y octava semana de haber sido sembrada. Se basará en la experiencia de Martínez *et al.* (2006).

5.3.3.6.4. Tamaño de brotes axilares (cm)

Se determinará la longitud de los brotes axilares a los 20, 40 y 60 días de haber sido sembrado el explante en medio de multiplicación. Se utilizará una regla milimetrada y la medida se expresará en centímetros (cm).

5.3.3.7. Manejo específico del experimento

5.3.3.7.1. Inducción de brotes

A los explantes introducidos no contaminados, bajo condiciones de flujo laminar y con la ayuda de un bisturí y pinzas estériles, se procederá a sembrar en medio de inducción y proliferación de brotes.

El medio de inducción será el medio de introducción modificado descrito por Rodríguez *et al.* (2007), suplementado con agua de coco, y reguladores de crecimiento: benciladenina (BA) ácido naftalenacético (ANA) y kinetina (KIN). La descripción de los medios se puede observar en el *anexo 9.3*.

El pH del medio se ajustará a 5.7 y posteriormente, se esterilizará en autoclave a 121°C y 15 PSI (1.5Kg cm⁻²) de presión durante 20 minutos (Roca *et al.*, 1993).

5.3.3.7.2. Incubación

Los frascos sembrados se colocarán en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 25±1°C de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo (Martínez *et al.*, 2006), durante ocho semanas.

5.3.4. Etapa III: Enraizamiento

Se probarán tres medios enraizantes para la cabuya blanca y cabuya azul y se evaluará el número de plantas con emisión de raíces, la longitud y número de raíces en las plántulas a los 30 días de sembradas.

5.3.4.1. Factores en Estudio

5.3.4.1.1. Especies de Agavaceae (e)

e1 = Cabuya blanca (*F. andina*)

e2 = Cabuya Azul (*A. americana*)

5.3.4.1.2. Medio de Enraizamiento (h)

- h1 = MIM
- h2 = MIM + 11.42 uM de AIA¹⁰
- h3 = MIM + 0.5mg/L de IBA¹¹

Los tres medios de enraizamiento en investigación están basados en los estudios de Domínguez *et al.* (2008), Martínez *et al.* (2006) y Yépez *et al.* (2004) efectuados en especies de agaváceas.

5.3.4.2. Tratamientos

Los tratamientos en la etapa de enraizamiento se presentan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Tratamientos para la determinación de un medio de enraizante para cabuya azul y cabuya blanca

Tratamiento	Codificación	Descripción
T1	e1h1	Cabuya blanca cultivada en: MIM
T2	e1h2	Cabuya blanca cultivada en: MIM + 11.42 uM de AIA
T3	e1h3	Cabuya blanca cultivada en: MIM + 0.5mg/L de IBA
T4	e2h1	Cabuya Azul cultivada en: MIM
T5	e2h2	Cabuya Azul cultivada en: MIM + 11.42 uM de AIA
T6	e2h3	Cabuya Azul cultivada en: MIM + 0.5mg/L de IBA

5.3.4.3. Unidad Experimental

La unidad experimental estará constituida de un frasco de vidrio de 5.6cm de diámetro por 9.0cm de alto con 30ml de medio de enraizamiento y un brote de una longitud de 3.8 a 6.8 cm de las especies en estudio.

5.3.4.4. Análisis Estadístico

Se realizará un arreglo factorial de 2x3 dispuesto en un diseño completamente al azar (DCA) con 10 observaciones. El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) para el establecimiento de un medio enraizante se presenta en el Cuadro 6.

¹⁰ AIA: Ácido indolacético.

¹¹ IBA: Ácido Indol butírico

Cuadro 6. ADELVA para el establecimiento de un Medio de enraizamiento para cabuya blanca y cabuya azul

Fuente de Variación (F de V)	Grados de libertad (GL)
Total	59
Tratamientos	(5)
Especies de Agavaceae (e)	1
Medio Enraizante (h)	2
E x H	2
Error Experimental	54

5.3.4.5. Análisis funcional

Se calculará el coeficiente de variación y se realizará la prueba de Tukey al 5%, para las variables en estudio que presenten diferencias estadísticas significativas.

5.3.4.6. Variables y Métodos de Evaluación

5.3.4.6.1. Número de plántulas con emisión de raíces

Se contabilizará el número de plántulas que desarrollen raíces a los 15 y 30 días de haber sido sembrado el brote en medio enraizante.

5.3.4.6.2. Longitud de raíces

Se determinará la longitud de la raíz principal a los 15 y 30 días haber sido sembrado el brote en medio enraizante. Se utilizará una regla milimetrada, y la medida se expresará en milímetros (mm).

5.3.4.6.3. Número de raíces

Se contará el número de raíces de cada brote a los 15 y 30 días de haber sido sembrados.

5.3.4.7. Manejo Especifico del Experimento

5.3.4.7.1. Sembrado de brotes

Las plántulas seleccionadas serán cultivadas en medio enraizante, el cual será el medio de introducción modificado descrito por Rodríguez *et al.* (2007) suplementado con reguladores de crecimiento IBA y AIA. La descripción de los medios enraizantes se muestra en el Anexo 9.3.

El pH del medio se ajustará a 5.7 y posteriormente, se esterilizará en autoclave a 121°C y 15 PSI (1.5Kg cm⁻²) de presión durante 20 minutos (Roca *et al.* 1993).

5.3.4.7.2 Incubación

Los frascos sembrados se colocarán en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 25±1°C de temperatura, 16 horas luz de fotoperiodo durante 30 días (Martínez *et al.* 2006).

5.3.5. Propuesta técnica y análisis económico para la producción *in vitro* de cabuya azul y cabuya blanca

Para el análisis económico se aplicará la metodología de costeo por procesos para producción de plantas *in vitro* de cabuya azul y cabuya blanca utilizando los tratamientos más eficientes en las etapas de desinfección, multiplicación y enraizamiento. Para el análisis económico se tomarán en cuenta los costos de los materiales directos, los equipos, utensilios, suministros y mano de obra directa e indirecta. También se determinará el costo total de producción y el costo unitario de cada planta de cabuya azul y cabuya blanca. Igualmente, el establecimiento del plan de producción se realizará utilizando los protocolos más eficientes. Los parámetros para la elaboración del plan de producción se detallan en el Cuadro 7 y 8.

Cuadro 7. Parámetros a considerarse para la elaboración del plan de producción de la cabuya azul y cabuya blanca

PARÁMETROS	
1. Demanda	7. Tasa de inoculación
2. Intervalo de transferencia	8. Tasa de contaminación
3. Tasa de multiplicación	9. Cantidad de mililitros de medio por frasco
4. Producción de vástagos	10. Cantidad de flujos laminares
5. Porcentaje de enraizamiento	11. Número de operadores
6. Tasa de trabajo del operario	12. Número de turnos de trabajo

Cuadro 8. Factores a definir para un plan de producción *in vitro*

Semanas	Número de propágulos establecidos	Número de frascos: 1 planta por frasco	Número de plantas no contaminadas	Número de plantas a liberar	Número de plantas enraizadas	Número de plantas a multiplicar	Tasa de multiplicación	Número de propágulos
1								
2								
3								

6. CRONOGRAMA

ACTIVIDADES	M E S											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Practicas preliminares	X	X										
Revisión Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboración y aprobación del Proyecto		X	X									
<i>Etapa 0: Fase Preparativa</i>												
• Selección de plantas donadoras				X	X							
<i>Etapa I: Establecimiento o iniciación de los cultivos</i>												
• Obtención del material vegetal					X	X	X					
• Desinfección del explante					X	X	X					
• Cultivo del Explante					X	X	X					
• Incubación					X	X						
• Toma de datos					X	X						
<i>Etapa II: Multiplicación</i>												
• Inducción de brotes						X	X					
• Incubación						X	X	X				
• Toma de datos							X	X				
<i>Etapa III: Enraizamiento</i>												
• Sembrado de Brotes							X	X				
• Incubación								X	X			
• Toma de datos								X	X			
Análisis económico						X	X	X	X	X	X	
Escritura de tesis								X	X	X	X	X

7. PRESUPUESTO DEL PROYECTO

7.1. Personal

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
TESISTA	Mes	323.85	12	3886.20

7.2. Materiales de Campo

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Guantes de Goma	Par	12.50	1	12.50
Fundas Ziploc	Unidad	0.15	100	15.00
SUBTOTAL				27.50

7.3. Reactivos

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Medio M&S	L	11.00	10.80	118.80
Agar	g	0.30	75.60	22.68
Alcohol	L	1.00	10.50	10.50
Hipoclorito de Calcio	L	10.00	0.40	4.00
Hipoclorito de Sodio	L	10.00	0.48	4.80
Tween 20	ml	0.62	3.00	1.86
Ácido cítrico	g	0.22	0.60	0.13
Ácido ascórbico	g	0.88	0.40	0.35
Azúcar	kg	0.80	0.32	0.26
SUBTOTAL				163.38

7.4. Materiales de Laboratorio

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Mandil blanco	Unidad	8.00	1	8.00
Marcadores	Unidad	2.00	2	4.00
Cinta autoclavable	Rollo	10.00	1	10.00
Guantes	Par	0.65	20	13.00
Hoja Bisturí	Unidad	0.20	100	20.00
Jabón Líquido	L	2.50	1	2.50
Papel Absorbente	Paquete	1.50	2	3.00
Papel Aluminio	Paquete	4.00	2	8.00
Servilletas	Paquete	1.20	3	3.60
Zapatos blancos para laboratorio	Unidad	30.00	1	30.00
Papel plástico	Paquete	3.20	2	6.40
Mascarilla	Unidad	0.20	10	2.00
SUBTOTAL				110.50

7.5. Materiales de Oficina

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Copias	Unidad	0.03	1200	36.0
Empastado del texto	Unidad	15.00	8	120.0
CD	Unidad	5.00	4	20.0
SUBTOTAL				176.0

7.6. Logística

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Viáticos y subsistencia	Unidad	82.50	4	330.00
Combustible	Galones	1.50	10	15.00
SUBTOTAL				345.00

7.7. Costo Total

RUBRO	TOTAL (USD)
Tesista	3886.20
Materiales de Campo	27.50
Reactivos	163.38
Materiales de Laboratorio	110.50
Materiales de Oficina	176.0
Movilización	345.00
SUBTOTAL	4708.58
Imprevistos 5%	235.43
TOTAL	4944.01

7.9 Fuentes de financiamiento:

Institución	Proyecto	USD	Porcentaje (%)
INIAP	BIOTECNOLOGIA	1057.81	21.4
Tesista		3886.2	78.6

8. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aguilar, S.; Ramírez, J.; Malagón, O. 2007. Extracción de fibras no leñosas: cabuya (*Furcraea andina* Trel.) y banano (*Musa paradisiaca* L.) para estandarizar un proceso tecnologico destinado a la elaboración de pulpa y papel (en línea). Loja, EC. Consultado 17 mayo 2010. Disponible en <http://www.slideshare.net/guest22eb17/extraccion-de-fibras-no-leosas-cabuya-furcraea-andina-trel-y-banano-musa-paradisiaca-l-para-estandarizar-un-proceso-tecnologico-destinado-a-la-elaboracin-de-pulpa-y-papel>
- Ammirato, P.; Evans, D.; Sharp, W.; Bajaj, Y. 1990. Handbook of plant cell culture. Vol. 5. Ornamental species. New York. Mc Graw-Hill. pp. 206- 227
- Blanco, M.; Valverde, R.; Gómez, L. 2004. Micropropagación de *Dracaena deremensis* (en línea). Costa Rica. Consultado 18 de mayo 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/436/43628101.pdf>
- Gerón, C. 2003. Sistemática, etnobotánica y métodos de estudio en el Ecuador. Herbario Alfredo paredes. Escuela de Biología de la Universidad Central del Ecuador. Ecuador. p. 222
- Correa, J. y Bernal, Y. 1989. Especies promisorias de los países del Convenio Andrés Bello tomo I. Editora Guadalupe Ltda. Santafé de Bogotá-Colombia. p. 8-42
- CORPEI (Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones). 2009. Perfil de Cabuya. Ecuador. Consultado 2 de julio 2010. Disponible en <http://www.ecuadorexporta.org/contenido.ks?contenidoId=10480>
- De La Torre, L.; Navarrete, H.; Muel, P.; Macia, M.; Balsier, H. (2008) Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Quito & Aarhus. p. 200
- Domínguez, M.; Alpuche, A.; Vascos, N.; Pérez. 2008. Efecto de las citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos". Revista fitotecnica mexicana. Chapingo, México. p 317-322
- _____. González, M.; Rosales, C.; Quiñones, C.; Delgadillo, S.; Mireles, S.; Pérez, E. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género Agave (en línea). Aguascalientes. Consultado 19 mayo 2010. Disponible en redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/674/67404109.pdf
- FAO (F. en. de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2009. Boletín Especial No. 11 / Representación de la FAO en Cuba: Crónicas de las fibras. Renace el Sisal en Tanzania (en línea) Consultado 20 de mayo 2010. Disponible en <http://www.rlc.fao.org/es/prensa/boletines/pdf/47.pdf>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1994. Consulta de expertos sobre productos forestales no madereros para América Latina y el Caribe. Ejemplos de PEFM de importancia económica en Ecuador (en línea). Consultado 19 mayo 2010. Disponible en <http://www.fao.org/dozrep/t2354s/t2354s00.htm#Contents>
- Gupta, M. 1995. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Convenio Andrés Bello. Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo CYTED. Santafé de Bogotá, Colombia. p. 7-9.
- Judd, W.; Campbell, C.; Kellogg, E.; Stevens, P.; Donoghue, M. 2007. «Agavaceae», *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach, Third edition*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. p 268-269.

- León, J. 1987. Botánica De Los Cultivos Tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica, p. 82-88
- Macía, M. 2006. Botánica Económica de los Andes Centrales (en línea). Madrid. Consultado 17 mayo 2010. Disponible en <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdf/Capitulo%2023.pdf>
- Martínez, M. y Pacheco, J. 2006. Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker (en línea). Colombia. Consultado 19 mayo 2010. Disponible en <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-9652006000200002&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0120-9965.
- Roca, W. y Mroginski, L. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Editorial Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Universidad de Texas
- Rodríguez, A.; Rodríguez, O.; Solano, J.; Castellanos, J. 2007. Propagación *in vitro* del "Maguey bruto" (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés Económico (en línea). México Consultado 18 mayo 2010. Disponible en www.chapingo.mx/.../4002007b104f62a47c712fd986aa3565.pdf
- Yepez, L.; De García, E.; Vargas, E. 2004. Notas preliminares sobre la propagación clonal *in vitro* de *Agave cocui* Trelease (en línea). Venezuela. Consultado 19 mayo 2010. Disponible en <http://investigacion.unefm.edu.ve/croizatia/trabajoscroizatia/volumen2.1/3NOTASPRELMINARESSOBRE.PDF>

5. ANEXOS

9.1. Protocolos de desinfección

DESINFECCIÓN CON AGRY-GENT Y BENLATE (Blanco *et al.*, 2004).

Protocolo de desinfección para *Dracaena deremensis*, especie perteneciente a la familia Agavaceae.

- Los explantes se colocan en una solución de 100mg/L de ácido ascórbico durante 30 min
- Colocar los explantes en una solución de 2 g/L de Agray-gent y 2g/L de Benlate durante 30 min
- Posteriormente pasar por etanol al 70% por 1 minuto.
- Después colocar en una solución de NaOCl al 2% (cloro comercial al 5%) con una gota de tween-20 y 100mg/L de ácido ascórbico, por 20 min.
- Todos los pasos del presente procedimiento realizados en agitación constante. Una vez terminado los 20 min y dentro de una cámara de flujo laminar, los explantes fueron lavados 3 veces con agua destilada estéril.

DESINFECCIÓN CON HIPOCLORITO DE SODIO (Rodríguez *et al.*, 2007)

Protocolo de desinfección para *A. inaequilobensis* partir de yemas Axilares.

- Los explantes son lavados y desinfectados con agua, jabón, tween 60 y agua estéril.
- Sumergir durante 3 minutos en alcohol al 70%.
Posteriormente, en hipoclorito de sodio al 10% durante 3 a 5 minutos.
- En antioxidante (150mg/L de ácido cítrico y 100mg/L de ácido ascórbico) durante 5 minutos.

DESINFECCIÓN CON HIPOCLORITO DE CALCIO (Martínez *et al.*, 2006)

Protocolo de desinfección para micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. Bulbillos seleccionados pequeña porción caulinar. La desinfección superficial se realizó en cámara de flujo laminar:

- Inmersión en agua destilada estéril + tween 20 (0.5mL por 100mL) durante 10 minutos, con agitación continua
- Inmersión en alcohol al 70% por 1 minuto.
Luego en hipoclorito de Ca (5-10%), por 25 minutos
Enjuagar 4 veces consecutivas, 3 minutos cada una con agua destilada estéril.

9.2. Medio de Introducción

Cuadro 9. Medio de Introducción Modificado (MIM) de Rodríguez *et al* (2007)

REACTIVO	CONCENTRACION
Sales MS	4.4
Sulfato de Adenina (mg.L-1)	80
Tiamina (mg.L-1)	0.40
Mio-Inositol (mg.L-1)	100
Agar (% ,p/v)	0.7
Azúcar (% ,p/v)	3
Agua de coco (% ,v/v)	5

9.3. Medios de Multiplicación

Cuadro 10. Medios de Inducción y proliferación de brotes para cabuya blanca y cabuya azul

REACTIVOS	MEDIOS								
	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9
M&S(1962) (g/L)	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4
Sulfato de Adenina (mg/L)	80	80	80	80	80	80	80	80	80
Tiamina (mg/L)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Mio-inositol	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Azúcar (% ,p/V)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Agar (% ,p/V)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Agua de coco (% ,v/v)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
BA (mg/L)	1	3	1	3	-	-	-	-	-
KIN (mg/L)	-	-	-	-	1	3	1	3	-
ANA (mg/L)	0.5	0.5	1	1	0.5	0.5	1	1	-

9.4. Medios de Enraizante

Cuadro 11. Medios para enraizamiento de explantes *in vitro* de cabuya azul y cabuya blanca

REACTIVOS	MEDIOS ENRAIZANTES		
	Medio 1	Medio 2	Medio 3
M&S(1962) (g/L)	4.4	4.4	4.4
Sulfato de Adenina (mg/L)	80	80	80
Tiamina (mg/L)	0.4	0.4	0.4
Mio-inositol	100	100	100
Azúcar (% ,p/V)	3	3	3
Agar (% ,p/V)	0.7	0.7	0.7
Agua de coco (% ,v/v)	5	5	5
AIA (uM)	-	11.42	-
IBA (mg/L)	-	-	0.5