



BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

Aplicaciones en Ecuador

Nicolás Javier Cruz Rosero
Jaime Alfredo Morante Carriel
Mercedes Susana Carranza Patiño

compAs
Grupo de capacitación e investigación pedagógica



BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

Aplicaciones en Ecuador



Nicolás Javier Cruz Rosero
Jaime Alfredo Morante Carriel
Mercedes Susana Carranza Patiño

BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS
Aplicaciones en Ecuador



BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS
Aplicaciones en Ecuador

© Nicolás Javier Cruz Rosero
Jaime Alfredo Morante Carriel
Mercedes Susana Carranza Patiño
Universidad Técnica Estatal de Quevedo

Una obra de relevancia producto del 8va. Congreso Internacional de sociedad
tecnología e información Publicado por acuerdo con los autores.

© 2021, Editorial Grupo Compás
Guayaquil-Ecuador

Grupo Compás apoya la protección del copyright, cada uno de
sus textos han sido sometido a un proceso de evaluación por
pares externos con base en la normativa del editorial.

El copyright estimula la creatividad, defiende la diversidad en el
ámbito de las ideas y el conocimiento, promueve la libre
expresión y favorece una cultura viva. Quedan rigurosamente
prohibidas, bajo las sanciones en las leyes, la producción o
almacenamiento total o parcial de la presente publicación,
incluyendo el diseño de la portada, así como la transmisión de
la misma por cualquiera de sus medios, tanto si es electrónico,
como químico, mecánico, óptico, de grabación o bien de fotocopia,
sin la autorización de los titulares del copyright.

Editado en Guayaquil - Ecuador

ISBN: 978-9942-33-402-2



Cita.

Cruz, N., Morante, J., Carranza, M. (2021) BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS Aplicaciones en Ecuador. Editorial Grupo Compás.

Contenido

BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS.....	1
Aplicaciones en Ecuador	1
Prólogo	1
Agradecimientos	3
Introducción.....	4
Métodos de propagación.....	1
Métodos de propagación tradicional	1
Propagación clonal in vitro vía organogénesis	2
Principales aplicaciones del cultivo in vitro.....	5
Factores que influyen en el cultivo in vitro.....	6
Etapas del cultivo in vitro.....	11
Estrategias para propagación clonal	20
Aplicaciones de la biotecnología en el campo vegetal.....	22
Aplicaciones en especies frutales	22
Aplicaciones en especies agrícolas.....	23
Propagación in vitro de piña	23
Propagación in vitro de malanga	24
Propagación in vitro de plátano variedad Maqueño.....	25
Propagación in vitro de plátano Barraganete y banano Valery y Orito.....	26
Propagación in vitro de banano Orito.....	27
Aplicaciones en especies forestales.....	28
Micropropagación clonal In vitro de árboles seleccionados de teca	31
Conclusiones	49
Referencias bibliográficas.....	52

Prólogo

La biotecnología en el Ecuador se encuentra en una etapa de desarrollo inicial, la cual tiene muchas aplicaciones para el campo agrícola y forestal. En nuestro país hay varias instituciones de educación superior que ofertan la carrera de biotecnología, y la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ) tampoco se quiere quedar atrás y está próxima a ofertar esta carrera a los futuros estudiantes del Ecuador.

La biotecnología abarca un sinnúmero de técnicas, y la que mas aplicación tiene en nuestro país es el cultivo de tejidos vegetales.

En el siguiente texto se hablará sobre esta técnica, iniciando desde la identificación, selección de explantes en el campo hasta propagación clonal *in vitro* de plantas, con características superiores, manteniendo su calidad y sanidad vegetal.

Aunque se han descrito un gran número de publicaciones sobre cultivo de tejidos vegetales, se ha seleccionado un trabajo realizado por varios Investigadores en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UTEQ.

En esta obra se hace una revisión de las principales aplicaciones de la biotecnología en el campo agrícola y forestal, poniendo especial

atención en la propagación clonal *in vitro* de varias especies de importancia económica del Ecuador.

Nicolás Cruz Rosero

Agradecimientos

Los autores agradecen por su contribución y apoyo al Departamento de Biotecnología, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador.

Introducción

La deforestación en el mundo, fundamentalmente la conversión de bosques tropicales en tierras agrícolas ha disminuido en los últimos diez años pero continúa a un ritmo alarmante en muchos países (FAO, 2010). La Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales (FRA), coordinada por la FAO, concluyó que el porcentaje de tierras forestales con respecto a la superficie terrestre mundial había disminuido del 31,6% en 1990 al 30,6% en 2015, aunque en los últimos años el ritmo de pérdida se ha ralentizado (2018).

El cambio climático, lo mismo que la evolución demográfica, la brecha norte sur o la globalización, ha accedido a los primeros puestos del ranking de preocupaciones sociales, a pesar de las incertidumbres, y esto es así porque su principal responsable son las actividades humanas, por los efectos medioambientales y sobre la salud de la población (Useros, 2013). De allí que, hacen falta políticas medio ambientales que protejan este recurso. La apertura de las fronteras agrícolas y ganaderas, son los principales factores que inciden directamente en agudizar estos problemas.

La FAO (1990), manifiesta que la demanda de los productos agrícolas y forestales se han incrementado dramáticamente en los últimos años. Como alternativa de solución a esta demanda organismos encargados de investigar, buscan constantemente especies de crecimiento rápido, resistentes a salinidad, fuego, frío, plagas y enfermedades, que sean capaces de adaptarse y desarrollarse las zonas críticas.

En la actualidad tiene una gran demanda en los programas de reforestación para zonas que presentan problemas por la tala indiscriminada de sus árboles. Sin embargo, la multiplicación de de las especies se está realizando por la vía sexual (por semilla), cuyo origen se desconoce. Generalmente las plantas de las que se toman las semillas no son seleccionadas por sus características fenológicas, lo que ha ocasionado una alta variabilidad en las plantaciones establecidas en la actualidad.

Por ello es necesario recurrir a la biotecnología, que se refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (United Nations, 1992). Por otro lado, OECD (2006) define a la moderna biotecnología como la aplicación científica y tecnológica a organismos vivientes, sus partes, productos y modelos

destinados a modificar organismos vivos y/o materiales aplicados a la producción de conocimientos, bienes y servicios. Se espera que estos productos obtenidos sirvan para superar enfermedades, plagas, además de mejorar su calidad.

La biotecnología integra distintos enfoques derivados de la tecnología y aplicación de las ciencias biológicas, tales como biología celular, molecular, bioinformática. Uno de los objetivos principales de la biotecnología es generar tecnologías mucho más eficientes para la producción de semillas de alta calidad a través de la micropropagación de plantas.

Por su parte (Monteuuis, Bon, y Goh, 1998) manifiestan que la propagación por vía vegetativa, en contraste con la realizada a través de la vía sexual (semillas), habilita la captura y transfiere a la descendencia el material genético íntegro del árbol donador.

Por su parte, la micropropagación *in vitro* de plantas, es una de las herramientas que, permite propagar clonalmente árboles seleccionados, y garantiza buenas características fenotípicas, de esta manera se logrará incrementar la tasa de multiplicación que por vía sexual no se podría lograr (Santos, Suarez, y Gatti, 2013). Además, se obtendrán plantas con un alto porcentaje de sanidad.

Existen varios métodos de propagación, de los cuales citamos los siguientes:

Métodos de propagación

Métodos de propagación tradicional

Los métodos tradicionales de propagación de plantas de teca son el sexual (semillas) y vegetativa (seudoestacas).

Betancourt (1987), recomienda someter a las semillas a tratamientos pregerminativos antes de sembrarlas, de lo contrario, la germinación es muy errátil. Algunas semillas demoran varios meses en germinar y otras no lo hacen. El mejor procedimiento consiste en extender los frutos formando una espesa capa sobre el semillero y regarlos copiosamente sin sombra ni abrigo, dejando que la semilla se seque al sol entre un riego y otro.

CEDEGE (1992), menciona que las plantas, a ser utilizadas en la preparación de pseudoestacas, se las debe extraer de las platabandas cuando tienen un diámetro de 1 a 2 cm, suprimiendo parcialmente la raíz principal y las ramas que se hayan desarrollado, dejándolas aproximadamente de 20 a 25 cm de largo.

Propagación clonal *in vitro* vía organogénesis

Jiménez (1998), manifiesta que los orígenes del cultivo *in vitro* se remontan a los años 1902, con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células, aisladas de plantas, quien postuló el principio de totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro*.

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales.

Por su parte Roca y Mroginski (1993) manifiestan que el cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para, mantener los cultivos libres de contaminación microbiana.

Jiménez (1998), señala que dentro de los métodos más utilizados en la regeneración de plantas se encuentran la organogénesis y la embriogénesis, la organogénesis es un evento morfogénético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente

desarrollo de esta, en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordio de raíces y el subsecuente enraizamiento final.

Hu y Wang (1983), mencionan que esta técnica se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de la hoja, las cuales son divididas y subcultivadas repetidamente. Este método no es rápido, pero da lugar a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética. Además, constituye una herramienta de propagación vegetativa y, al igual que en otros casos, la descendencia presenta las mismas características que la planta madre, es decir, son clones de la planta que la originaron, hecho que no ocurre por la vía sexual en donde se originan individuos únicos (Abdelnour y Escalant, 1994).

El éxito de la técnica radica en la capacidad de desdiferenciar a las células del explante y devolverles su capacidad de multiplicarse y especializarse en cualquier tipo de tejido (Cubero, 2003).

Kitto (1997), indica que la multiplicación de plantas es sin duda la más popular de las aplicaciones del cultivo *in vitro*. Las principales ventajas de este sistema de propagación se pueden resumir en:

- Altos coeficientes de multiplicación que permitan manipular volúmenes elevados de plantas en cortos períodos de tiempo.
- Introducción rápida de nuevas variedades o clones.
- Producción independiente de las condiciones ambientales.
- Incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y al saneamiento.
- Uniformidad en las plantas producidas.
- Mayor facilidad en la comercialización.

Por otra parte, la investigación en cultivo de tejidos puede cubrir un rango amplio de actividades; por ejemplo, desde la investigación básica sobre los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular, hasta la que realizan aquellos laboratorios que se dedican a la investigación aplicada y al desarrollo de tecnologías para utilizar esta investigación en la propagación clonal, o en el mejoramiento genético de

las plantas. En estos últimos laboratorios las instalaciones físicas, los equipos y otros suministros para el cultivo de tejidos serán de una magnitud intermedia entre el laboratorio de investigación básica y el de producción comercial Roca y Mroginski (1993).

Principales aplicaciones del cultivo in vitro

Castañeda (2014) determina que el cultivo *in vitro* se puede emplear en:

- Bancos de germoplasma
- Estabilidad genética
- Material libre de patógenos
- Transformación genética
- Variación somaclonal y nuevos caracteres
- Mutagénesis *in vitro*
- Intercambio de materiales entre países
- Multiplicación de clones
- Sanidad vegetal
- Tolerancia o resistencia a diferentes tipos de factores bióticos y abióticos

Factores que influyen en el cultivo in vitro

Según (Villalobos y Thorpe, 1991; Morán, 1996) los factores que influyen en el cultivo *in vitro* o la micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos, son los siguientes:

Planta donadora del explante: Se debe evitar tomar plantas madre de diferentes edades fisiológicas. De igual manera cuando las plantas donadoras son demasiado jóvenes se dificulta el cultivo "*in vitro*". Las plantas deben ser sanas y vigorosas.

Explante: se debe tomar en cuenta el sistema de propagación de la planta; si la planta tiene reproducción por semilla se toman las partes embrionales o de las plántulas.

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemas caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos. Esta facilidad para la proliferación callosa puede hacerse extensiva a células y protoplastos, con el empleo de técnicas y medios de cultivo más elaborados (Roca y Mroginski, 1993).

Factores físicos: de mayor importancia la luz y la temperatura, la luz es esencial en la morfogénesis e involucra varios componentes como la intensidad, el fotoperíodo y la calidad, en el caso de la temperatura es ésta la que controla la incubación para la propagación.

Medio de cultivo: este es un factor químico, y el éxito del cultivo depende en gran medida de la selección del medio de cultivo, por lo que su composición química y forma física es muy importante.

Los explantes se desarrollan dentro de los medios de cultivo *in vitro*, que se define como un conjunto de elementos abióticos (físicoquímicos) que conforman una sustancia nutritiva de diversa consistencia (sólida, semisólida o líquida) y le proporciona al explante, nutrición y estimulación de su desarrollo (Pierik, 1997).

En la actualidad existen diversas formulaciones, un medio de cultivo en forma general se caracterizan por contener los siguientes compuestos; fuente de carbono, sales minerales, reguladores de crecimiento, vitaminas, agente gelificante entre otros (Roca y Mroginski, 1993). Estos componentes pueden variar de acuerdo con la etapa en la que se encuentra el explante durante la micropropagación, o según sea la técnica que se va a emplear y la finalidad, por esto existen diferentes fórmulas que deben ser ajustadas según las

condiciones del laboratorio. La diferencia entre las fórmulas está la cantidad y concentración de los elementos que lo conforma (Klopfenstein et al., 1997).

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% a 5%) es el azúcar que más se utiliza, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructuosa; en general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas. La incorporación de mioinositol al medio (100 mg/litro) generalmente da como resultado un mejor crecimiento de los callos y suspensiones celulares (Roca y Mroginski, 1993).

En los medios semisólidos comúnmente se adiciona agar (0.6% a 1.0%). Se debe considerar especialmente la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y las concentraciones del agar utilizado pueden alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos (Debergh, 1982).

Las plantas verdes se consideran normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir al medio algunas de ellas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria, por

conveniencia. Desde hace mucho tiempo se sabe que las puntas radicales escindidas son incapaces de sintetizar la tiamina y presentan un requerimiento definitivo por la misma cuando se van a cultivar continuamente. En realidad, en la planta intacta las raíces deben obtener su tiamina del vástago donde es sintetizada (Roca y Mroginski, 1993).

Preparación del medio de cultivo

Según Roca y Mroginski (1993), para la preparación de los medios de cultivo se debe realizar lo siguiente: Es necesario preparar el medio utilizando agua bidestilada o agua desmineralizada-destilada (H₂O, DD). Se debe evitar el almacenamiento prolongado del medio para evitar la acumulación de contaminantes; todas las sustancias químicas usadas para su preparación deben ser de un alto grado de pureza.

El procedimiento para la preparación de los medios dependerá, en primera instancia, del tipo de medio, de su consistencia y de la presencia de componentes termolábiles. En general, se pueden distinguir:

a. Medios semisólidos sin sustancias termolábiles; su preparación consta de los siguientes pasos:

1) Incorporación del medio basal (MB), de los reguladores de crecimiento o de otros compuestos. Ajuste del pH.

2) Adición y disolución del agar. Distribución en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, cajas Petri, etc.).

3) Esterilización en el autoclave.

b. Medios líquidos con o sin sustancias termolábiles. Para su preparación se sigue el mismo procedimiento de a., pero sin adicionar agar, y haciendo la esterilización por filtración en el caso de medios que contengan sustancias termolábiles.

c. Medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles; para su preparación se sugieren las siguientes operaciones:

1) Incorporación de los compuestos que pueden ser esterilizados en el autoclave (tanto los del MB como los reguladores de crecimiento u otros compuestos). Ajuste del pH.

2) Adición y disolución del agar.

3) Esterilización en el autoclave.

4) Incorporación (operando en la cámara de transferencia) de la(s) sustancia(s) termolábil(es), previamente esterilizada(s) por filtración.

Los componentes esterilizados (paso 3) se deben mantener a una temperatura entre 40 y 50 °C.

5) Distribución (operando en la cámara de transferencia) del medio en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, cajas Petri, etc.) previamente esterilizados en el autoclave.

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura; estos dos factores están relativamente poco estudiados, y la información existente sobre ellos suele ser fragmentaria y a menudo contradictoria.

Etapas del cultivo in vitro

En la micropropagación se pueden distinguir las siguientes etapas: Etapa 0: selección y preparación de la planta y/o tejido donante de explantes. Etapa I: desinfección y adaptación de los explantes al medio artificial. Etapa II: multiplicación de brotes. Etapa III: enraizamiento y rusticación, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado para lo cual es recomendable mantener a las plantas madre un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero, en el que se va a cultivar la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de nutrición,

fotoperiodo e irradiancia adecuadas, Etapa IV: transferencia de la planta al medio de vida natural definitivo (Orellana, 1998).

Etapa 0: selección y preparación del material vegetal

Existen factores que deben ser tomados en cuenta, tales como: el origen de la planta madre y las condiciones en las que se desarrolló, las plantas de campo pueden ofrecer mayores inconvenientes que las plantas de invernadero; la edad de la planta madre, el material vegetal obtenido tendrá la misma edad biológica que la planta madre y por último, el estado fisiológico de la planta madre, pues ésta debe encontrarse en buenas condiciones nutritivas, metabólicas y de sanidad para proveer material vegetal de óptimas características (Abdelnour y Escalant, 1994).

Etapa I: establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y asépticos, para lograrlo se debe considerar dos factores que son particularmente importantes: el explante y la esterilización (Olmos et al., 2010).

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos' conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales

pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación. Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra; por ejemplo, es probable que los virus presentes en el explante persistan en los cultivos (Roca y Mroginski, 1993).

García y Noa (1998), mencionan que cuando se demostró que a través del cultivo de tejidos se podían obtener plantas libres de microorganismos, se abrieron nuevas posibilidades para la propagación de plantas sanas, siendo este descubrimiento el que abrió el camino a la micropropagación comercial. La combinación de técnicas tradicionales de saneamiento con el cultivo de tejidos y métodos más sensibles de diagnóstico, son la clave de la eficacia en la obtención de plantas libres de patógenos.

Roca y Mroginski (1993) indican que el procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes. No es factible recomendar un procedimiento general para este propósito, y

se deben considerar de manera especial las especies vegetales y el tipo de explante.

El éxito de los métodos de propagación, a través de la biotecnología, se sustenta sobre la base de obtener en corto tiempo grandes volúmenes de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria. Los procesos de desinfección a los cuales se somete el material vegetal durante la fase de establecimiento de la micropropagación, son suficientes para eliminar los microorganismos patógenos y no patógenos que se encuentren en la superficie de las hojas. Las enfermedades sistémicas, producidas por bacterias, virus, micoplasmas y rickettsias, pueden escaparse y diseminarse con el material que se propaga. Contar con un material vegetal de partida óptimo, es el resultado de la integración de diferentes aspectos, tales como, la selección adecuada en el campo de las plantas donadoras, la utilización de técnicas de diagnóstico confiables y métodos eficientes de saneamiento que garanticen la eliminación del patógeno.

Jiménez (1998), señala que las oxidaciones fenólicas pueden en ocasiones, constituir un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemos y ápices, las cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo que comienza por la zona

cercana al explante y puede extenderse a todo el medio produciendo una seria afectación en el crecimiento del explante, al que puede provocar la muerte. En estos casos también es útil usar las soluciones antioxidantes durante la preparación del explante, como también incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz. También se suele acortar el intervalo de tiempo entre subcultivos, como un medio para disminuir los efectos nocivos de la oxidación de polifenoles (Roca y Mroginski, 1993).

Fernández-Lorenzo et al. (1999), señalaron que el contenido de fenoles en los tejidos es un indicador del rejuvenecimiento o madurez de estos, es decir, la ausencia de fenoles es signo de rejuvenecimiento y la presencia significa madurez.

Las prácticas más comunes para contrarrestar el efecto de las oxidaciones fenólicas se pueden resumir de la siguiente forma:

- Enjuagues en soluciones antioxidantes previo y posterior a la disección de los explantes.
- Adición de antioxidantes al medio de cultivo.
- Cambios frecuentes de medio de cultivo.

Dentro de las sustancias químicas más utilizadas como antioxidantes se enumeran las siguientes:

- Ácido ascórbico
- L-Cisteína
- Ácido cítrico
- Carbón activado

El carbón activado (0,1% a 5%), incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por absorber metabolitos tóxicos (Roca y Mroginski, 1993).

Etapa II: multiplicación y elongación de brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron a la fase I originen de brotes (procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar (Pierik, 1990).

Como su nombre lo indica, el objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos (plantas, microtubérculos, microbulbillos) a partir de explantes (meristemas apicales o axilares,

yemas axilares o adventicias), ya establecidos *in vitro*. Generalmente, el proceso se inicia desde plantas donantes, seleccionadas, sin afectar las características y estabilidad genética de la variedad o clon. Existen tres métodos por los cuales puede lograrse este objetivo: propagación sobre la base de yemas axilares, yemas adventicias y a través de la Embriogénesis Somática.

La proliferación de los diferentes explantes en el cultivo *in vitro*, puede lograrse con el uso de sustancias reguladoras de crecimiento como componentes principales de un medio de cultivo previamente establecido y un adecuado manejo del proceso *in vitro*.

Monteuuis (1995), menciona que los protocolos de cultivo de tejidos usados se concibieron de simple manera para cubrir posible aplicación a gran escala, costos bajos y la proporción de productividad alta. La tecnología desarrollada habilita la micropropagación de masa de cualquier genotipo por retoño axilar con multiplicación exponencial con una tasa de tres a cuatro nuevos retoños cada dos meses.

La etapa de multiplicación generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La primera implica el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de auxinas más que citoquininas para favorecer la desdiferenciación.

La segunda etapa requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular. En este caso, el sistema es más dependiente de citoquininas (Olmos *et al.*, 2010).

Orellana (1998), manifiesta que la multiplicación es la fase más importante y determinante en todo programa de propagación *in vitro*. Es en ella donde se realiza la verdadera multiplicación o micropropagación de una especie o variedad definiéndose no sólo el número de plantas o propágulos a obtener, sino su calidad genética, por ser esta fase en la que se producen las variantes somaclonales.

Etapa III: enraizamiento

Esta etapa tiene como esencia originar una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo (Roca y Mroginski, 1993). El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*.

Orellana (1998), menciona que la fase de enraizamiento se caracteriza por ser la más voluminosa de todo el proceso. En ella cada brote, esqueje o yema de forma individual que se ha formado durante la fase de multiplicación, debe ser cultivada y manipulada *in vitro*. Además de crecer y desarrollar un seudotallo o tallo con las primeras hojas,

forma y desarrolla varias raíces que le permiten comenzar la absorción de nutrientes al trasplantarse sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una vitroplanta aclimatada lista para llevarse al campo.

Etapa IV: aclimatación del material obtenido in vitro

Durante la etapa de cultivo *in vitro*, las plantas se desarrollan bajo condiciones controladas, como son las condiciones ambientales, y se recurre a la utilización de los azúcares del medio como fuente de carbono y energía por lo cual en el momento del trasplante de las vitroplantas y el establecimiento completo en el invernadero puede ser complejo para algunas especies debido así características fenotípicas y genotípicas; el mantenimiento de las plantas “*in vitro*” produce anomalías fisiológicas, estructurales y anatómicas (Montes et al., 2016).

La aclimatación es el proceso en el cual un organismo individual se ajusta a un gradual cambio en su entorno como es el cambio en la temperatura, humedad, fotoperiodo o pH, lo que le permite mantener el rendimiento en una amplia gama de condiciones ambientales. La Aclimatación se produce en un período corto de tiempo (días a semanas) y dentro de toda la vida del organismo. La aclimatación de vitroplantas consiste en el paso de condiciones *in vitro*, a condiciones

ex vitro, con el objetivo de que éstas superen las dificultades cuando son removidas del ambiente “*in vitro*”; de esta manera, se preparan para su trasplante definitivo al suelo (Leyva, 2012).

Agramonte et al., (1998), manifiestan que durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y la fisiología de las plantas, que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo.

Estrategias para propagación clonal

Según Roca y Mroginski (1993), existen varias vías generales para realizar la multiplicación clonal; entre ellas están:

- a. La multiplicación de brotes de yemas terminales, axilares o laterales. El punto de inicio en este caso puede estar en los meristemas, las puntas de los brotes, las yemas, los nudos o los brotes de las yemas en raíces.
- b. La organogénesis directa. En este caso la formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en el explante de un órgano, o en alguna parte escindida de la planta.

- c. La organogénesis indirecta. La formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en este caso en el callo; es obvio que el callo se deriva inicialmente de un órgano, tejido u otra parte escindida de la planta.
- d. La embriogénesis somática. Los embriones pueden formarse directamente en el explante primario, o indirectamente de las células cultivadas en suspensión o en un medio semisólido.
- e. Los órganos de perennidad, formados en cultivos asépticos.
- f. El microinjerto.
- g. El cultivo de embriones y esporas.

Aplicaciones de la biotecnología en el campo vegetal

Aplicaciones en especies frutales

La biotecnología puede contribuir al aumento y mejoramiento de la producción de frutales; esta tecnología permite obtener material de elevada productividad. Además, el cultivo de tejidos ha dado un gran aporte a la agricultura y constituye una vía fundamental en la actividad científico-tecnológica, por lo que el empleo de las técnicas de propagación *in vitro* en frutales resulta una vía valiosa para la multiplicación, el rescate y la conservación de estas especies (Montes et al., 2016).

El uso de técnicas biotecnológicas ofrece la posibilidad de multiplicar masivamente genotipos valiosos incluyendo los frutales que se encuentran amenazados, como el marañón (*Anacardium occidentale* L.), por lo que puede contribuir al aumento y mejoramiento de la producción de especies de importancia económica. A partir de los resultados de los últimos años, en una gran cantidad de especies vegetales se ha extendido el empleo de las técnicas biotecnológicas, por lo que resulta valiosa la aplicación de estas en las especies frutales

(Kessel, 2008). Otros árboles frutales que han sido propagados mediante esta técnica es el nogal (*Juglans neotrópica*) (Rocano, et al., 2017). Ver tabla 1.

Aplicaciones en especies agrícolas

En Ecuador el cultivo agrícola es de mucha importancia para miles de familias ecuatorianas, debido a la demanda nacional e internacional que se exporta a la Unión Europea y Estados Unidos. Por otro lado, los métodos de propagación tradicional no garantizan la obtención de plantas libres de enfermedades o altos rendimientos al ser propagados por la vía tradicional, producto del ataque de enfermedades. Esto ha generado la búsqueda de nuevos métodos de propagación para las especies agrícolas.

A continuación, se muestran algunas especies agrícolas propagadas vía *in vitro* en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UTEQ:

Propagación in vitro de piña

Saucedo et al., (2008) establecieron un protocolo para la propagación *in vitro* de dos variedades de piña (*Ananas comosus* (L) Merr), también determinaron las mejores concentraciones de reguladores de crecimiento en el establecimiento, multiplicación, enraizamiento y

aclimatación *ex vitro*. Para el establecimiento de piña var. Champaka y Hawaiana la mejor concentración fue en un medio de cultivo conformado por la totalidad de las sales del MS suplementado con BAP (0.5 mgL^{-1}); AIB (1.0 mgL^{-1}) y ANA (1.0 mgL^{-1}) obteniéndose el 47 y 56 % de supervivencia respectivamente. Para la proliferación de brotes la mejor concentración fue un medio de cultivo conformado por la totalidad de las sales del MS suplementado con 3.5 y 4.0 mgL^{-1} de BAP en la var. Champaka y la var. Hawaiana con 3.5 mgL^{-1} de BAP. Para el enraizamiento *ex vitro* y aclimatación la mejor respuesta al número de raíces se presentó en el testigo (sin hormona) var. hawaiana con un promedio de 7.25. La mayor longitud se evidenció en el testigo (sin hormona) con 3.55 cm se obtuvo una sobrevivencia de 93.75 % para la var. Hawaiana y 79.16 % para la var. Champaka. Los mejores resultados en el enraizamiento y aclimataciones *ex vitro* de vitroplantas de piña se obtuvieron con el testigo en la variedad Champaka y con la auxina ANA (ácido naptalenacetico) 50 mgL^{-1} en la var. Hawaiana.

Propagación in vitro de malanga

En este trabajo se ensayaron varias concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento tanto para el establecimiento y

multiplicación *in vitro* de yemas, como para el enraizamiento y aclimatación *ex vitro* de explantes de malanga (*Xantomona sagittifolium* (L) Schott.). El 68.75% de las yemas establecidas en un medio de cultivo conformado por la totalidad de las sales del MS suplementado con 0.1 mgL⁻¹ de BAP sobrevivieron sin contaminarse. En el mejor de los casos, los brotes se multiplicaron 1.91 veces y crecieron hasta 4.86 cm en el primer subcultivo que utilizó la totalidad de las sales del MS suplementado con 3 mgL⁻¹ BAP + 1.5 mgL⁻¹ AIA. En la fase de enraizamiento y aclimatación sobrevivieron el 75% de los explantes testigo, a pesar de que desarrollaron las raíces más largas (6.92 cm). Con el tratamiento conteniendo 500 mgkg⁻¹ tanto de ANA como de AIB; sobrevivieron el 80% de los brotes, los cuales desarrollaron en promedio 9.14 raíces de 5.9 cm c/u. Los tratamientos mencionados, con las concentraciones de auxina más bajas, presentaron los mejores resultados para el enraizamiento y aclimatación de las vitroplantas de malanga (Saucedo et al., 2008b).

Propagación in vitro de plátano variedad Maqueño

Canchignia et al., (2008) mencionan que la reproducción *in vitro* es un método adecuado para la propagación masiva de plantas, esta técnica permite y garantiza una efectividad para la exportación

comercial de genotipos seleccionados de musáceas como es el caso de plátano maqueño. Para el establecimiento aséptico de yemas a nivel *in vitro*, el mejor tratamiento de desinfección fue al 20% de cloro durante 20 minutos + 0.1% de bicloruro de mercurio por 10 minutos obteniendo el 100% de explantes sanos. En la multiplicación la mejor respuesta se obtuvo con el tratamiento 5 mg L⁻¹ de BAP+1.2 mg L⁻¹ AIA con un valor promedio de 2.5 brotes. La fase de desarrollo el mejor resultado se logró en el tratamiento compuesto por MS + 20 g sacarosa + 1 g de carbón activado. En la aclimatación y el enraizamiento *ex vitro* de las vitro plantas la respuesta se alcanzó en el sustrato tierra de campo obteniéndose mayor número de plantas adaptadas, con una longitud de raíz 6.1 cm, el sustrato conformado por tamo de arroz originó un menor porcentaje de sobrevivencia.

Propagación in vitro de plátano Barraganete y banano

Valery y Orito

Canchignia et al., (2008b) indican que en la propagación vegetativa de dos variedades de Banano (Valery y Orito) y una de Plátano (Barraganete), se sometió a diferentes tratamientos hormonales, para evaluar el número de brotes, la concentración 30 mgL⁻¹ de BAP alcanzó el mayor promedio, con 2.36 brotes para todas las variedades.

En longitud y diámetro de brotes, la concentración que logró el mayor promedio fue C_0 , no encontrándose diferencias entre las concentraciones de 6-BAP y AIA. La variedad que presentó la mayor longitud y diámetro de brotes fue el banano Orito con 55.65 y 2.97 cm, respectivamente. El mayor porcentaje de vigor alto de brote lo demostró el tratamiento con 40 mgL^{-1} BAP + 12 mgL^{-1} AIA con 24.17%; el mayor porcentaje de vigor medio lo alcanzó el tratamiento con 30 mgL^{-1} BAP y sin hormona con 72.22%, la supervivencia de cepas, en las variedades Barraganete y Orito presentaron el 100% de cepas vivas, superando al banano Valery quien obtuvo un promedio de 91.67%.

Propagación in vitro de banano Orito

Cruz et al., (2016) establecieron un protocolo para la propagación *in vitro* de banano variedad Orito (*M. acuminata* AA), con cuatro fases (establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatización). Se partió de cormos, a los que se les realizaron los respectivos rebajes antes de llevarlos al laboratorio. En la primera fase de establecimiento aséptico de yemas, se controló eficientemente la contaminación por microorganismos en el tratamiento T2 (Tween 80 0.1 % con cloro 20 % y HgCl_2 0.2 % durante 5 min), obteniendo explantes completamente libres de contaminación y con un 100 % de supervivencia. Los

explantes sanos y asépticos fueron transferidos a la fase de multiplicación, y mostraron efectos similares en el número de brotes (1.31) para todas las concentraciones estudiadas. La variable longitud de brote fue de 8.57 cm para el T1 (menor concentración de BAP 2 mgL⁻¹ más AIA 0.43 mgL⁻¹). Los brotes obtenidos fueron sucesivamente transferidos a un medio de refrescamiento *in vitro* y al invernadero para su enraizamiento y aclimatación *ex vitro* en arena. En esta última fase se obtuvo un 100 % de supervivencia, 7 raíces por planta y una altura promedio de 11.40 cm. Las plantas obtenidas por este método de propagación fueron vigorosas, sanas y asépticas.

Aplicaciones en especies forestales

Las especies perennes han mostrado mayores obstáculos para su micropropagación, en comparación con las especies anuales. En la actualidad aun cuando se han logrado importantes avances, todavía se enfrentan dificultades que generan grandes pérdidas económicas (Yasodha, 2004).

La tendencia mundial actual se origina hacia el establecimiento de plantaciones forestales comerciales para obtener materia prima más homogénea, barata y reducir la presión sobre el bosque natural (Buitrago, 2008). La modificación genética y otras biotecnologías, pueden tener una

función de importancia en las plantaciones forestales, (Marcucci et al., 2010).

La biotecnología ofrece nuevas herramientas que se suman a las clásicas de la silvicultura, para cumplir dos objetivos básicos del gestión forestal actual: mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales para la conservación y la utilización de los recursos genéticos, y mejoramiento genético en plantaciones forestales (Martínez, 2001).

El uso de la micropropagación en especies forestales ha tomado gran importancia, ya que permite multiplicar individuos de excelente calidad genética y genotípica, lo que se traduce en menos costos de producción y mayores ingresos por la venta del producto final (Gutiérrez, 1996). Sin embargo, el costo de la planta micropropagada es muy elevado en relación con el de la planta de semilla; por ello, los esfuerzos en propagación de especies forestales van dirigidos a la búsqueda de técnicas más eficientes como es la embriogénesis somática.

En varias instituciones de nuestro país se han realizado varios protocolos de micropropagación *in vitro* de especies agrícolas y forestales nativas y exóticas, que tienen importancia ecológica y económica (Tabla 1).

Tabla 1. Instituciones públicas y privadas del Ecuador donde se han realizado diferentes protocolos de micropropagación in vitro de plantas

Instituciones	Especies
Biogreen	Banano, plátano, jatrofa
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo	Cedro
Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias	Musáceas, cacao, ají, tomate de árbol
Leplant	Arándano, mora, frambuesa, orquídea, cactus, heliconia, carnívoras
Neoforests S.A.	Teca
Universidad de las Américas	Mortino
Universidad Central del Ecuador	Algarrobo, capulí
Universidad de Guayaquil	Café
Universidad de Cuenca	Nogal
Universidad Estatal del Sur de Manabí	Bálsamo, guayacán, madero negro
Universidad Nacional de Loja	Guayacán negro
Universidad Politécnica Salesiana	Tzimbalo, geranio
Universidad San Francisco de Quito	Tomate de árbol
Universidad Técnica Estatal de Quevedo	Banano, plátano, orquídea, heliconia, malanga, piña, teca
Universidad Técnica de Machala	Piña
Universidad Técnica del Norte	Anturio, crisantemo, carnívoras, orquídeas, mini rosa

Dentro de las especies forestales exóticas de interés económico se encuentra la teca, esta especie ha sido propagada por dos instituciones a nivel nacional (Neoforests S.A. y la UTEQ) Tabla 1. El protocolo de propagación para la teca se lo realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UTEQ, que a continuación se detalla:

***Micropropagación clonal In vitro de árboles
seleccionados de teca***

La teca (*Tectona grandis* L.F.) es una especie tropical, originaria de la India, Myanmar y Tailandia; fue introducida en América hace más de cien años y se estima que en el mundo se cultivan más de 3.000.000 de hectáreas (Centeno, 1997). En el Ecuador existen aproximadamente 8.500 hectáreas, por lo que esta especie se proyectará a ser una de las maderas más importantes debido a que presenta un color fascinante, algo parecido al oro, se utiliza en diversas industrias y tiene gran demanda para la ebanistería. Se ha utilizado durante más de 2.000 años en su ámbito natural, en Asia, como madera de construcción extraordinariamente duradera, así como por su excelente estabilidad y sus cualidades estéticas (Vásquez y Ulloa, 1996).

El cultivo de la teca se ha intensificado enormemente en los últimos 10 años. Hoy día el aprovechamiento de algunas plantaciones de

mediana edad (15 años) muestra la necesidad de mejorar los conocimientos y las técnicas de manejo para esta especie de rápido crecimiento, debido principalmente a la baja productividad y escasa calidad de los productos (Pérez-Cordero, 2001).

La deforestación ha provocado el deterioro del bosque natural debido a la necesidad de obtener recursos del bosque como leña, madera fina y la extracción de petróleo; éstas son algunas de las causas que han provocado la pérdida de más de 300.000 ha de bosque nativo por año en el Ecuador, sin que exista la mínima posibilidad de recuperarlos (Sierra, 1994). La explotación irracional del recurso maderero y la falta de concienciación de las personas involucradas en este campo han provocado que especies como la teca, a pesar de ser exótica e introducida al país con fines comerciales, se vean en peligro por el interés económico que ésta despierta basado en la belleza y calidad de su madera (Vásquez & Ulloa, 1996).

La falta de plantaciones productoras de semilla obtenidas de material genético seleccionado es otro de los problemas al que se ven abocados los productores de madera, puesto que las semillas que recolectan o compran no presentan ninguna certificación que les garantice exitosos resultados en la empresa forestal.

El uso de la micropropagación en especies forestales ha tomado gran importancia, ya que permite multiplicar individuos de excelente calidad genética y genotípica, lo que se traduce en menos costos de producción y mayores ingresos por la venta del producto final (Gutiérrez, 1996). Sin embargo, el costo de la planta micropropagada es muy elevado en relación con el de la planta de semilla; por ello, los esfuerzos en propagación de especies forestales van dirigidos a la búsqueda de técnicas más eficientes como es la embriogénesis somática. El uso de esta tecnología, cuando se ha optimizado, permite tener un alto coeficiente de multiplicación en cortos periodos de tiempo, y se dispone, además, de un material con buenas características fenotípicas (Gómez et al., 2006).

Además, esta técnica permitirá incrementar la tasa de multiplicación que por la vía sexual no se ha logrado (Santos et al., 2013). Otras de las ventajas, es que puede mantener un alto margen de sanidad y estabilidad genética del material propagado por esta vía.

El principal objetivo de esta investigación fue: Establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de árboles seleccionados de teca.

Materiales y métodos

La presente investigación se la realizó en el Laboratorio de Cultivo de tejidos de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicado en los predios centrales de la Universidad, Km 1 ½ vía Quevedo - Santo Domingo de los Tsáchilas.

Para establecer la metodología de micropropagación *in vitro* de teca se utilizaron yemas terminales, obtenidas de brotes de árboles adultos (Figura 1). Las mismas que se seleccionaron, cortaron, desinfectaron y se establecieron sin ninguna labor de rejuvenecimiento contrario a lo expuesto por Ramos (2000).

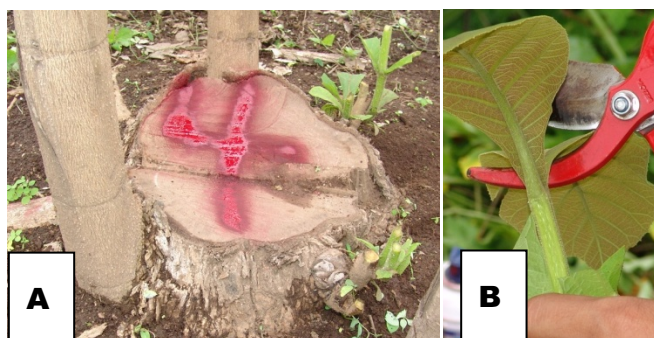


Figura 1: Fuente de explante. (A) Árboles seleccionados por sus buenas características fenotípicas, donadores de explante, (B) Obtención de yemas terminales

Las yemas apicales fueron colocadas en agua destilada estéril con Tween 20 durante 10 minutos, luego se desinfectaron con Cobox

durante 20 minutos y la última desinfección se la realizó dentro de la cámara de flujo laminar con bicloruro de mercurio durante cinco minutos. Los explantes fueron colocados en sus respectivos tratamientos, el medio de cultivo utilizado fue MS (Murashige y Skoog, 1962) (Figura 2).



Figura 2. Yema de teca en medio de cultivo MS

En la fase de establecimiento las yemas fueron colocadas bajo los tratamientos:

- MS (testigo)
- MS + 0,5 mgL⁻¹ BAP
- MS + 1,0 mgL⁻¹ BAP
- MS + 1,5 mgL⁻¹ BAP

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cuatro tratamientos y ocho repeticiones. Cada frasco fue una repetición, provisto de cuatro explantes.

A los 28 días se evaluó número de brotes contaminados, longitud de brotes y supervivencia.

En la fase de multiplicación se utilizaron los siguientes tratamientos:

- MS + 0,5 mgL⁻¹ BAP + 0,25 mgL⁻¹ KIN
- MS + 1,0 mgL⁻¹ BAP + 0,50 mgL⁻¹ KIN
- MS + 1,5 mgL⁻¹ BAP + 0,75 mgL⁻¹ KIN

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cuatro tratamientos y ocho repeticiones. Cada frasco fue una repetición, provisto de cuatro explantes.

A los 28 días se evaluó número de brotes, longitud de brotes y supervivencia.

En la fase de enraizamiento se utilizaron los tratamientos:

- Sin polvo enraizador (testigo)
- Polvo enraizador con 500 mgKg⁻¹ ANA + 500 mgKg⁻¹ AIB
- Polvo enraizador con 1000 mgKg⁻¹ ANA + 1000 mgKg⁻¹ AIB
- Polvo enraizador con 1500 mgKg⁻¹ ANA + 1500 mgKg⁻¹ AIB

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cuatro tratamientos 30 repeticiones para cada tratamiento.

A los 35 días se evaluó el porcentaje de plantas enraizadas, número de raíces, longitud de raíces y supervivencia.

3.3.1.2 Resultados y discusión

La presente investigación se la realizó en fases cuyos resultados se detallan a continuación:

a) Fase de establecimiento

Con el método de desinfección utilizado se logró un alto porcentaje de brotes libres de contaminación (98%), por lo que se concluyó que el procedimiento de desinfección usado fue acertado, si evaluamos que el material fue extraído directamente del campo sin pretratamiento ni rejuvenecimiento. El aviveramiento y rejuvenecimiento en cascada

son procesos recomendables para disminuir la incidencia de microorganismos patógenos y la presencia de sustancias como fenoles, resinas, látex y taninos y así obtener una respuesta rápida del explante a los reguladores del crecimiento.

Es importante mencionar que este método de desinfección fue usado por Monteuis et al., (1994) y modificado por Ramos (2000) en el tiempo de exposición de los explantes con bicloruro de mercurio de 30 a 10 minutos.

Posiblemente la baja contaminación reportada en esta investigación se debió a que los explantes recolectados y desinfectados se sembraron (fase preparatoria) en un medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento. Después de 15 días los explantes que no se fenolizaron fueron transferidos a un medio de cultivo que contenía las sales al 100 %, adicionando diferentes concentraciones de hormonas. Pero para evitar la fenolización de los explantes se adicionó al medio antioxidantes como L-cisteína en concentración de 50 mgL^{-1} , 10 mgL^{-1} de ácido ascórbico, lo que permitió una supervivencia promedio de 75 % en los tratamientos evaluados. Coincidiendo con Fernandez-Lorenzo et al., (1999), quienes señalan que el mayor contenido de fenoles en los tejidos es un indicador de madurez y la no presencia es

una señal de rejuvenecimiento. Esto mismo manifiesta Ramos (2000), quién con un rejuvenecimiento en cascada impidió la presencia de fenoles en el medio de cultivo.

Los problemas de fenolización que se presentaron se debió a que el material usado para la transferencia no tuvo ningún rejuvenecimiento. Si se evalúa la edad de los explantes se puede observar que provienen de árboles adultos y por ende siempre habrá mayor fenolización. Por esta razón antes del establecimiento se realizó una fase preparatoria, logrando con este procedimiento se elimina la fenolización en la fase de establecimiento.

Roca y Mroginski (1991), indican que el empleo de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, L-cisteína, entre otros), puede ser utilizada para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. En estos casos, también es útil usar soluciones antioxidantes durante la preparación del explante, como también incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz. También se suele acortar el intervalo de tiempo entre subcultivos, como un medio de disminuir los efectos nocivos de la oxidación de polifenoles.

El carbón activado (0,1 % a 5 %), incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente para absorber metabolitos tóxicos.

Tabla 2. Establecimiento in vitro de brotes de teca bajo diferentes concentraciones de citoquininas

Variables	Tratamientos			
	MS	MS + 0,5 BAP	MS + 1,0 BAP	MS + 1,5 BAP
Long. de brotes (cm)	1,23 b	1,87 a	1,71 ab	1,50 ab
Supervivencia (%)	78,13 a	71,88 a	75,00 a	78,13 a

Concentraciones de citoquininas expresadas en miligramos por litro.

Promedios con diferentes letras presentan diferencias estadísticas (Tukey, P = 0,05)

En relación con la longitud de los brotes de teca (Tabla 2), la mejor respuesta se presentó con el tratamiento “MS+0,5 mgL⁻¹ BAP”, con 1,87 cm, por lo que se demuestra que este medio de cultivo es favorable para obtener una mayor longitud de brotes. Esta respuesta coincide con la reportada en estudios realizados en esta y otras especies vegetales donde se evidencia que la adición exógena de citocininas promueve el rompimiento de la dominancia apical y

consecuentemente, una activación del crecimiento de los meristemas axilares presentes en los explantes cultivados *in vitro*, propiciando un aumento en la tasa de multiplicación por la formación de nuevos brotes (Santos et al., 2013).

Es importante mencionar que a medida que se aumenta la concentración de citoquininas (BAP) en el medio de cultivo, disminuye la longitud del brote. Esto indica que concentraciones altas de esta hormona inhiben el crecimiento de la teca, lo que concuerda con Gupta et al., (1980), quienes demostraron que con 5 mgL⁻¹ de BAP en el medio de cultivo, los explantes se mueren y con concentraciones bajas, en un rango de 0,1 hasta 2,0 mgL⁻¹ se desarrollan los cotiledones.

Sobre esta base, los resultados indican que el mejor tratamiento es el que contenía una concentración de 0,5 mgL⁻¹ BAP en el medio de cultivo con sales minerales del MS al 100 %, y llevan a rechazar la hipótesis que “con 1 mgL⁻¹ BAP se obtiene un mejor establecimiento *in vitro* de ápices de teca”.

En cuanto a la supervivencia, no hubo diferencias significativas para los tratamientos bajo estudio (Tabla 2).

b) Fase de multiplicación

El objetivo de esta fase fue establecer la mejor concentración de citoquininas (BAP Y KIN), para la proliferación de brotes de teca, en el material que provino del mejor tratamiento de la fase de establecimiento, con una longitud de 1,0 – 2,0 cm.

Tabla 3. Multiplicación in vitro de brotes de teca bajo diferentes concentraciones de citoquininas

Variables	Tratamientos		
	MS + 0,5 BAP + 0,25 KIN	MS + 1,0 BAP + 0,5 KIN	MS + 1,5 BAP + 0,75 KIN
Número de brotes	1,58 a	1,95 a	1,94 a
Long. de brotes (cm)	2,0 a	1,9 a	1,8 a
Supervivencia (%)	81,25 a	71,43 a	78,13 a

Concentraciones de citoquininas expresadas en miligramos por litro

Promedios con diferentes letras presentan diferencias estadísticas (Tukey, P = 0,05)

En la Tabla 3, se observa el número de brotes de teca en un medio de cultivo MS con sales al 100 %, con diferentes concentraciones de citoquininas. No se reportaron diferencias estadísticas entre tratamientos, pero numéricamente el mejor para esta variable fue el tratamiento MS+1,0 mgL⁻¹ + 0,5 mgL⁻¹ KIN el que alcanzó un promedio de 1,95 brotes por explante. Estos resultados concuerdan con (Santos et al., 2013) los cuales utilizaron segmentos nodales de teca de 2 a 3 cm. Estos resultados también concuerdan con los datos

obtenidos por Ramos (2000) quien obtuvo el mayor número de brotes combinando BAP y KIN en proporciones 2:1, respectivamente, cuyas hormonas fueron colocadas en un medio MS suplementado con $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ BAP y $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ KIN, por lo que se acepta la hipótesis que “con 1 mgL^{-1} de BAP mas $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN se obtiene una mayor proliferación de brotes”.

En relación con la longitud de brotes de teca establecidos en un medio de cultivo con sales al 100 % con diferentes concentraciones de citoquininas, no se encontraron también diferencias significativas entre los tratamientos en estudio. Numéricamente el mejor tratamiento para esta variable fue el que contenía la concentración de $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ BAP+ $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ KIN, en donde se alcanzó un promedio de longitud de los brotes de 2,038 cm. estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ramos (2000), quien estudió el comportamiento del número de entrenudos en los medios de cultivo con diferentes concentraciones de BAP y KIN, encontrando que el número de entrenudos aumentan a medida que disminuyen los niveles de citoquininas.



Figura 3. Brotes de teca en fase de multiplicación in vitro

Con concentraciones más bajas se obtuvo una mayor longitud de brotes, ocurriendo lo contrario a medida que se aumentó las concentraciones de esta hormona, por lo que se infiere que la teca debe ser multiplicada con concentraciones bajas de citoquinas. Estos resultados fueron similares a los reportados por Nadgauda et al., (1997), quienes emplearon concentraciones menores de citoquininas ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$ BAP y $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ KIN), es decir, una relación 2:1 obtuvieron una buena respuesta de la teca.

La concentración de citoquininas combinadas no estimula la división celular y más bien está creando un proceso de inhibición en el crecimiento de la planta. Roca y Mroginski (1991), manifiestan que el carbón activado se ha usado para superar problemas específicos de oxidación, los cuales se asocian con el cultivo de tejidos de teca. Por su

parte Fridborg et al. (1978), indican que la adición de esta sustancia a los cultivos embriogénicos promueve su desarrollo cuando este ha sido inhibido, ya que al parecer absorbe del medio los compuestos fenólicos las auxinas y citoquininas que inhiben el desarrollo del embrión somático.

La supervivencia de los brotes en la fase de multiplicación no tuvo diferencia significativa, pero con las concentraciones bajas se obtuvo una mayor tasa de supervivencia (81,25 %) (Tabla 3).

Cabe indicar que en esta fase no hubo problemas de contaminación.

c) Fase de enraizamiento y aclimatización ex vitro

El objetivo de esta fase fue lograr el mayor porcentaje de enraizamiento ex vitro de los brotes obtenidos de la fase de multiplicación, utilizando diferentes niveles de polvos enraizadores (ANA y AIB), los cuales fueron al umbráculo y colocados en una bandeja germinadora bajo túnel de polietileno, con sustrato de arena con riego microjet. Otro objetivo de esta fase fue tratar de mantener un ambiente estable a las vitro plantas para que no se estresen y por ende mueran. Además, lograr en esta fase buenos resultados puesto que las plantas aun no tienen su estructura anatómica, fenológica y

bioquímica totalmente desarrollada debido a que vienen de un ambiente totalmente estéril y bajo condiciones controladas.

Tabla 4. Enraizamiento in vitro de brotes de teca bajo diferentes concentraciones de auxinas

Variables	Tratamientos			
	Testigo	500 ANA + 500 AIB	1000 ANA + 1000 AIB	1500 ANA + 1500 AIB
Plantas enraizadas (%)	100 a	100 a	100 a	94 a
Número de raíces	2,59 a	2,74 a	3,06 a	2,94 a
Longitud de raíz (cm)	5,21 a	4,91 a	3,02 b	2,90 b
Supervivencia (%)	90,00 a	63,33 ab	56,67 b	56,67 b

Concentraciones de auxinas expresadas en miligramos por litro

Promedios con diferentes letras presentan diferencias estadísticas (Tukey, $P = 0,05$)

En la Tabla 4, se observa el comportamiento del porcentaje de plantas enraizadas ex vitro de las microestacas de teca, donde no se encontró diferencia estadística entre tratamientos. La respuesta de las microestacas al enraizamiento parece haber sido influenciada por la presencia y ausencia de las auxinas en los polvos, ya que casi la totalidad de las plantas que sobrevivieron enraizaron (98,75 %) (Tabla 4), estos resultados concuerdan con Santos et al., (2013) quien observó un 93,3 % y 100% de enraizamiento de brotes micropropagados de teca

que fueron trasplantados en turba y arena cuarzítica, respectivamente. En el testigo se obtuvo la mayor supervivencia (90%) y a medida que va en aumento la concentración de auxina disminuye la supervivencia. Se anota que en esta variable si existió diferencia estadística entre tratamientos.

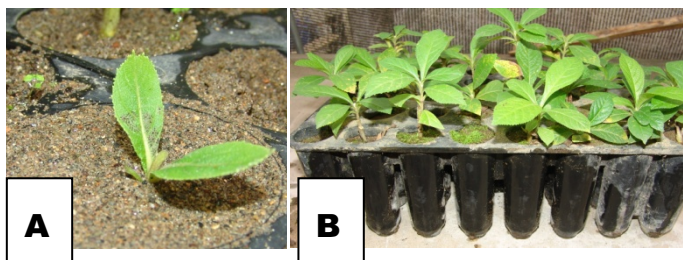


Figura 4. Aclimatización y enraizamiento. (A) Vitroplanta de teca en fase de enraizamiento y aclimatización. (B) Plantas enraizadas y aclimatadas de teca

En el mencionado tabla, se observa también la media del número de raíces por planta, en donde se utilizó diferentes concentraciones de auxinas. El análisis estadístico reportó que no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Numéricamente el que mejor respuesta presentó fue el tratamiento con 1000 mgKg^{-1} ANA + 1000 mgKg^{-1} AIB en donde este alcanzó un promedio de raíces por plantas de 3,06. Ramos (2000), obtuvo en la misma concentración el mayor número de raíces (2,0). En esta investigación se observaron resultados más altos que los obtenidos por Ramos (2000), lo que puede deberse a las procedencias del material. Comparando las dos

investigaciones se encontraron tendencias similares. A menor concentración disminuye el número de raíces y, a mayor concentración sucede lo mismo. Con estos antecedentes, la concentración óptima de auxinas para la proliferación de raíces es el tratamiento con 1000 mgKg^{-1} ANA + 1000 mgKg^{-1} AIB.

Al analizar el comportamiento de la longitud alcanzada por las raíces con diferentes concentraciones de polvos enraizadores (Tabla 4), se reportaron diferencias estadísticas para los tratamientos. El mejor tratamiento fue el testigo (sin polvo enraizador) con una longitud de 5,21 cm, lo que concuerda con (Castro y Díaz, 2009), quienes reportaron la formación de raíces en 18% de los brotes sin adición de auxinas en el medio.

También se notó que a medida que se aumenta la concentración de auxina, las plantas disminuyen su longitud de raíz. Santos et al., (2013) afirma que la presencia de altas concentraciones de AIB en el medio tienden a disminuir el porcentaje de enraizamiento.

Si se revisan las tres fases en estudio sucede lo mismo que a mayor concentración de los reguladores del crecimiento vegetal disminuye el crecimiento de los diferentes órganos de la teca.

Conclusiones

Se logró establecer un protocolo para la micropropagación de la teca a partir de yemas apicales de árboles adultos. En el establecimiento de yemas de teca la mejor respuesta se encontró en un medio de cultivo suplementado con $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP, se alcanzó una longitud de brotes de 1,87 cm. Para la fase de multiplicación la mejor concentración fue un medio de cultivo suplementado con $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP + $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN, donde se obtuvo 1,95 número de brotes por vitroplanta. En la fase de enraizamiento ex vitro, la mejor respuesta para el número de raíces se presentó en el tratamiento 1000 mgKg^{-1} ANA + 1000 mgKg^{-1} AIB.

Los resultados encontrados en el presente trabajo demuestran la posibilidad de desarrollar protocolos de propagación de material *in vitro* de teca, utilizando técnicas de micropropagación de yemas axilares y terminales, lo cual constituye en la actualidad una técnica para el intercambio de materiales élite entre laboratorios de forma segura, en espacios reducidos y con seguridad.

Esta técnica es eficiente para la propagación *in vitro* de especies forestales, por esta razón luego de haber desarrollado el protocolo de micropropagación *in vitro* de árboles seleccionados de teca, se

establecieron en campo las vitroplantas para evaluar su comportamiento silvícola. Estas evaluaciones de campo permitieron conocer la sanidad del material, características fenológicas del crecimiento y desarrollo de las vitroplantas. En los cuatro semestres que fueron observadas las vitroplantas de teca, estas obtuvieron el mayor incremento en diámetro, altura y área basal con respecto a plantas obtenidas por propagación tradicional. El material vegetal presentó diferencias altamente significativas para los tratamientos. Al segundo año de establecidas las parcelas de campo, se obtuvo una producción de madera 75 % superior en las vitroplantas cuando fueron comparadas con las plantas proveniente de tocones de teca. Esta información podría ser publicada en una futura obra.

Este método de propagación *in vitro* es la herramienta que permitirá obtener plantas con excelentes características: sanidad, alto vigor y rendimiento de frutos.

Por último, las aplicaciones biotecnológicas inciden de manera simultánea y novedosa en sectores como: agrícola, pecuario, medio ambiental, industrial y de la salud, y alcanzan progresivamente una mayor influencia en sectores de gran importancia para la economía

nacional e internacional, como lo son el farmacéutico, químico y de alimentos procesados.

Referencias

- Abdelnour, A y Escalant, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Costa Rica: Biblioteca Orton IICA/CATIE.
- Agramonte, D., Jiménez F., Dita M. (1998). Aclimatación. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. v. 1. GEO. Cuba. pp. 195-206.
- Betancourt, A. (1987). Silvicultura Especial de Arboles Maderables Tropicales. Cuba. Científico-Técnica. pp. 342-356.
- Buitrago, A. (2008). *Biotecnología aplicada en especies forestales*.
- Canchignia, H., Toaquiza, J., Ramos, L., Sigcha, L., Carranza, M., Cevallos, O., y Saucedo, S. (2008). Alternativas para la propagación *in vitro* de plátano variedad maqueño (*Musa balbisiana* AAB). *Ciencia y Tecnología*, 1(1), 43-48.
- Canchignia, H., Espinoza, M. Benavides, G. Saucedo, G. Carranza, S. y Cevallos, O. (2008b). Propagación Vegetativa de Plátano y Banano con la Aplicación de Benzilaminopurina (6-BAP) y Acido Indolacético (AIA). *Ciencia y Tecnología*, (1), 11-15.

- Castro, D. y Díaz, J. (2009). Micropropagación de árboles plus de teca (*Tectona grandis*). Memorias I Congreso Internacional del Cultivo de Teca. Quevedo-Los Ríos-Ecuador, p8.
- Castañeda, O., Gómez, F., Trejo, L., Morales, V., González, M., Martínez, Y., ... Pastelín, M. (2014). Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar (*Saccharum spp.*). *Agroproductividad*, 7(2), 16–21.
- CEDEGE (1992). Manejo Ambiental del Embalse Daule-Peripa. Informe Técnico, pp. 164-170, Ecuador.
- Centeno, J. (1997). The management of Teak plantations. ITTO Tropical Forest Update 7(2): 1-5.
- Cruz, N., Canchignia, H., Morante, J., Nieto, E., Cruz, E., y Cabrera, D. (2016). *In vitro* propagation of the Orito banana cultivar (*Musa acuminata* AA). *Biotechnologia Aplicada*, 33(4), 4201–4204.
- Cubero, J. (2003). *Introducción a la mejora genética vegetal*. España: Mundi-Prensa Libros.
- Debergh, P. (1982). Physical properties of culture media. En: Fujiwara, A. (ed.). *Plant tissue culture 1982*. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Tokio, p. 135-136.

- FAO. (1990). Fundamentos Teóricos-Prácticos del cultivo de tejidos vegetales. (R. Villalobos & R. Cadmo, Eds.).
- FAO. (2010). La deforestación disminuye en el mundo, pero continúa a ritmo alarmante en muchos países. Retrieved June 20, 2019, from <http://www.fao.org/news/story/es/item/40952/icode/>
- FAO. (2018). El estado de los bosques del mundo. Retrieved June 20, 2019, from <http://www.fao.org/state-of-forests/es/>
- Fernández-Lorenzo, J., Rigueiro A., Ballester A. (1999). Phenols as markers of juvenile tissues in mature trees. *Tree Physiology*, 19, 461-466.
- Fridborg, G; Pedersen M; Landstron L. y Erikson T. (1978). The effect of activated charcoal on tissue cultures: Adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol. Plant*, 43, 104-106.
- García, L. y Noa, J. (1998). Obtención de plantas libres de patógenos. Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. v. 1. GEO. Cuba. pp. 135 - 149.
- Gómez, C., Uribe, M., Ríos, D., Sánchez, M. (2006). Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. INCI, 31(10), 734-738.
- Gutiérrez, L. (1996). Estudios para la micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.F.): su establecimiento *in vitro*. Informe de Práctica.

Bachillerato, 42 p. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Departamento de Ingeniería Forestal, Cartago (Costa Rica).

Gupta, P., Nadgir, A., Mascarenhas, A., Jagannthan, V. (1980). Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Science letters*. 17: 259-268.

Hu, C. y Wang, J. (1983). Meristem, shoot tip and bud culture. En: *Handbook of Plant Cell*. Evans, D:A.; Ammirato, P.V.; Yaderma Y. (eds) pp 256-290

Jiménez, E. (1998). Generalidades del cultivo *in vitro*. *Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología*. v. 1. GEO. Cuba. pp. 13 – 24.

Kessel, A. (2008). Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies. *Cultivos Tropicales*, 29(3): 27-37

Klopfenstein, N., Chun, Y., Kim, M., Ahuja, M., eds. Dillon, M., Carman, R., Eskew, L., tech. eds. (1997). *Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of Populus*. Gen. Tech. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station. 326 p.

- Kitto, S. (1997). Commercial micropropagation. *HortScience*, 32(6), 1012-1014.
- Leyva, H. (2012). Evaluación del efecto del tipo de sustrato y nutrición en la aclimatación de vitroplantas de tres variedades de papa (*Solanum tuberosum L., ssp tuberosum*). Tesis para optar al grado de Master. 90 p.
- Marcucci, S., Gallo, L., Zelener, N., Torales, S. y Sharry, S. (2010). *Bioteconología y mejoramiento vegetal II*. Aplicación de la biotecnología en la mejora y conservación de especies forestales.
- Martínez, R. (2001). *Embriogénesis somática a partir de callos de Nim (Azadirachta indica)*. Ciencias Forestales y del Ambiente, 144.
- Montes, S., Lalama, J., Echeverría, J. y Salazar, S. (2016). Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero. *Dominio de las ciencias*, 2: 63-89
- Monteuuis, O. (1994). Recent advances in mass clonal propagation of teak, Proceedings International Workshop BIO-REFOR, Kangar, Malaysia. pp 117-121.

- Monteuuis, O. 1995. Recent advances in mass clonal propagation of teak, Proceedings of the International Workshop BIO-REFOR, Kangar, Malaysia. pp 1-3.
- Monteuuis, O., Bon, M., y Goh, D. (1998). Teak propagation by *in vitro* culture bois et forets des tropiques, 256(2), 1–11.
- Morán, E. (1996). *Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos*. En E. Morán Luques, *Apuntes Teóricos*. Departamento de Biología de la Universidad de Oriente.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nadgauda R. (1997). Application of tissue culture in clonal forestry programme. Abstracts of International Tree Biotechnology Meeting. India. pp. 4-8.
- OECD (2006). “OECD Biotechnology Statistics - 2006”, OECD.
- Olmos, S., Luciani, G. y Galdeano, E. (2010). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. In *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. INDA Eds. 351-376
- Orellana, P. (1998). *Introducción a la micropropagación masiva*. Santa Clara, CU. Instituto de biotecnología de las plantas. 123 p.

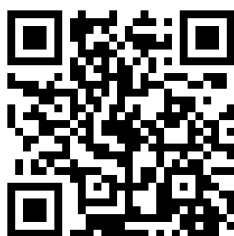
- Ramos L. (2000). Algunos avances en la morfogénesis de la teca (*Tectona grandis* L.). Tesis para optar por el grado de máster en ciencias. Universidad de Ciego de Avila, Cuba. 55 pp.
- Roca W. y Mroginski L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia. p. 149.
- Roca, W. y Mroginski, L. (1993). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali, CO. CIAT. p 1039.
- Rocano, M., Villena, P., y Peña, D. (2017). Evaluación de los sistemas de cultivo semisólido y BIT en la multiplicación *in vitro* de *Juglans neotrópica*. *Maskana*, 8(1), 103–109.
- Pérez-Cordero, L. 2001. Hacia el manejo intensivo de la teca (*Tectona grandis* L.) en Centroamérica. M. Ambiente S.A., 12 p. Costa Rica.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo “in vitro” de las plantas superiores*. Trad. Ayerbe, L. 3era Edición. Ediciones Mundi-prensa. Madrid. España 325 p.
- Santos, J., Suarez, I., y Gatti, K. (2013). Micropropagación de *Tectona grandis* L. F. a partir de meristemas preexistentes. *Temas Agrarios*.
- Saucedo, S., Varas, E., Carmigniani, F., y Ramos, L. (2008). Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedades champaka y hawaiana. *Ciencia y Tecnología*, 1(1), 49–54.

- Saucedo, S., Ramos, L., y Reyes, T. (2008b). Efecto de los Reguladores de Crecimiento para la Propagación *in vitro* de la Malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). *Ciencia y Tecnologia*, 1, 17–21.
- Sierra, R. (1994). Land uses strategies of hausenhold based in the enterprises, the timber industry, natural deforestation In North-West Ecuador: the articulation of market forces National polices and local condiction. Tesis of Doctor Ohio State University. Ohio.
- United Nations. (1992). Convention on biological diversity Retrieved from <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>
- Useros, J. (2013). El cambio climático: Sus causas y efectos medioambientales climate. *Anales de Medicina*, 50, 71–98.
- Villalobos, V. y Thorpe, T. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In *Cultivo de tejidos en la agricultura* (pp. 127–141). México.
- Vásquez, M. y Ulloa, R. (1996). Estrategia para la conservación de la biodiversidad biológica en el sector forestal del Ecuador. Proyecto FAO – Holanda “Apoyo a la ejecución del Plan de Acción Forestal del Ecuador (PAFE)” / Ecociencia, 146 p. Quito.

Yasodha, R., Sumathi, R., y Gurumurthi, K. (2004). Micropropagation for quality propagule production in plantation forestry. *Indian Journal of Biotechnology*, 3(2), 159–170.

Descubre tu próxima lectura

Si quieres formar parte de nuestra comunidad,
regístrate en <https://www.grupocompas.org/suscribirse>
y recibirás recomendaciones y capacitación



   @grupocompas.ec
compasacademico@icloud.com

compAs
Grupo de capacitación e investigación pedagógica

   @grupocompas.ec
compasacademico@icloud.com

