



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

**Trabajo de titulación presentado como requisito previo a la obtención del título
de Ingeniero Forestal**

**“APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO “*in vitro*” EN LA
MICROPROPAGACIÓN VEGETATIVA DE *Humiriastrum procerum* (LITTLE) CUATR.
(CHANUL)”**

AUTOR

Diego Fernando Panamá

DIRECTOR

Ing. Walter Armando Palacios Cuenca

IBARRA - ECUADOR

2017

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL**

“APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO “*in vitro*” EN LA MICROPROPAGACIÓN
VEGETATIVA DE *Humiriastrum procerum* (LITTLE) CUATR. (CHANUL)”

Trabajo de titulación revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza la presentación como
requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO FORESTAL

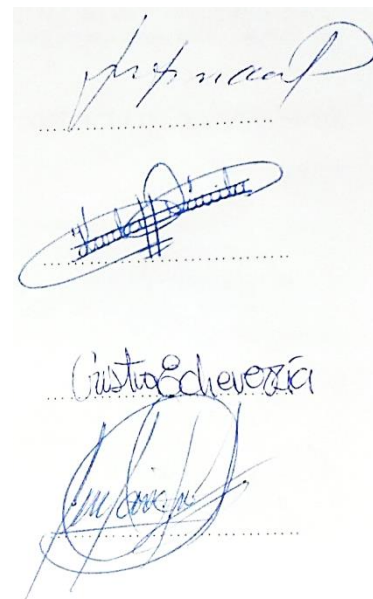
APROBADO

Ing. Walter Armando Palacios Cuenca.
Director de trabajo de titulación

Ing. Karla Fernanda Dávila Pantoja, Mgs.
Tribunal de trabajo de titulación

Dra. María Cristina Echeverría De Labastida.
Tribunal de trabajo de titulación

Ing. Eduardo Jaime Chagna Avila, Mgs.
Tribunal de trabajo de titulación



Ibarra - Ecuador

2017



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO	
Cédula de identidad:	100357215-1
Apellidos y nombres:	Panamá Diego Fernando
Dirección:	Condominio Los Arupos etapa II
Email:	fgdiego@live.com
Teléfono fijo:	2914518 Teléfono móvil: 0981766705/0980524809

DATOS DE LA OBRA	
Título:	“APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO “ <i>in vitro</i> ” EN LA MICROPROPAGACIÓN VEGETATIVA DE <i>Humiriastrum procerum</i> (LITTLE) CUATR. (CHANUL)”
Autor:	Diego Fernando Panamá
Fecha:	01 de junio del 2017
SOLO PARA TRABAJOS DE TITULACIÓN	
Programa:	Pregrado
Título por el que opta:	Ingeniero Forestal
Director:	Ing. Walter Armando Palacios Cuenca

2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

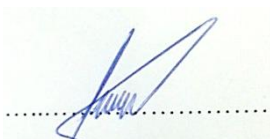
Yo, **Diego Fernando Panamá**, con cédula de ciudadanía Nro. **100357215-1**; en calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de titulación descrito anteriormente, hago la entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior, Artículo 144.

3. CONSTANCIA

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló sin violar derechos de autor de terceros; por lo tanto la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asumen la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrán en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, 01 de junio del 2017

EL AUTOR:



Diego Fernando Panamá

C.C.: 100357215-1

ACEPTACIÓN:



Ing. Betty Mireya Chávez Martínez

JEFA DE BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

CESIÓN DE DERECHOS DEL AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

Yo, **Diego Fernando Panamá**, con cédula de ciudadanía Nro. **10035715-1**; manifiesto la voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autor de la obra o trabajo de titulación denominado **“APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO “*in vitro*” EN LA MICROPROPAGACIÓN VEGETATIVA DE *Humiriastrum procerum* (LITTLE) CUATR. (CHANUL)**”, que ha sido desarrollada para optar por el título de Ingeniero Forestal en la Universidad Técnica del Norte, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

Diego Fernando Panamá

C.C.: 10035715-1

Ibarra, 01 de junio del 2017

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

Guía: FICAYA - UTN

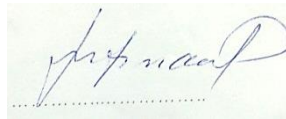
Fecha: 01 de junio del 2017

Diego Fernando Panamá: “APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO “*in vitro*” EN LA MICROPROPAGACIÓN VEGETATIVA DE *Humiriastrum procerum* (LITTLE) CUATR. (CHANUL)”/Trabajo de titulación. Ingeniero Forestal. Universidad Técnica del Norte. Carrera de Ingeniería Forestal. Ibarra, 01 de junio del 2017. 93 páginas.

DIRECTOR: Ing. Walter Armando Palacios Cuenca.

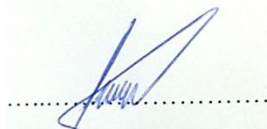
El objetivo general de la presente investigación fue: Establecer metodologías para la micropropagación de *Humiriastrum procerum* mediante el empleo de explantes. Entre los objetivos específicos se encuentra: Determinar la mejor fuente de explante, formas de colecta y traslado, definir métodos de desinfección adecuados e identificar qué medio de cultivo (pre-germinativo) brinda los mejores resultados, obtención de vitroplantas.

Fecha: 01 de junio del 2017



Ing. Walter Armando Palacios Cuenca

Director de Trabajo de Titulación



Diego Fernando Panamá

Autor

DEDICATORIA

La mejor creación de Dios es la mujer, la creación más grande y perfecta que pudo hacer; si es para ella esta dedicatoria, para esa mujer que supo construir en mi los cimientos más fuertes que pueden existir para elaborar de mi vida profesional, sentó en mi las mejores bases de valores y sueños de superación, ella es mi mayor inspiración ya que sus virtudes y su inmenso corazón me lleva a admirarle cada día más.

Gracias Dios por darme la mejor de las madres.

AGRADECIMIENTO

Los datos no son información, la información no es conocimiento, el conocimiento no es sabiduría, y sí agradezco a todos esos maestros que tuvieron paciencia y supieron compartir sus mejores conocimientos mediante las mejores estrategias de enseñanza con migo y así no ver los datos como una simple información y a la información como un conocimiento y el conocimiento no solo en sabiduría y además supieron guiarme y brindarme su ayuda, para así poder hacer posible esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Págs.
HOJA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ ASESOR.....	ii
AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UTN	iii
CESIÓN DE DERECHOS DEL AUTOR A FAVOR DE LA UTN.....	v
REGISTRO BIBLIOGRÁFICO	vi
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTO	viii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
 CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	2
1.1.1. General.....	2

	Págs.
1.1.2. Específicos	2
1.2. Hipótesis	2
 CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO	
	3
2.1. Fundamentación legal	3
2.1.1. Ley forestal	3
2.1.2. Plan Nacional para el Buen Vivir (2013 - 2017)	3
2.1.3. Línea de investigación	4
2.2. Fundamentación teórica	4
2.2.1. Generalidades de <i>Humiriastrum procerum</i>	4
2.3. Biotecnología en la actividad forestal	8
2.4. Cultivo “ <i>in vitro</i> ” y sus aplicaciones.....	9
2.5. Principales aplicaciones del cultivo “ <i>in vitro</i> ”	10
2.6. Micropropagación	11
2.6.1. Morfogénesis.....	12
2.6.2. Organogénesis.....	12
2.6.3. Embriogénesis somática.....	13
2.6.4. Factores que influyen en la micropropagación	15

	Págs.
2.7. Etapas del cultivo “ <i>in vitro</i> ”	15
2.7.1. Etapa 0: selección y preparación del material vegetal	16
2.7.1.1. Yemas	16
2.7.1.2. Meristemas.....	16
2.7.1.3. Hojas	16
2.7.2. Etapa I: establecimiento del cultivo.....	17
2.7.3. Etapa II: multiplicación y elongación de brotes	18
2.7.4. Etapa III: enraizamiento.....	18
2.7.5. Etapa IV: aclimatación del material obtenido “ <i>in vitro</i> ”.....	19
2.8. Medios de cultivo.....	22
2.9. Componentes del medio cultivo.....	23
2.9.1. Macro y micro elementos.....	23
2.9.2. Reguladores de crecimiento.....	23
2.9.3. Vitaminas	25
2.9.4. Agentes gelificantes	25
2.9.5. Otros compuestos.....	27
2.10. Ventajas y desventajas del cultivo “ <i>in vitro</i> ”	28
2.11. Principales problemas en el cultivo “ <i>in vitro</i> ”	28

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA	30
3.1. Ubicación del estudio.....	30
3.1.1. Político	30
3.1.2. Geográfico.....	30
3.1.3. Límites	30
3.2. Datos climáticos.....	31
3.3. Datos ecológicos	31
3.4. Materiales, equipos y reactivos.....	31
3.4.1. Materiales.....	31
3.4.2. Equipos	32
3.4.3. Reactivos.....	32
3.5. Fases de la investigación.....	33
3.5.1. Fase de campo (selección del material vegetativo).....	33
3.5.2. Fase de laboratorio	35
3.5.2.1. Preparación de los medios de cultivo.....	35
3.5.2.2. Esterilización.....	36
3.5.2.3. Tratamientos para la siembra	36
3.5.2.4. Siembra del material vegetativo.....	38

	Págs.
3.5.2.4.1. Siembra de yemas	38
3.5.2.4.2. Siembra de meristemas	39
3.5.2.4.3. Siembra de hojas	39
3.5.2.5. Área de incubación	39
3.6. Diseño experimental	40
3.6.1. Análisis de varianza	41

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. Forma de traslado del material vegetativo	42
4.2. Contaminación de los explantes.....	42
4.3. Métodos de desinfección.....	43
4.3.1. Desinfección en el laboratorio de las yemas y meristemas.....	43
4.3.2. Desinfección en el laboratorio de las hojas.....	44
4.4. Medios de cultivos	45
4.5. Obtención de vitroplantas	45

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
---	----

	Págs.
5.1. Conclusiones	47
5.2. Recomendaciones	47
 CAPÍTULO VI	
REGISTRO BIBLIOGRAFÍA	49
 CAPÍTULO VII	
ANEXOS	61
Anexo 1. Reconocimiento del lugar de recolección del material vegetativo	61
Anexo 2. Preparación del material vegetativo para el traslado	62
Anexo 3. Desinfección del material vegetativo en el laboratorio.....	63
Anexo 4. Aplicación de agentes de desinfección en el material vegetativo	64
Anexo 5. Preparación de los medios de cultivo.....	65
Anexo 6. Cultivo de yemas.....	66
Anexo 7. Cultivo de meristemas.....	67
Anexo 8. Cultivo de hojas	68
Anexo 9. Evaluación del material vegetativo cultivado	69

ÍNDICE DE TABLAS

	Págs.
Tabla 1. Precios de madera de <i>Humiriastrum procerum</i> en Ecuador.	8
Tabla 2. Métodos de transporte del material vegetativo de yemas, meristemas y hojas.	34
Tabla 3. Medios de cultivo.....	35
Tabla 4. Cuadro de tratamientos de yemas.	36
Tabla 5. Cuadro de tratamientos para los meristemas.	37
Tabla 6. Cuadro de tratamiento para las hojas.	38
Tabla 7. Análisis del diseño.	41
Tabla 8. Tiempos de evaluación de los tratamientos.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1. Árbol de <i>Humiriastrum procerum</i>	5
Figura 2. Hojas e inflorescencia de <i>Humiriastrum procerum</i>	5
Figura 3. Semillas de <i>Humiriastrum procerum</i>	5
Figura 4. Madera de <i>Humiriastrum procerum</i>	5
Figura 5. Tiempo de conservación del material vegetativo.	42
Figura 6. Representación de la contaminación de lo explantes	43
Figura 7. Inicio de contaminación según los tratamientos.....	44
Figura 8. Comportamiento de los medios de cultivo	45
Figura 9. Reconocimiento del lugar de recolección del material vegetativo.....	61
Figura 10. Ubicación de dónde se recolectó el material vegetativo.	61
Figura 11. Localización de dónde se recolectó el material vegetativo.	61
Figura 12. Material vegetativo de hojas.....	61
Figura 13. Aplicación de cisteína.	62
Figura 14. Elaboración de paquetes de material de hojas.....	62
Figura 15. Elaboración de los paquetes que contenían las yemas–meristemas.	62
Figura 16. Lavado del material vegetativo.	62
Figura 17. Lavado de hojas.....	63
Figura 18. Lavado de yemas.	63

	Págs.
Figura 19. Lavado del material vegetativo.	63
Figura 20. Desinfección de yemas.	63
Figura 21. Desinfección de yemas.	64
Figura 22. Desinfección de yemas en NaOCl.	64
Figura 23. Desinfección de yemas en Kasumin.	64
Figura 24. Desinfección de yemas en Benomilo.	64
Figura 25. Desinfección de meristemas más al vacío.	65
Figura 26. Desinfección de hojas.	65
Figura 27. Soluciones madres para la elaboración de medios de cultivo.	65
Figura 28. Medios de cultivo.	66
Figura 29. Siembra de yemas.	66
Figura 30. Siembra de yemas.	66
Figura 31. Siembra de yemas.	66
Figura 32. Siembra de meristemas.	67
Figura 33. Siembra de meristemas.	67
Figura 34. Extracción de meristemas laterales.	67
Figura 35. Siembra de hojas.	67
Figura 36. Siembra de hojas.	68
Figura 37. Explantes de siembra de hojas.	68

	Págs.
Figura 38. Explantes de hojas en incubación.....	68
Figura 39. Material de yemas en incubación.	68
Figura 40. Incubación a la oscuridad.	69
Figura 41. Material de yema necrosada.	69
Figura 42. Material de meristema contaminado.	69
Figura 43. Material de hoja necrosada.....	69

TÍTULO: “APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO “*in vitro*” EN LA MICROPROPAGACIÓN VEGETATIVA DE *Humiriastrum procerum* (LITTLE) CUATR. (CHANUL)”.

Autor: Diego Fernando Panamá

Director de trabajo de titulación: Ing. Walter Armando Palacios Cuenca

Año: 2017

RESUMEN

El estudio se realizó en dos fases, la fase de campo consistió en la recolección del material vegetativo de *Humiriastrum procerum* en la provincia de Esmeraldas, cantón Eloy Alfaro, parroquia Timbiré, sector la Concepción, lote asociación 30 de mayo, y la fase de micropropagación se realizó en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Técnica del Norte. Para la micropropagación el empleo diferentes explantes, para determinar la mejor fuente de explante, formas de colecta y traslado, métodos de desinfección y medio de cultivo (pre-germinativo). Mediante la aplicación de técnicas de cultivo “*in vitro*” en la micropropagación vegetativa se intentó solucionar el problema de reproducción de esta especie. El material vegetativo fue trasladado utilizando cuatro métodos. Para el cultivo de las yemas se realizó 10 ensayos, 6 para los meristemas y 4 para las hojas. La mejor fuente de explante fueron las hojas de rebrote, la mejor forma de traslado del material vegetativo se obtuvo con papel periódico y humedecido con cisteína (25mg/l^{-1}) y colocados en un *cooler* que permitió la conservación del material por hasta 120 horas (5 días). La mejor desinfección en las yemas se logró con la aplicación de hipoclorito de sodio al 20% durante 20 minutos y bicloruro de mercurio (25mg/l^{-1}) al vacío por 40 minutos (TD9), que permitió conservar los explantes libres de contaminación por 192 horas (8 días). La mejor desinfección en los meristemas se logró con hipoclorito de sodio al 20% durante 20 minutos y bicloruro de mercurio (25mg/l^{-1}) al vacío por 40 minutos (T12), que conservó a los explantes libres de contaminación durante 48 horas (2 días). El mejor tratamiento para la desinfección de las hojas se consiguió con 2g/l^{-1} de Benomilo durante 20 minutos e hipoclorito de sodio al 20% a 20 minutos (TDH3). Este método conservó a los explantes libres de contaminación durante 432 horas (18 días). Al final del estudio no se obtuvo vitroplantas ya

que todos los ensayos sufrieron de contaminación endógena y microbiana y el material vegetativo se necrosó.

Palabras clave: biotecnología, micropropagación, cultivo “*in vitro*”, desinfección, explantes, medios de cultivo, *Humiriastrum procerum*.

TITLE: "IMPLEMENTATION OF CULTIVATION TECHNIQUES "in vitro" IN THE VEGETATIVE MICROPROPAGATION OF *Humiriastrum procerum* (LITTLE) CUATR. (CHANUL)"

Author: Diego Fernando Panamá

Director of titulation work: Ing. Walter Armando Palacios Cuenca

Year: 2017

ABSTRACT

The study was carried out in two phases, the field phase consisted of the collection of the vegetative material of *Humiriastrum procerum* in the province of Esmeraldas, Eloy Alfaro, Timbiré parish, La Concepción sector, association group May 30 and the micropropagation phase Carried out in the biotechnology laboratory of the Universidad Tecnica del Norte. For micropropagation the use of different explants, to determine the best source of explant, forms of collection and transfer, methods of disinfection and culture medium (pre-germinative). Through the application of in vitro culture techniques in vegetative micropropagation an attempt was made to solve the reproductive problem of this species. The vegetative material was transferred using four methods. For the cultivation of the buds, 10 trials were carried out, 6 for meristems and 4 for leaves. The best source of explant were the leaves of regrowth, the best way of transporting the vegetative material was obtained with newspaper and moistened with cysteine (25 mg/ l⁻¹) and placed in a cooler that allowed the material to be stored for up to 120 hours (5 days). The best disinfection in the yolks was achieved with the application of 20% sodium hypochlorite for 20 minutes and mercury bichloride (25 mg/l⁻¹) under vacuum for 40 minutes (TD9), which allowed preserving explants free from contamination by 192 hours (8 days). The best disinfection in meristems was achieved with 20% sodium hypochlorite for 20 minutes and mercury bichloride (25 mg / l⁻¹) under vacuum for 40 minutes (T12), which kept the explants free of contamination for 48 hours (2 days). The best treatment for leaf disinfection was achieved with 2 g/l⁻¹ Benomyl for 20 minutes and 20% sodium hypochlorite 20 minutes (TDH3). This method kept the explants free of contamination for 432 hours (18 days). At the end of the study no vitroplants were obtained as all the trials suffered from endogenous and microbial contamination and the vegetative material became necrotic.

Keywords: biotechnology, micropropagation, “*in vitro*” culture, disinfection, explants, culture media, *Humiriastrum procerum*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los bosques húmedos tropicales son zonas con la mayor biodiversidad del mundo, en ellos se puede encontrar diversas especies forestales de un alto valor comercial por su madera de apreciada calidad, dureza, resistencia y densidad. Debido a estas características, son altamente comercializadas en los mercados locales y nacionales. En la actualidad varias de estas especies se encuentran amenazadas por la tala indiscriminada y el aprovechamiento ilegal y en la mayoría de los casos sin ningún manejo, siendo éste uno de los principales problemas de algunas especies que han llegado al punto de desaparecer, este es el caso de *Humiriastrum procerum* que se encuentra en la provincia de Esmeraldas y en toda la distribución geográfica de esta especie (Benavides, 2010).

Humiriastrum procerum es una especie de gran acervo cultural entre las comunidades asentadas en esta región, tiene importancia económica debido a la calidad media y alta de su madera que se emplea en la elaboración de elementos para la navegación y en la construcción, lo que conllevó a la explotación a tal punto de hoy es considerada en estado crítico de extinción; al tener una sobre explotación consecuentemente se ha determinado como una especie en peligro de extinción. No se cuenta con una forma de propagación siguiendo las vías tradicionales, por lo que ha sido imposible su reproducción (Benítez, 2004; UICN, 2006).

Por ello, es de vital importancia probar diferentes tratamientos para obtener un método de cultivo “*in vitro*” de la misma; ya que pretende brindar la posible solución de propagación de *Humiriastrum procerum* y garantizar la existencia de la misma en el tiempo y espacio mediante la micropropagación vegetativa, ya que la Biotecnología Vegetal ha demostrado ser una herramienta poderosa en la propagación de genotipos de diferentes especies y variedades de alto valor económico, además es una alternativa muy importante para regenerar y multiplicar las especies forestal que de otra manera sería difícil y lento el proceso de regeneración.

El presente estudio se realizó para generar información sobre métodos de recolección de material vegetativo, desinfección y medios de cultivo, en la micropropagación de *Humiriastrum procerum* de la provincia de Esmeraldas y es de vital importancia que se continúe con la

investigación aplicando los mejores resultados que brindará esta investigación para poder lograr su propagación.

1.1. Objetivos

1.1.1. General

Establecer metodologías para la micropropagación de *Humiriastrum procerum* mediante el empleo de explantes.

1.1.2. Específicos

- Determinar la mejor fuente de explante, formas de colecta y traslado.
- Definir métodos de desinfección adecuados.
- Identificar qué medio de cultivo (pre-germinativo) brinda los mejores resultados.
- Obtener vitroplantas.

1.2. Hipótesis

Ho: Es posible obtener resultados similares mediante la aplicación de cultivo “*in vitro*” con el empleo de diferente material vegetativo, además de medios de cultivos.

Hi: Es posible obtener resultados que difieran mediante la aplicación de cultivo “*in vitro*” con el empleo de diferente material vegetativo, además de medios de cultivos.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Fundamentación legal

2.1.1. Ley forestal

En la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y de Vida Silvestre en el art. 5 literal d) cita los objetivos y funciones para elaboración y ejecución de los planes, programas y proyectos de reforestación, investigación, explotación, manejo y protección de los bosques naturales y plantados, áreas naturales y de vida silvestre (MAE, 2004).

2.1.2. Plan Nacional para el Buen Vivir (2013 - 2017)

El presente estudio se enmarca en los objetivos, políticas y lineamientos estratégicos siguientes:

- a) **Objetivo 7 del PNBV:** Garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental, territorial y global.

Política y lineamiento estratégico 7.2 del PNBV: Conocer, valorar, conservar y manejar sustentablemente el patrimonio natural y su biodiversidad terrestre, acuática continental, marina y costera, con el acceso justo y equitativo a sus beneficios, **literal e:** Promover la conservación y el uso regulado de los recursos genéticos para fines de investigación y desarrollo del bioconocimiento, considerando los conocimientos tradicionales y saberes ancestrales asociados, y garantizando su acceso, **literal f:** Fortalecer la aplicación de la normativa para la conservación, recuperación y protección de los recursos genéticos de la agrobiodiversidad y especies silvestres emparentadas, a fin de reducir la erosión genética y garantizar la soberanía alimentaria.

- b) **Objetivo 11 del PNBV:** Asegurar la soberanía y de los sectores estratégicos para la transformación industrial y tecnológica.

Política y lineamiento estratégico 11.5 del PNBV: Impulsar la industria química, farmacéutica y alimentaria, a través del uso soberano, estratégico y sustentable de la biodiversidad, **literal j:** Fomentar la investigación en biotecnología en el país con el fortalecimiento de institutos de

investigación y universidades, (Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo [SENPLADES], 2013 págs.1-23).

2.1.3. Línea de investigación

El presente estudio se enmarca en la línea de investigación de la carrera: Producción y protección sustentable de los recursos forestales.

2.2. Fundamentación teórica

2.2.1. Generalidades de *Humiriastrum procerum*

El *Humiriastrum procerum*, se encuentra en Costa Rica, Panamá, Guyanas, Venezuela, Brasil y con mayor frecuencia en Perú y en los bosques de la provincia de Esmeraldas en Ecuador. En Colombia, se distribuye en los departamentos de Cauca, Chocó, Nariño, Valle del Cauca y en la cuenca de los ríos Calima y Patía (Chocó biogeográfico) en alturas inferiores a los 800 msnm (Rojas, 2007; Delgado, 2013).

2.2.1.1. Dendrología de *Humiriastrum procerum*

En la Figura 1, 4 se muestra la fisionomía del árbol y en la Figura 2,3, se muestra los caracteres botánicos de *Humiriastrum procerum*.



Figura 1. Árbol de *Humiriastrum procerum*.
Fuente: ITTO, s.f



Figura 2. Hojas e inflorescencia de *Humiriastrum procerum*.
Fuente: ITTO, s.f



Figura 3. Semillas de *Humiriastrum procerum*.
Fuente: ITTO, s.f



Figura 4. Madera de *Humiriastrum procerum*.
Fuente: ITTO, s.f

2.2.1.2. Taxonomía

- Familia: Humiriaceae.
- Género: *Humiriastrum*.
- Nombre Científico: *Humiriastrum procerum*.
- Sinónimos botánicos: *Humiria procera* Little, *Sacoglottis procera* (Little) Cuatrec.
- Nombre Comercial: Chanul.
- Nombres comunes:
 - Colombia: Aceituno, batea, chanó, chanú, chanul, diañemiu, muidotiai
 - Costa Rica: Corozo
 - Ecuador: Chanul
 - Panamá: Corozo
 - Perú: Hispi, quinilla colorada.

2.2.1.3. Descripción botánica

Little y Dixon (1969) mencionan las siguientes características para la especie.

Árbol: se trata de un género que alcanza alturas de 40 metros y un diámetro sobre las bambas entre 60 y 80 cm., aunque se reportan diámetros de hasta 1.20 m. Su tronco es recto, cilíndrico, con raíces tablares hasta de 2.0 m. de altura.

Corteza externa: es de color café rojizo, de textura delgada, algo escamosa o en placas con lenticelas; mientras la corteza interna es de color rojizo claro, de sabor amargo y textura fibro-vidriosa.

Hojas: simples, alternas, elípticas, de borde ondulado con estípulas y pequeños pecíolos, las ramitas son levemente gruesas, lampiñas y de color verde, tiene cuatro ángulos o alas formadas por la prolongación de los bordes y nervios principales de las hojas.

Flores: en estado de florecimiento exhibe pequeñas flores dispuestas en corimbos terminales, de color verde claro y que aparecen en el mes de marzo en los árboles que crecen en el Pacífico colombiano y en mayo, en los ubicados en la provincia de Esmeraldas (Ecuador). El diámetro en que *Humiriastrum procerum* empieza a florecer es a partir de 15 cm de diámetro a la altura del pecho (DAP) pero se observa que éstos no producen frutos (Terán, 2002).

Fruto: son tipo drupa, con formas ovoides, comestibles e indispensables para la propagación del árbol, pues este proceso se realiza únicamente por semillas. El desarrollo y máxima producción de frutos de *Humiriastrum procerum*, en Tumaco (Colombia) se da durante el mes de febrero, así lo indican los estudios adelantados por la Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal.

Usos actuales: traviesas para ferrocarril, pisos, construcciones pesadas a la intemperie, carrocerías, carretería, ebanistería e implementas para agricultura.

Usos potenciales: para tornería, estacones, puentes, construcciones navales, parket, molduras, vigas y soleras.

Ecología de la especie: *Humiriastrum procerum* es un árbol gregario, se encuentra a menudo en rodales casi puros y a veces asociado con las especies: Sande (*Brosimum* sp) y Cuánguare (*Virola* sp). Crece en colinas o en elevaciones bajas en bosques húmedos premontanos y bosques húmedos tropicales.

2.2.1.4. Formas de reproducción

Humiriastrum procerum solo se propaga por semillas, observado en regeneración natural bajo árboles maduros en Esmeraldas–Ecuador (López, Camacho y Montero, 2005).

Según Benavides (2010) en estudios realizados de ensayos pre germinativos con semilla de *Humiriastrum procerum* se aplicó diferentes tratamientos y ninguno dio un resultado positivo, es decir solo se depende de la regeneración natural, ya que no se tiene un método de germinación o reproducción de la misma (Organización Intergubernamental que promueve la conservación, Manejo sustentable, uso y comercio de los recursos del bosque Tropical [OIMT], s.f).

Sin embargo y a pesar del aprecio comercial que rodea al *Humiriastrum procerum* en el mundo, existe un desamparo latente en Colombia, entre los países latinoamericanos en donde se encuentra la especie el único que ha trabajado por mantener su “subsistencia” es Ecuador, además de promover normas para evitar la indebida comercialización de su madera, desarrolla un proyecto de manejo forestal sostenible, igual existen medidas de conservación como es identificar poblaciones naturales de la especie, particularmente en los parques nacionales

naturales Farallones de Cali y Sanquianga, ya que cerca de sus territorios han sido registradas poblaciones de esta especie, además de realizar estudios autoecológicos para proponer planes de manejo que sean desarrollados conjuntamente por las corporaciones autónomas regionales, la academia y los institutos de investigación, también incentivar el enriquecimiento con plántulas de la especie en áreas degradadas de su hábitat natural, *desarrollar programas de propagación en jardines botánicos* (López, Camacho y Montero, s.f).

2.2.1.5. Valor económico

La madera de *Humiriastrum procerum* está a un precio de US\$ 60 c/m³ y de US\$150 c/m³, ya deducidos todos los gastos operativos referentes a la elaboración y aprobación de planes de manejo, transporte y utilización de equipos de trabajo (Gutiérrez, s.f).

Tabla 1

Precios de madera de Humiriastrum procerum en Ecuador

Producto	Precio USD/m²
Parquet Mosaico de <i>Humiriastrum procerum</i>	\$15.00 / \$20.00 c/u
Tableta de <i>Humiriastrum procerum</i>	\$11.00 c/u
Duela de <i>Humiriastrum procerum</i>	\$7.00 c/u
Media Duela de <i>Humiriastrum procerum</i>	\$4.00 c/u
Vigas de <i>Humiriastrum procerum</i>	\$7.00 - \$8.00 c/u

Fuente: Gutiérrez, s.f

2.3. Biotecnología en la actividad forestal

La biotecnología se define como toda aplicación tecnológica que “utilice” sistemas biológicos y organismos vivos. 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, citado por Pazmiño, 2015).

La madera es vital para la economía mundial, pero la presión del desarrollo humano y el crecimiento de la demanda, están contribuyendo a la degradación de los ecosistemas forestales naturales, creando un dilema sobre el futuro de estos recursos. La modificación genética y otras

biotecnologías, pueden tener una función de importancia en las plantaciones forestales, (Marcucci, Gallo, Zelener, Torales y Sharry, 2010).

Los países desarrollados, la investigación y las aplicaciones de la biotecnología en el sector forestal avanzan rápidamente y en especial, las técnicas de manipulación genética. De hecho, el uso de la biotecnología forestal se concentra, en un 70%, en países desarrollados siendo los pioneros EEUU, Francia y Canadá. Cabe señalar que el estudio y el uso de esta tecnología ha sido utilizada en por lo menos 140 géneros, pero la gran mayoría se centra únicamente en seis: *Pinus*, *Eucalyptus*, *Picea*, *Populus*, *Quercus* y *Acacia* (Buitrago, 2008, citado por Jaramillo, 2013).

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, citado por Jiménez, 2015).

2.4. Cultivo “*in vitro*” y sus aplicaciones

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que consiste en emplear una porción de planta, denominada explante (segmentos nodales, yemas apicales, yemas axilares, hojas, tallo, semillas, meristemas, embriones, etc...) y brindarle todas las condiciones ambientales para que pueda expresar su potencial intrínseco o inducido (Roca y Mroginski, 1991, citado por Cedeño, 2015).

Esta técnica es conocida como propagación “*in vitro*” porque se lleva a cabo en frascos o recipientes transparentes; se desarrolla en condiciones estériles, empleando una cantidad balanceada de nutrientes y hormonas contenida en un medio de cultivo que buscan la regeneración de órganos, tejidos e incluso plantas enteras (Abdelnour y Escalant, 1994, citado por Méndez, 2014).

Esta técnica 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, citado por Jadán, Oña, Lorena, 2015).

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, citado por Oña, 2010).

Los orígenes de esta técnica se remontan a 1902, cuando Haberlandt intentó cultivar células aisladas de plantas y postuló el principio de la totipotencia celular; sin embargo, no fue sino hasta finales de los años 50 cuando todas las herramientas necesarias para desarrollar todo el potencial del cultivo “*in vitro*” estuvieron disponibles; desde entonces se han producido notables avances en la Biotecnología Vegetal, con la ayuda de esta técnica (Jiménez, 1998, citado por Cabrera, 2011).

Desde sus inicios hasta el día de hoy, el cultivo “*in vitro*” no está optimizado para cualquier especie vegetal; esto se debe a que no se conoce con exactitud el mecanismo que le permite al explante regenerar tejido nuevo. Sin embargo, cuando se trabaja sobre una especie nueva se toman modelos establecidos anteriormente y principios básicos y generales (Cubero, 2003, citado por Cedeño, 2015).

El cultivo “*in vitro*” de tejidos vegetales presenta una serie de ventajas frente a los métodos de propagación convencionales, entre éstas se pueden incluir las siguientes: obtención de miles de plantas a partir de una planta madre; reducción del tiempo necesario para la multiplicación de una planta; reducción de las áreas físicas empleadas para la multiplicación, así como la reducción de costos; estricto control sobre las condiciones de sanidad del material multiplicado; facilidades en el transporte de material vegetal, incluso de un país a otro, pues las restricciones aduaneras son mucho menores; y, la posibilidad de reproducir especies de las cuales existan pocos individuos (Roca y Mroginski 1991, citado por Oña, 2010).

2.5. Principales aplicaciones del cultivo “*in vitro*”

Rivero (2016) determina que el cultivo “*in vitro*” se puede emplear en:

- Mejoramiento genético.
- Conservación de germoplasma.
- Cultivo de embriones y ovarios.
- Producción de compuestos de interés comercial.

- Producción de metabolitos secundarios.
- Producción de proteínas.
- Producción de polímeros.
- Producción de polímeros biodegradables.
- Establecimiento de plantas transgénicas.
- Plantas resistentes a virus.
- Plantas con rutas metabólicas modificadas.
- Plantas mejoradas en cuanto a composición de proteínas, aceites, etc.
- Fitorremediación.
- Remoción de xenobióticos.
- Remoción de metales pesados.

2.6. Micropropagación

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban. Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de novo y embriogénesis somática. (Olmos, Luciani y Galdeano, 2010).

Las especies perennes son más difíciles para la micropropagación a diferencia de las especies anuales y bianuales. En la actualidad se han obtenido adelantos muy importantes en cuanto a las coníferas, por eso es fácil determinar que las fuentes de inóculo se emplean tejidos jóvenes, debido a que los tejidos maduros son poco viables a las condiciones “*in vitro*” (Villalobos, 1983).

Los principios básicos del cultivo “*in vitro*” de las especies forestales, son en cuanto más joven sea el tejido y se encuentre en desarrollo activo, los resultados a obtener serán mejores en el proceso de diferenciación de órganos. Las condiciones “*in vitro*” inducen a las células a condiciones meristemáticas (Villamar, 2014).

2.6.1. Morfogénesis

La morfogénesis se define como la formación o la génesis de órganos y comprende el crecimiento y la diferenciación celular. En células o tejidos cultivados “*in vitro*” el proceso morfogénético puede inducirse ya que, las células vegetales son capaces bajo determinados estímulos de desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo. Esta plasticidad celular se conoce como totipotencia celular. La respuesta morfogénética puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas: la organogénesis y la embriogénesis. En la organogénesis se produce la formación de tallos, raíces u otras estructuras y en la embriogénesis se forman embriones que al germinar dan lugar a una planta. En ambos casos, el proceso se genera a partir de células somáticas. Si la respuesta primaria al estímulo morfogénético es la formación de callo antes de diferenciarse meristemas o embriones se habla de organogénesis o embriogénesis indirecta. En algunas ocasiones se utiliza el término regeneración adventicia que hace referencia a la regeneración que se produce a partir de un lugar que no es el común en el desarrollo de una planta, por ejemplo la regeneración de una planta a partir de un segmento de hoja. Según lo expresado anteriormente, la regeneración adventicia podría incluir plantas regeneradas en un proceso organogénico o en un proceso embriogénico, sin embargo, en cultivo “*in vitro*” cuando se utiliza este término generalmente se hace referencia a meristemas adventicios obtenidos por la vía organogénica (Gisbert, 2010).

2.6.2. Organogénesis

Ponce (como se citó en Pozo, 2002) define que a través del proceso organogénico se puede diferenciar brotes y raíces adventicias, hasta desarrollarse una planta completa. La micropropagación se ve influenciada por el genotipo, la planta donadora del explante, el estado fisiológico del explante, además de las condiciones ambientales “*in vitro*” y los medios del cultivo. En la mayoría de las coníferas, el método de propagación “*in vitro*” más usado y que ha

dado mayor éxito ha sido mediante la producción de brotes adventicios y también de cotiledones de semillas en germinación.

Algunas de las especies en las que se reporta gran éxito en la propagación masiva con esta técnica son:

- *P. radiata* (Aitken, 1981).
- *P. taeda* (Mott; Amerson, 1981).
- *P. brutia* (Abdullah; Grace, 1987).
- *P. virginiana* (Chang, 1991).
- *P. eldarica* (Sen, 1993).

2.6.2.1. Aplicación de la organogénesis

Uno de los métodos más preferidos a gran escala es la organogénesis debido a sus resultados y el más utilizado en las especies de árboles. Debido a los avances biotecnológicos en la transferencia de genes, alguna de esta forma de micropropagación, será el adecuado para la propagación masiva de plantas transgénicas y conservación del germoplasma.

2.6.3. Embriogénesis somática

La micropropagación mediante embriogénesis somática involucra el desarrollo de embriones a partir de células embriogénicamente competentes *in vitro*. En contraste con la organogénesis, la embriogénesis somática es un proceso de una sola etapa, ya que implica la formación del embrión completo; esto es, el brote en un polo y la radícula en el otro, tal como ocurre en el embrión cigótico. Las células somáticas pueden ser inducidas *in vitro* hacia un proceso embriogénico por medio del cual se diferenciaran estructuras bipolares similares a los embriones cigótico. El interés práctico de este método de propagación es que haciendo uso de genotipos deseables, éstos se pueden multiplicar casi ilimitadamente, con relativa facilidad y en forma sincrónica (Tautorus, 1991).

En especies arbóreas, especialmente en coníferas, las investigaciones sobre embriogénesis somática son muy escasas, en comparación con las que se han realizado sobre las especies herbáceas. El proceso embriogénico implica el establecimiento de callos en división activa

obtenidos de un inóculo deseable. El callo o el cultivo en suspensión pueden ser estimulados a formar embriones al manipular la relación auxinas-citocininas (Tautorus, 1991).

Aunque este método para lograr la diferenciación no se puede aplicar a todas las especies con igual éxito, se ha encontrado que si la concentración de auxinas es alta en fases iniciales y se elimina la auxina en la etapa de proliferación, se induce la diferenciación de embriones somáticos. Dado el creciente interés en el estudio de estos procesos en especies forestales, se ha observado un incremento en la información sobre embriogénesis somática en dichas especies, principalmente en especies de coníferas (Von y Hakman, 1987)

El inóculo preferido para el proceso de iniciación en la mayoría de los casos es el embrión cigótico inmaduro o bien el gametofito conteniendo al embrión cigótico que es colocado en un medio de cultivo (Tautorus, 1991 y Newton, 1995).

2.6.3.1. Aplicaciones de la embriogénesis somática

Para propósitos de propagación clonal en especies de coníferas, especialmente en pinos, el proceso de embriogénesis somática está aún en etapa de desarrollo, debido a ciertos factores tales como la dificultad en la iniciación de embriones somáticos en algunos genotipos así como los problemas en la maduración y conversión (germinación) de los embriones. Probablemente después de resolver o afinar estos problemas el proceso de embriogénesis somática podrá ser usado en propagación clonal en especies forestales (Newton, 1995).

Una de las aplicaciones más prometedoras de la embriogénesis somática, en particular en la propagación clonal de especies forestales, es el gran potencial para la producción eficiente y económica de un gran número de individuos a partir de genotipos deseables; esto debido a que el cultivo de embriones somáticos puede llevarse a cabo en medios líquidos, lo cual implica el posible desarrollo en gran escala de bio-reactores en los que se pueden producir grandes cantidades de embriones somáticos en una forma sincrónica y automatizada, los que más tarde pueden ser encapsulados para producir semillas artificiales, constituyendo éstas un sistema eficiente de producción de propágulos (Ahuja, 1993).

2.6.4. Factores que influyen en la micropropagación

Los siguientes factores para la micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos (Villalobos y Thorpe, 1991; Morán, 1996, citado por Supliguicha y Vera, 2015).

a) Planta que dona el explante: para evitar diferencias de requerimientos hormonales y nutricionales en los tejidos cultivados se debe evitar tomar plantas madres de diferentes edades fisiológicas. De la misma manera cuando las plantas madres son demasiado jóvenes se dificulta el cultivo “*in vitro*”, además de lo mencionado anteriormente las plantas deben ser sanas y vigorosas.

b) 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. El tamaño no tiene mayor importancia en la micropropagación.

c) 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.

d) Medio de cultivo: el éxito del cultivo depende en gran medida de la selección del medio del cultivo por lo que su composición química y forma física.

2.7. 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, fotoperíodo e irradiancia adecuadas, Etapa IV: transferencia de la planta al medio de vida natural definitivo (Orellana, 1998, citado por Urcuango, 2014).

2.7.1. 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, citado por Cedeño, 2015).

2.7.1.1. Yemas

En el caso del alargamiento de las yemas axilares, este método utiliza ápices principales, brotes laterales y segmentos nodales, e involucra la multiplicación de brotes preformados, generalmente sin la formación de algún callo, produciendo en general, cultivos genéticamente estables. Este método genera el menor número de plantas, ya que el número de brotes producido es limitado por el número de brotes axilares sembrados en el medio de cultivo (Muñoz, 2003, citado por Remache, 2011).

2.7.1.2. Meristemas

Esta técnica es muy importante para la reproducción masiva de clones y de material vegetal genéticamente estable y para la reproducción de plantas libres de virus. También se utiliza la quimioterapia aplicando sustancias específicas para alterar el mecanismo de síntesis de los virus. La técnica se complementa y da mejores resultados si se aplica en plantas que van ser cultivadas en viveros donde hay un mejor control de las condiciones ambientales, lo que disminuye el riesgo de recontaminación (Gutiérrez, 2003, citado por Remache, 2011).

2.7.1.3. Hojas

Se ha practicado el cultivo “*in vitro*” de órganos muy inmaduros, como son las secciones de hojas, estos experimentos se han realizado en helechos y angiospermas. El objetivo de estos cultivos ha sido el conocer hasta donde se llega en el desarrollo normal de dicho órgano en condiciones “*in vitro*” y que propiedades del medio contribuyen a su desarrollo. Con este cultivo

se ha logrado cierto éxito. Sin embargo aún se tienen grandes incógnitas o interrogantes sobre los nutrientes y los estímulos hacia el órgano in situ y lo que puede ser dado y asimilado en el cultivo “*in vitro*” (Hurtado, 1983, citado por Remache, 2011).

2.7.2. Etapa I: establecimiento del cultivo

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

a) Explante: el manejo de la planta madre, las condiciones físicas y fisiológicas en las que ella se encuentre y la posición de donde se tome el explante, determinan la respuesta morfogénica de éste en condiciones “*in vitro*”, (Radice, 2004, citado por Domínguez, 2011). Otro aspecto importante es el tamaño, es decir, la cantidad de tejidos que acompañan al meristemo y que juegan un papel nutritivo y de protección a los tejidos meristemáticos, pero mientras mayor tamaño mayor posibilidad de introducir hongos y bacterias al medio (Fuentes, Rojas y Pérez, 2011).

b) Esterilización: la esterilización es el proceso mediante el cual el material, sitio o superficie se libera completamente de cualquier microorganismo vivo o espora, dependiendo el estado de la planta y su procedencia; aplicando métodos preventivos o curativos según sea el caso, con técnicas adecuadas para la eliminación de patógenos como la termoterapia, la quimioterapia a través de la aplicación de antibióticos, desinfectantes, antivirales y el cultivo de meristemas (Marín, 1997; Roca y Mroginski, 1993, citado por Jaramillo, 2013).

La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70% por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0.5 a 1.5 % de cloro activo) con unas gotas de tensoactivo Tween 20 para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente, los explantes deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril (Nieto y Valdivieso, 2013).

Algunos patógenos superficiales y endógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo, en esta etapa también pueden observarse infecciones por bacterias y hongos asociados a Trips que sobreviven a los tratamientos de esterilización

resultado de una esterilización inefectiva de los explantes. Estos patógenos latentes podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo (Marín, Hernández, Andrade y Triagos, 2014).

2.7.3. 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, 1987, citado por Patiño, 2011).

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).

2.7.4. 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, citado por Loya, 2014). El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones “*in vitro*” como *ex vitro*.

a) Enraizamiento “*in vitro*”

Jaramillo y Ramírez (2013) mencionan que los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación requieren generalmente ser transferidos a un medio de cultivo con menor concentración de sales y libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas. Así mismo, se requiere cambiar el balance hormonal; esto es, disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas exógenas.

En algunas especies, la eliminación de las citoquininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Villalobos, 1983, citado por Jácome, 2013).

Otros factores como la alta temperatura, la baja intensidad de luz y el uso de carbón activado ayudan a estimular el enraizamiento (Nieto y Valdivieso, 2013).

b) Enraizamiento “*ex vitro*”

Una vez removidos los explantes del recipiente “*in vitro*” deben transferir a un sustrato limpio, no necesariamente estéril, que puede ser una mezcla de turba con perlita o vermiculita. La remoción total y cuidadosa del agar es importante sobre todo para eliminar cualquier residuo de sacarosa y otros compuestos orgánicos de las raíces para de esta forma evitar infecciones o daños que pueden ser causados por la presencia de metabolitos tóxicos secretados por los microorganismos, además es necesario que los brotes tengan hojas bien desarrolladas ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para continuar desarrollarse (Patiño, 2011).

Sin embargo, el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas, durante las etapas iniciales del trasplante, puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, los explantes deben plantarse en cámaras plásticas, para mantener la humedad relativa elevada y además es conveniente disponer de invernadero o cámaras de crecimiento, las mismas que brinden las condiciones adecuadas (temperatura y humedad relativa) que permitan alcanzar la rusticación de las plantas en forma progresiva (Olmos *et al.*, 2010).

2.7.5. 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, Lalama, Echeverría y Salazar, 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, fotoperíodo 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).

Las plántulas para aclimatación, debe presentar dos o más hojas y raíces, posteriormente se transfiriere a macetas de plástico de 6.7 cm de altura y 6.0 cm de ancho, utilizando como sustrato fibra de palma soyate (*Braheadulcis* (H.B.K.)). Las macetas se colocan en charolas con domo transparente y se exponen a un ambiente controlado (temperatura de 25 + 2°C, fotoperíodo de 16/8 horas de oscuridad y 46 Lmolm²s⁻¹ de intensidad luminosa [Quantum Meter ApogeeMod. QMSW-SS]). Cada 15 días el domo se abre de manera paulatina hasta que las plántulas quedan completamente expuestas, lo cual ocurre a los 45 días. Permanece bajo las mismas condiciones hasta completar 90 días de cultivo (Nava, Jiménez, Sánchez, Arenas, Ventura y Evangelista, 2011).

La aclimatación de las plantas se logra a los 60 días de exposición a un ambiente controlado en ejemplares de tamaño grande, que presentan pseudobulbo, y de dos a cuatro hojas y raíces desarrolladas. Las condiciones ambientales predominantes durante la adaptación a las condiciones “*ex vitro*”, inducen a la duplicación de la densidad estomatal (Nava *et al.*, 2011).

2.7.5.1. Factores que intervienen en la fase de aclimatación de vitroplantas

a) Calidad de la vitroplantas

Durante la fase de desarrollo de las vitroplantas, existen factores que pueden impedir un adecuado crecimiento y desarrollo de las mismas. El medio de cultivo y su composición juegan un papel importante, ello se logra con protocolos que se establecen en los diversos laboratorios relacionados con el tema; donde se precisan las cantidades adecuadas de reguladores de crecimiento a emplear, los momentos para la realización de los subcultivos, la intensidad de la luz, por solo citar algunos elementos a considerar (Montes *et al.*, 2016).

b) Tipo de sustrato

En el cultivo se han utilizado sustratos que sirve principalmente de soporte a las plantas, el sustrato debe suministrar a las raíces el agua necesaria para el desarrollo de la planta, y el aire suficiente para la respiración de las raíces, así como para la toma de nutrientes, de ahí la importancia para mantener un equilibrio entre la cantidad de agua y aire disponibles. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es indispensable para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, se debe elegir un sustrato suelto, poroso, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces, los sustratos se pueden utilizar solos o combinados. Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a las especies en la que se está trabajando (Morales, 2013).

c) Áreas y espacios para la aclimatación

Plantas en invernadero (área de aclimatación) Los invernaderos para la aclimatación de plantas *in vitro*, generalmente cuenta con dos áreas de aclimatación: la primera, llamada propagación tiene una temperatura entre 28–30 °C y humedad relativa entre 50-80 %, el sistema de riego debe ser mediante un sistema computarizado de nebulizadores con una frecuencia de 3 segundos cada 5 minutos. La segunda, llamada área de aclimatación tiene una temperatura de 25-28 °C y humedad relativa entre 40-60 %, el sistema de riego en esta área es por micro aspersores. (Montes *et al.*, 2016).

d) Otros factores a considerar

El suministro de agua mediante el riego que se establezca, el control oportuno de plagas y/o enfermedades que se puedan presentar, así como el empleo de fertilización durante las diferentes etapas de crecimiento y desarrollo son factores que no se pueden desconocer.

La luz y la respuesta morfológica de las plantas, las condiciones ambientales, como la humedad relativa, temperatura y la luz, comúnmente influyen el crecimiento y desarrollo de las plantas. La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos “*in vitro*” (Ramírez, 2010).

2.8. Medios de cultivo

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias (Ochoa, 2014).

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni “*in vitro*” ni in vivo. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas o sus fragmentos no son completamente autotróficos cuando se desarrollan en estas condiciones (Figuerola, 2015).

Los medios de cultivo más frecuentemente usados para la producción de brotes en angiospermas son Woody Plant (WP), y Murashige & Skoog (MS) suplementado con BAP (bencilamino purina). Cambiando los nutrientes del medio de cultivo se puede alterar el porcentaje de explantes que formen brotes adventicios y/o el número de brotes adventicios o vástagos. Medios con baja calidad de sales como el Woody Plant (WP), 1970 y Gresshoff; Doy (GD), 1972 incrementan algunas veces el porcentaje de enraizamiento de brotes axilares en árboles (Thorpe, 1991, citado por Remache, 2011).

Se han descrito numerosas formulaciones adaptadas para casos concretos (medio para yemas, medios para mersistemas, medios para hojas etc.) no existe un medio único ideal. Las necesidades nutritivas para un crecimiento óptimo “*in vitro*” varía con la especie y pueden ser específicos de acuerdo a la parte de la planta o tipo de tejido que se cultiva y a la respuesta que se desea obtener (Sabit, 2006). Sin embargo, el medio de cultivo más utilizado es el descrito por Murashige y Skoog (MS) en 1962 con una concentración relativa alta de sales que provoca crecimientos rápidos en la mayoría de los cultivos, además se han realizado modificaciones adaptadas para plantas leñosas que mejoran el crecimiento como los redactados por (Quoirin; Lepoivre, 1977) o el “Woody Plant Médium” (WPM) por Lloyd y McCown en 1980 (Edwin, 2008, citado por Paliz, 2012).

2.9. Componentes del medio cultivo

2.9.1. Macro y micro elementos

Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, Mg) y los micro elementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl), que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras en condiciones “*ex vitro*”, estos compuestos son requeridos en concentraciones adecuadas de milimolares y micromolares respectivamente. En general se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado juntamente con un agente quelante (Na₂EDTA), que lo hace disponible en un amplio rango de pH. Los requerimientos nutritivos para un crecimiento “*in vitro*” óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y a la respuesta que se desea obtener (Jaramillo y Ordoñez, 2013).

2.9.2. Reguladores de crecimiento

Generalmente es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberilinas o ácido abscísico, para mejorar el desarrollo del cultivo “*in vitro*” de tejidos y órganos. Por otro lado, los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo “*in vitro*” (Valarezo, 2015).

a) Auxinas

Se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros. En cultivo “*in vitro*” las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: IBA (ácido indol-3-butírico), NAA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El IBA y el NAA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio (Jacome, 2011).

b) Citoquininas

Se asocian con los procesos de división celular. La producida artificialmente tiene propiedades análogas a las naturales. La zeatina es un citoquinina natural extraída de la semilla de maíz pero está a un costo muy alto. En los medios para cultivo “*in vitro*” se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas más usadas son: BAP (bencilamino purina), kinetina y 2-ip (isopentenil-adenina). Generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (Calderón, 2013).

c) Giberelinas

Su nombre proviene del hongo *Gibberella fujikuroi* de donde fueron extraídas originalmente. El ácido giberélico fue la primera de esta clase de hormona en ser descubierta. Son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo, (Raisman, 1999). Inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemas o yemas “*in vitro*”. También pueden romper la dormancia de embriones aislados o yemas, generalmente inhiben la formación de raíces adventicias y también la formación de vástagos adventicios, (Pierik, 1990).

Las giberelinas especialmente el AG3, han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices o meristemas caulinares de varias especies vegetales (Roca y Mroginski, 1993, citado por Jaramillo, 2013).

d) Etileno

Siendo un hidrocarburo, es muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Aunque se ha sabido desde principios de siglo que el etileno provoca respuestas tales como geotropismo y abscisión, no fue sino hasta los años 1960 que se empezó a aceptar como una hormona vegetal. Se sabe que el efecto del etileno sobre las plantas y secciones de las plantas varía ampliamente. Ha sido implicado en la maduración, abscisión, senectud, dormancia, floración y otras respuestas. El etileno parece ser producido esencialmente por todas las partes vivas de las plantas superiores, y la tasa varía con el órgano y tejido específico y su estado de crecimiento y

desarrollo. Se ha encontrado que las alteraciones en la tasa sintética de etileno están asociadas cercanamente al desarrollo de ciertas respuestas fisiológicas en plantas y sus secciones, por ejemplo, la maduración de frutas climatéricas y la senectud de flores (González, 1999, citado por Orozco, 2014).

e) Ácido abscísico

Es un potente inhibidor del crecimiento que ha sido propuesto como regulador en respuestas fisiológicas tan diversas como el letargo, abscisión de hojas, frutos y estrés hídrico, teniendo efectos contrarios a las de las hormonas de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas). Típicamente la concentración en las plantas es entre 0.01 y 1 ppm; sin embargo, en plantas marchitas la concentración puede incrementarse hasta 40 veces. El ácido abscísico se encuentra en todas las partes de la planta, sin embargo, las concentraciones más elevadas parecen estar localizadas en semillas y frutos jóvenes y la base del ovario (Mora, 2013).

2.9.3. Vitaminas

Las plantas verdes se consideran normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir algunas de ellas, la Tiamina (0,1 a 0,5 ppm) casi siempre es esencial, la Piridoxina (0.5 ppm) y el ácido nicotínico (0.5 ppm), (Roca, Mroginski, 1993; Hartman, Kester, 1997, citado por Lincango, 2015).

En muchos cultivos resulta beneficioso el inositol, a razón de 100 ppm, entre otros compuestos benéficos se encuentra el ácido pantoténico (0.1 ppm) y la biotina (0.1 ppm). Todos estos materiales son solubles en agua y se deben preparar como soluciones concentradas (Hartman y Kester, 1997, citado por Lincango, 2015).

2.9.4. Agentes gelificantes

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de cultivo de tejidos, se elabora primero un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante, y al sistema de cultivo. Su efectividad depende tanto de los ingredientes

básicos como del agente gelatinizador, en caso de que los medios sean semisólidos (Cisne, Muños y Reyes, s.f).

Se usan varios agentes gelificantes pero los más usados y de mejores resultados son los siguientes:

a) Agar

El agar es un derivado de alga marina, que se obtiene en forma de pídora, se usa en la mayor parte de los medios nutritivos. Aunque se trata de un producto natural, se lava y purifica durante su elaboración, de manera que prácticamente no contiene materiales tóxicos. El agar es un polisacárido con una elevada masa molecular, que tiene capacidad para gelificar los medios. Resulta con facilidad el componente más caro de los medios nutritivos sólidos (Pierik, 1990).

La concentración de agar que se recomienda usar en la preparación de medios varía entre 0.6 y 1 % (Mroginski, 2010).

b) Gelrite

Agente gelificante altamente purificado, es un heteropolisacárido aniónico, natural que forma geles semejantes al agar, quebradizos y rígidos, en presencia de sales solubles. El gelrite es un polisacárido compuesto de ácido glucorónico, ramnosa, glucosa y residuos O-acetil. Los geles de gelrite son notablemente más claros que los de agar, y también cuajan más rápidamente, (Pierik, 1990).

La concentración de gelrite que se recomienda usar en la preparación de medios varía entre 0.10 – 0.20 % (Mroginski, 2010).

c) Phytigel

Este gelificante es producido a partir de la fermentación bacteriana compuesto de ácido glucorónico, ramnosa y glucosa, es un gel transparente incoloro, de alta resistencia: que ha demostrado ser un sustituto superior al agar, (Sigma-Aldrich, 2012).

La concentración de phytigel que se recomienda usar para la preparación de medio nutritivo varía entre 0.25 – 0.40 % (Mroginski, 2010).

d) Gelzan

Es un polímero gelificante de origen natural que se puede utilizar en una variedad de aplicaciones como un agente de solidificación en lugar de agar. Producido por fermentación microbiana, Gelzan es un polisacárido aniónico natural altamente purificado sin las variaciones comúnmente asociadas con el agar. Gelzan forma geles rígidos, frágiles, similares a agar a aproximadamente la mitad del nivel de uso de agar en presencia de sales solubles como Mg_{2+} y Ca_{2+} . Los geles preparados con Gelzan son notablemente claros en comparación con los formados con agar. Gelzan no contiene materias contaminantes (por ejemplo, compuestos fenólicos) como las que se encuentran en el agar que son tóxicas para ciertos organismos sensibles. La concentración de Gelzan que se recomienda usar en la preparación de medios varía entre 0.6 – 0.8 % (Li-Chun Huang y Toshio Murashige, s.f).

2.9.5. Otros compuestos

Muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios básicos. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden agregar; es el caso de L-tirosina, asparagina y cisteína, aunque hay que tener presente que en dosis altas pueden inhibir el crecimiento de los cultivos. El carbón activado (0.1 a 5 %) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos (Puluc, 2015).

En algunos medios se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico y es frecuente el empleo de L-glutamina y de caseína hidrolizada. Aún hoy, se siguen utilizando ciertos componentes de composición química no bien definida como el agua de coco (5 a 15 %), jugo de tomate y puré de banana. También en ocasiones es necesaria la incorporación de agentes antioxidantes (L-cisteína, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona) para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes. Este ennegrecimiento puede causar la muerte de los mismos (Mroginski, 2010).

2.10. Ventajas y desventajas del cultivo “*in vitro*”

a) Ventajas del cultivo “*in vitro*”

Es el único método conocido actualmente para erradicar virus, viroides, micoplasmas y otros patógenos a partir de material enfermo, propagación clonal masiva de plantas libres de enfermedades en corto tiempo, mantiene el cultivo libre de plagas enfermedades, porque se requiere mucha asepsia. Reduce costos de labores agronómicas en el mantenimiento de germoplasma en el campo, multiplicación en cualquier época del año porque se trabaja en condiciones ambientales controladas, conservación de material genético en vías de extinción (Patiño, 2011).

b) Desventajas del cultivo “*in vitro*”

Requiere de personal especializado, demanda infraestructura y equipos especiales, la adquisición de productos químicos es costosa y difícil especialmente en países con pocos recursos, difícil de instalar laboratorios “*in vitro*” donde no exista fluido eléctrico, la escasa literatura relacionada al cultivo “*in vitro*” de especies forestales, difícil respuesta inicial de algunas especies o genotipos (Mejía, 1994).

Generalmente se requiere de 1 a 1.5 años para adecuar las condiciones a cada especie o genotipo. Los problemas que presenta el cultivo “*in vitro*” es: la contaminación es grave y vitrificación es una reacción de las plantas que las hace adquirir apariencia de vidrio. La única solución es hacer un subcultivo de material sano, es decir, se saca y se cortan los explantes que estén bien (Gonzales, 1998, citado por Remache, 2011).

2.11. Principales problemas en el cultivo “*in vitro*”

b) Vitropatógenos

Uno de los problemas más importantes en el desarrollo de la biotecnología vegetal y especialmente del cultivo “*in vitro*” de células y tejidos es la contaminación por vitropatógenos. El efecto de los microorganismos contaminantes sobre las vitroplantas puede ser considerable si se tiene en cuenta que compiten con ellas por los nutrientes del medio y les provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos y por la expulsión al medio de

metabolismos tóxicos pudiendo llegar a reducir los coeficientes de multiplicación, inhibir el enraizamiento y ocasionar la muerte del explante (Lincango, 2015).

c) Vitrificación

La vitrificación es también conocida como hiperhidricidad, translucidez, transformación hiperhídrica, glaucosidad y vitrosidad. Produce la aparición de características atípicas en las plantas cultivadas “*in vitro*” a nivel anatómico, morfológico y fisiológico. Las características de plantas vitrificadas son una enorme cantidad de agua en los tejidos de las hojas y tallos, una reducción en la producción de las ceras epicuticulares combinado con una gran pérdida de agua, una distorsión del movimiento de los estomas y una anatomía anormal de hojas, tallos y raíces. Los brotes afectados presentan entrenudos cortos y los brotes apicales aparecen con fasciaciones (Nieto y Valdivieso, 2013).

La vitrificación aparece especialmente en las plantas que disponen de una gran cantidad de agua, como ocurre en los medios líquidos o con baja concentración de agar (Pierik, 1990, citado por Jaramillo, 2013).

d) Oxidación

El pardeamiento de los explantes es un problema que se presenta con mayor frecuencia en especies leñosas y se relacionan con la liberación al medio y oxidación de polifenoles, que dan como resultado productos tóxicos para el explante. La luz y la especie son factores determinantes en la oxidación de explantes en cultivo “*in vitro*”. Este último tiene dos posibles orígenes: uno propio de la planta que produce muchos hidroxifenoles y taninos, causantes de la oxidación y otro que proviene del uso de algunos desinfectantes, los cuales inducen la oxidación (Toro, 2004, citado por Espinoza, 2014).

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1. Ubicación del estudio

3.1.1. Político

El estudio se desarrolló en dos fases:

La fase de campo se realizó en la provincia de Esmeraldas, cantón Eloy Alfaro, parroquia Timbiré, sector la Concepción, lote asociación 30 de mayo.

La fase de laboratorio se realizó en la Universidad Técnica del Norte, específicamente en el Laboratorio de Biotecnología ubicado en la ciudadela universitaria en la Avenida 17 de Julio y General José María Córdova en la cabecera cantonal de Ibarra.

3.1.2. Geográfico

El lote asociación 30 de mayo se encuentra ubicado a $79^{\circ} 4' 56.45''$ de longitud W y $0^{\circ} 43' 25.43''$ latitud N, a una altitud de 150 msnm (GADT, 2015).

La Universidad Técnica del Norte se encuentra ubicado a $78^{\circ} 08' 22.5''$ de longitud W y $0^{\circ} 21' 46.2''$ latitud N, a una altitud de 2221 msnm (GADI, 2015).

3.1.3. Límites

El lote asociación 30 de mayo limita, al norte con la propiedad del señor Dendy Valdez, al sur con la propiedad de la señora Karen Ocampo, al este con la propiedad del señor Jesús Quintero y al oeste con la propiedad del señor Marcin Espinosa (GADT, 2015).

La Universidad Técnica del Norte limita al norte con la calle general José María Córdova, al sur con el río Tahuando, al este con la Avenida 17 de Julio y al oeste con la Panamericana Norte (GADI, 2015).

3.2. Datos climáticos

La temperatura media anual del lote es 24.25 °C y la precipitación media anual es de 2500 mm. Los meses más lluviosos son abril y mayo, mientras que el mes de menor precipitación es agosto (GADT, 2015).

La Universidad Técnica del Norte presenta una temperatura media anual de 15.90 °C y la precipitación oscila entre 1200 mm; los meses más lluviosos son marzo, mayo y octubre; los meses de menor precipitación junio y septiembre (GADI, 2015).

3.3. Datos ecológicos

El lugar de recolección del material vegetativo corresponde a un bosque húmedo tropical (b.h.T) (MAE, 2012).

3.4. Materiales, equipos y reactivos

3.4.1. Materiales

3.4.1.1. Vegetativo

El material vegetativo (yemas, meristemas y hojas) se obtuvo de la regeneración natural, de los árboles localizados en el lote asociación 30 de mayo.

3.4.1.2. De laboratorio

- Tubos de ensayo.
- Pipetas.
- Mecheros.
- Probetas.
- Algodón.
- Bisturí.
- Espátulas.
- Vasos de precipitación.
- Frascos.
- Pinzas.

3.4.2. Equipos

- Cámara de flujo laminar.
- Agitador magnético.
- Destilador de agua.
- pH-metro.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Estufa
- Bomba de vacío con desecadora acoplada.
- Estereoscopio con cámara.
- Estufa
- Cámara fotográfica.

3.4.3. Reactivos

- Medio basal Murashige & Skoog (MS), 1962
- Ácido naftalenacético (ANA), ($C_{12}H_{10}O_2$).
- Benzil amino purina (BAP), ($C_{12}H_{11}N_5$).
- Kinetina, ($C_{10}H_9N_5O$).
- Agar.
- Agua destilada y bidestilada.
- Alcohol potable.
- Cloro comercial, ($NaClO$).
- Hidróxido de sodio, ($NaOH$).
- Etanol, (C_2H_6O).
- Tween 20, ($C_{58}H_{114}O_{26}$).
- Benomyl, ($C_{14}H_{18}N_4O_3$).
- Kasumin, ($C_{14}H_{25}N_3O_9$).
- Bicloruro de mercurio, ($HgCl_2$).

3.5. Fases de la investigación

3.5.1. Fase de campo (selección del material vegetativo)

El material vegetativo se recolectó de árboles de edad de 30–35 años y de regeneración natural. Los árboles han sido clasificados como posibles fuentes semilleros debido a sus características fenotípicas: rectos, cilíndricos; por su estado sanitario: libre de plagas y enfermedades.

Mediante una poda de la parte intermedia de la copa del árbol, se extrajeron ramas de 8–10 centímetros de diámetro de las cuales se obtuvieron las yemas, meristemas y hojas. El material vegetativo seleccionado no tenía rayones, mancha, suciedades, lastimados por hormigas, enfermedades, marchitamiento, fenolización.

3.5.1.1. Transporte del material vegetativo

Para transportar las yemas y meristemas se seleccionó ramas de 30 cm, cada rama contenía de 10–15 yemas, en la base y extremo de la rama se colocó algodón con cisteína, para minimizar el riesgo de fenolización y deshidratación del material, se elaboraron paquetes con 25–30 ramas. Para transportar las hojas se elaboraron paquetes con 35–40 unidades.

Para el transporte de yemas, meristemas y hojas, se aplicó los métodos que se indican en la Tabla 2.

Tabla 2

Métodos de transporte del material vegetativo de yemas, meristemas y hojas

Material vegetativo	Método de transporte
	Material vegetativo envuelto con papel periódico (TRL1)
	Material vegetativo envuelto con papel periódico más cisteína al 25 mg/l ⁻¹ (TRL2)
Yemas	Material vegetativo envuelto en papel periódico y humedecidos con cisteína 25 mg/l ¹ y dentro del cooler (TRL3)
	Material vegetativo envuelto en papel periódico y aplicado con Benomilo 1% y dentro del cooler. (TRL4)
Meristemas	Material vegetativo envuelto en papel periódico y humedecidos con cisteína 25 mg/l ¹ y dentro del cooler (TRL3)
Hojas	Material vegetativo envuelto en papel periódico y aplicado con Benomilo 1% y dentro del cooler. (TRL4)

3.5.2. Fase de laboratorio

La segunda fase consistió en la micropropagación del material vegetativo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Técnica del Norte, ubicado en la ciudadela universitaria en la Avenida 17 de Julio y General José María Córdova en la cabecera cantonal de Ibarra.

3.5.2.1. Preparación de los medios de cultivo

Murashige & Skoog (1962) mencionan que el medio SM es el más usado para el cultivo “*in vitro*” y sirve como base para todos los medios de cultivo.

Para la preparación de los medios de cultivo se tomó de las soluciones madres diferentes dosis, como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3

Medios de cultivo

Medios de cultivo	Medio para yemas	Medio para mesistemas	Medio para hojas		
			Incubación	Callo	
Sales (SM)	10 ml/l ⁻¹	10 ml/l ⁻¹	5 ml/l ⁻¹	10 ml/l ⁻¹	
Sacarosa	6,58 g/l ⁻¹	6,58 g/l ⁻¹	3,29 g/l ⁻¹	6,58 g/l ⁻¹	
Vitaminas	10 ml/l ⁻¹	10 ml/l ⁻¹	5 ml/l ⁻¹	10 ml/l ⁻¹	
Hormonas	AIA	~	1,5 ml/l ⁻¹	~	
	Kin	~	0,5 – 1,5 ml/l ⁻¹	~	
	AG3	~	0,5 – 1 – 1,5 ml/l ⁻¹	~	
	BAP	3 ml/l ⁻¹	~	1 ml/l ⁻¹	3 ml/l ⁻¹
	2-4 D	6 ml/l ⁻¹	~	2 ml/l ⁻¹	6 ml/l ⁻¹
Antioxidante (Cisteína)	25mg/l ⁻¹	25mg/l ⁻¹	13mg/l ⁻¹	25mg/l ⁻¹	
Gelificante (Agar)	6,58 g/l ⁻¹	6,58 g/l ⁻¹	3,29 g/l ⁻¹	6,58 g/l ⁻¹	
pH	5,7	5,7	5,7	5,7	

3.5.2.2. Esterilización

La esterilización de cristalería, medios de cultivo, agua destilada, pinzas, algodón, guillet, bisturís, se realizó en un autoclave Tuttnauer modelo 2340MK, a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos y a una presión de 1,2 kg/cm².

3.5.2.3. Tratamientos para la siembra

Para la siembra se elaboraron 20 tratamientos (Tablas 4, 5, 6).

En la Tabla 4 se señala el método de desinfección en el laboratorio y el medio de cultivo que se aplicó para el material vegetativo de las yemas.

Tabla 4

Tratamientos de yemas

Tratamiento	Método de desinfección	Medio de cultivo
T1	10 minutos en NaClO al 20% (TD1)	
T2	20 minutos en NaClO al 20% (TD2)	
T3	20 en minutos en Kasumin al 2% (TD3)	
T4	20 minutos en Benomilo al 1% (TD4)	
T5	40 minutos en Kasumin al 2% + Benomilo al 1% + al vacío 40 minutos (TD5)	
T6	40 minutos en Kasumin al 2% + al vacío 40 minutos (TD6)	SM
T7	40 minutos en Benomilo al 1% + al vacío 40 minutos (TD7)	
T8	20 minutos en NaClO al 20% + HgCl ₂ - 25ml/l ⁻¹ + al vacío 40 minutos (TD8)	
T9	20 minutos en NaClO al 20% + HgCl ₂ - 25ml/l ⁻¹ + al vacío 40 minutos (TD9)	
T10	20 minutos en NaClO al 20% + HgCl ₂ - 25ml/l ⁻¹ + al vacío 40 minutos (TD10)	

El material vegetativo luego de la aplicación del método de desinfección fue enjuagado tres veces con agua destilada y estéril.

En la Tabla 5 se muestra el método de desinfección en el laboratorio y el medio de cultivo que se aplicó para el material vegetativo de los meristemas.

Tabla 5

Tratamientos de meristemas

Tratamiento	Método de desinfección	Medio de cultivo
T11		SM, más reguladores de crecimiento: AIA(1 mg/l ⁻¹) Kin (0,5 mg/l ⁻¹) AG3 (0,5 mg/l ⁻¹) (MM1)
T12		SM, más reguladores de crecimiento: AIA(1,5 mg/l ⁻¹) Kin (0,5 mg/l ⁻¹) AG3 (1,0 mg/l ⁻¹) (MM2)
T13	40 minutos en NaClO al 20% + HgCl ₂ - 25ml/l ⁻¹ + al vacío 40 minutos	SM, más reguladores de crecimiento: AIA(1,5 mg/l ⁻¹) Kin (0,5 mg/l ⁻¹) AG3 (1,5 mg/l ⁻¹) (MM3)
T14	(TDM)	SM, más reguladores de crecimiento: AIA(1,5 mg/l ⁻¹) Kin (1,5 mg/l ⁻¹) AG3 (0,5 mg/l ⁻¹) (MM4)
T15		SM, más reguladores de crecimiento: AIA(1,5 mg/l ⁻¹) Kin (1,5 mg/l ⁻¹) AG3 (1,0 mg/l ⁻¹) (MM5)
T16		SM, más reguladores de crecimiento: AIA(1,5 mg/l ⁻¹) Kin (1,5 mg/l ⁻¹) AG3 (1,5 mg/l ⁻¹) (MM6)

El material vegetativo luego de la aplicación del método de desinfección fue enjuagado tres veces con agua destilada y estéril.

En la Tabla 6 se muestra el método de desinfección en el laboratorio y el medio de cultivo que se aplicó para el material vegetativo de las hojas.

Tabla 6

Tratamiento para las hojas

Tratamiento	Método de desinfección	Medio de cultivo
T17	20 minutos en NaClO al 20% (TDH1)	
T18	30 minutos en NaClO al 20% (TDH2)	
T19	20 minutos en Benomilo al 1% + NaClO al 20% durante 20 minutos. (TDH3)	SM, al 50% para incubación y para medio de callo al 100% además se adiciono 2ml/l de BAP y 6ml/l de 2,4-D
T20	30 minutos en NaClO al 20% + un minuto en alcohol al 70% (TDH4)	

El material vegetativo luego de la aplicación del método de desinfección fue enjuagado tres veces con agua destilada y estéril.

3.5.2.4. Siembra del material vegetativo

Previo a la siembra del material vegetativo, todos los instrumentos como pinzas, cajas petri, bisturí, gillette, algodón, agua destilada, frascos, papel aluminio, medios de cultivo, fueron esterilizados en el autoclave a una temperatura de 121°C y a una presión de 1,2 kg/cm² durante 15 minutos. Además, se hizo una limpieza y esterilización de la cámara de flujo laminar con alcohol (70%) y se sometió a los rayos UV durante 15 minutos. Luego de ese período de tiempo se inicia con el proceso de siembra de los diferentes tipos de material vegetativo.

3.5.2.4.1. Siembra de yemas

Las yemas para el ensayo se obtuvieron de una muestra vegetativa colocada en un vaso de precipitación que contenía 25 mg/l⁻¹ de cisteína. Sobre una caja petri se cortó diagonalmente con el bisturí un explante de 1,5 cm de largo que contenía una yema axilar o terminal. Se tomó el explante con la pinza y se sembró un explante por frasco en el medio para yemas (ver Tabla 4). Finalmente se selló con plástico para minimizar los riesgos de contaminación microbiana.

3.5.2.4.2. Siembra de meristemas

Para la siembra de meristemas se utilizó un estereoscopio Olympus SZ51 con un aumento de 20–40X. Para la extracción del meristema se eliminó los primordios foliares con un bisturí; localizado el meristema se extrajo y fue sembrado con una aguja de disección en el medio para meristemas (ver Tabla 5). Finalmente se selló con plástico el tubo de ensayo para disminuir los riesgos de contaminación microbiana.

Se sembró un meristema por tubo de ensayo, en una yema se podían encontrar de 7–10 meristemas laterales y el apical estaba formado por 5–7 es decir una corona de meristemas.

3.5.2.4.3. Siembra de hojas

La siembra de las hojas consistió en dos fases:

a) En la primera fase se eliminaron los bordes y el ápice de la hoja con una tijera. Se cortó explantes de 5 X 5 mm, que se colocaron en la caja petri y con el haz en contacto con en el medio de incubación se sembró, un total de cuatro explantes por frasco.

b) La segunda fase se realizó al período de 48–72 horas, se evaluaron los explantes sembrados en el medio de incubación, los que no tenían contaminación, se subcultivaron con una pinza al medio con reguladores de crecimiento de callo (MC3).

3.5.2.5. Área de incubación

Los ensayos de yemas, meristemas y hojas fueron trasladados al área de incubación para su desarrollo, ahí se registró fotoperíodo y temperatura.

En el caso de las hojas también se colocó a la oscuridad para controlar la oxidación del material vegetativo. La temperatura a la oscuridad fue de 26°C, a la luz fue de 23°C.

3.6. Diseño experimental

Se aplicó el diseño irrestricto al azar con arreglo factorial, 3 tipos de material vegetativo (yemas, meristemas y hojas); con sus respectivos métodos de transporte para cada tipo del material vegetativo (yemas-meristemas 4 y hojas 1), al igual que sus respectivos tratamientos de desinfección para cada tipo del material vegetativo (yemas-meristemas 8 y hojas 4) y con diferentes tratamientos pregerminativos en cada tipo del material vegetativo (yemas 1, meristemas 6 y hojas 2). La combinación de estos factores dieron un total de 20 tratamientos (ver Tabla 7).

- Se realizó una prueba de Duncan al 5% de probabilidad estadística
- Variables a analizar que se realizaron fueron:

a)

$$\text{Porcentaje de explantes sanos} = \frac{\text{total de explantes contaminados}}{\text{total de explantes sembrados}} \times 100$$

Fuente: Montes, 2016

c) Crecimiento y desarrollo de los explantes.

- Inicio de formación del brote (días transcurridos hasta la formación del brote)
- Días que transcurren hasta la aparición de las hojas (tamaño de las hojas, coloración)
- Números de entrenudos
- Longitud de entrenudos.
- Días que transcurren hasta la aparición de las raíces. (número de raíces, longitud de la raíz principal)

3.6.1. Análisis de varianza

Se realizó el análisis de varianza del diseño irrestricto al azar según el desglose de la siguiente tabla.

Tabla 7

Análisis del diseño

Adeva				
Fuentes de variación	SC	GL	CM	F
Tratamientos	$\sum Y_i^2 / n - Fc$	20-1=19	Sc_t / GL	CM_t / CM_E
Factor A: material vegetativo	$\sum Y_{.j}^2 / n(mv) - Fc$	3-1=2	Sc_{mv} / GL	CM_{mv} / CM_E
Factor B: medios de cultivo	$\sum Y_{i.}^2 / n(mc) - Fc$	9-1=8	Sc_{mc} / GL	CM_{mc} / CM_E
Factor C: medios de desinfección	$\sum Y_{i.}^2 / n(md) - Fc$	13-1=12	Sc_{md} / GL	CM_{md} / CM_E
Factor A* Factor B*Factor C	$Sc_t - Sc_{mv} - Sc_{mc} - Sc_{md}$	(3-1)*(9-1)*(13-1)=192	$Sc_{mv*mc*md} / GL$	$CM_{mv*mc*md} / CM_E$
Error	$\sum \sum Y_{ij}^2 - \sum Y_i^2 / n$	20*(0-1)=20	Sc_E / GL	-
Total	$\sum \sum Y_{ij}^2 - Fc$	20*0-1=1	-	-

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Forma de traslado del material vegetativo

En la Figura 5 se muestra el número de tratamientos y horas de conservación para el traslado del material vegetativo. La mejor forma de traslado fue el tratamiento TRL3 que permitió la conservación del material hasta 120 horas sin la presencia de fenolización ni contaminantes. Este resultado puede atribuirse a la aplicación de la cisteína. Por otro lado el uso del contenedor delimitó el resecamiento y los daños en el transporte del material (Montes *et al.*, 2016).

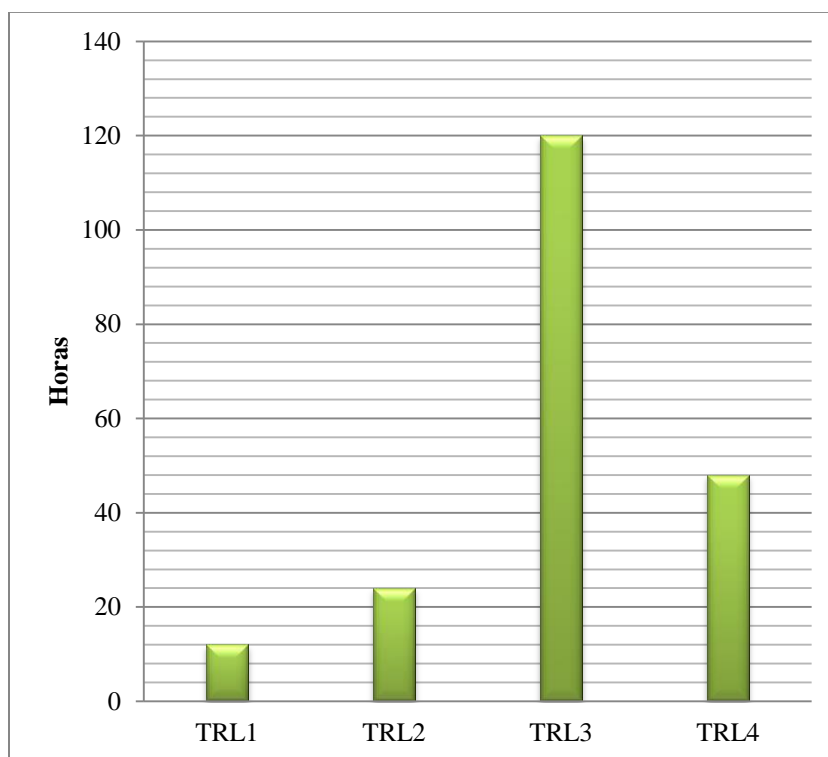


Figura 5. Tiempo de conservación del material vegetativo.

4.2. Contaminación de los explantes

La Figura 6 muestra tiempo de conservación del material vegetativo. Los mejores explante fueron provenientes de las hojas con un total de 92% sanos. Según Montes (comunicación personal, 17 de noviembre de 2016), este resultado puede atribuirse a las células que están en constante proceso de estructuración y funcionalidad del nuevo ser vivo. El tipo de explante a usarse en los procesos de micropropagación, depende de la especie con la que se esté trabajando

y de los objetivos que se persigan (Fossard, 1999; Villamizar, 2005; Rojas, 2004 y Castillo, 2008).

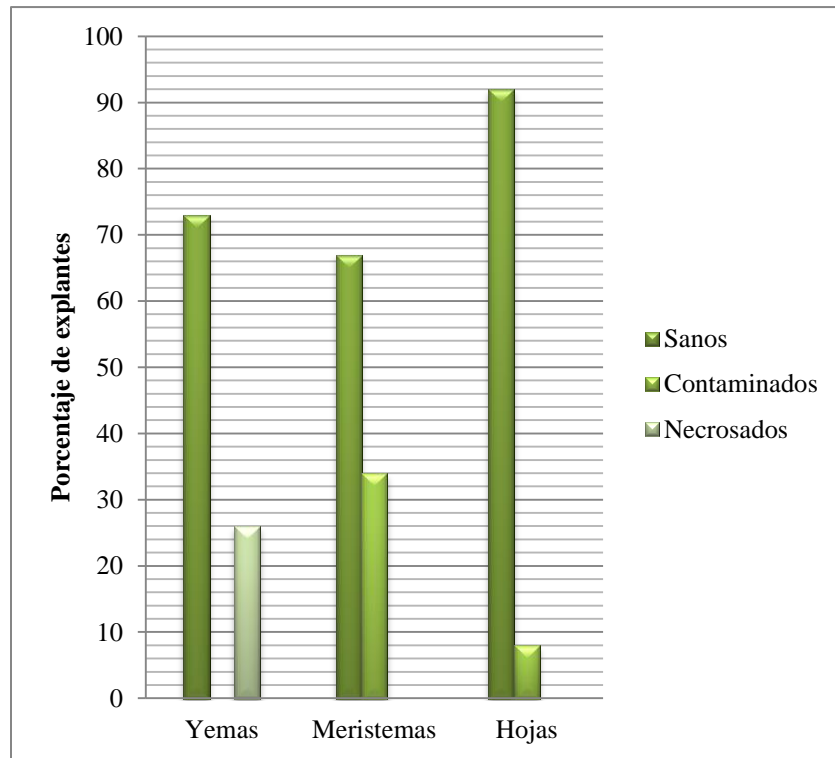


Figura 6. Representación de la contaminación de lo explantes

4.3. Métodos de desinfección

4.3.1. Desinfección en el laboratorio de las yemas y meristemas

En la Figura 7 se muestra el mejor método de desinfección de los diferentes materiales vegetativos empleados en el estudio. La mejor desinfección en las yemas fue el tratamiento TD8, que permitió controlar la contaminación del material hasta por 192 horas, mientras que en los meristemas fue el T12 que permitió controlar 48 horas. Estos resultados se pueden atribuir a la aplicación de diferentes sustancias de desinfección, además de la técnica al vacío. La desinfección con bicloruro de mercurio no resulta ser muy bueno, a pesar que controla el 100 % de la contaminación, los porcentajes de sobrevivencia a los 24 días fueron bajo al 20 %, además el compuesto es altamente tóxico y no es fácilmente removible del explante (Roca, 1991; Laynez y Sánchez, 2006). La aplicación de bicloruro de mercurio como agente desinfectante, se utiliza con éxito en muchas especies forestales y leñosas, con serios problemas de contaminación. La

utilización del bicloruro de mercurio como agente desinfectante es un método simple, rápido y eficaz para la obtención de explantes viables y libres de contaminación mayor al 80% (Seneviratne 1996; Ribas, 2003; Zibbu y Batra, 2010 y Pérez, 2016).

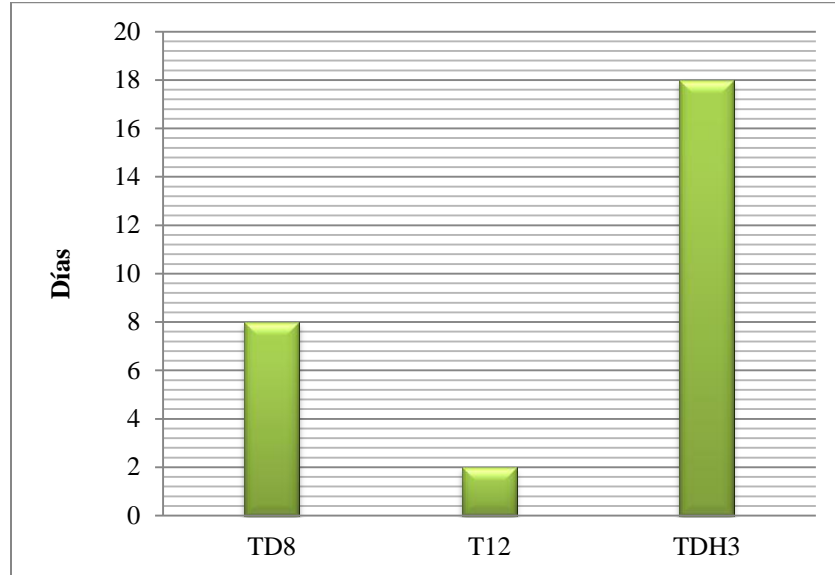


Figura 7. Inicio de contaminación según los tratamientos.

4.3.2. Desinfección en el laboratorio de las hojas

El mejor tratamiento para la desinfección de las hojas fue la aplicación de Benomilo al 1% + hipoclorito de sodio al 20% durante 20 minutos. Este tratamiento permitió controlar la contaminación de los explantes por 432 horas (18 días). La aplicación de Benomilo 2g/l^{-1} y Estreptomina 2g/l^{-1} durante 30 minutos en hipoclorito de sodio al 2%, más 24 horas en agua destilada estéril y otra desinfección con hipoclorito de sodio al 2% por 30 minutos, fue positivo en *Aloysia citriodora* (Mendoza, Tamayo y Pacheco, 2010). La aplicación de los fungicidas Mancozeb (7.5g/l^{-1}) y Benomilo (4g/l^{-1}) no fue efectiva en la eliminación de la micobiota epifítica de *Psidium guajava* (Acosta 2002). Esto se atribuye a que no todas las especies reaccionan de la misma manera a la aplicación de los diferentes compuestos químicos de desinfección.

4.4. Medios de cultivos

En la Figura 8 se muestra los resultados de mejor medio de cultivo. No se determinó cuál de las dosis empleadas en los medios de cultivo fue mejor ya que ninguno llegó a su etapa final debido a la contaminación y necrosis de los explantes (ver Tabla 3). En conservación de plantas de interés forestal, se determina que para las diferentes especies forestales se reportan diferentes concentraciones óptimas de microelementos y macroelementos. (Gamboa y Abdelnour, 1999; Troncoso s.f).

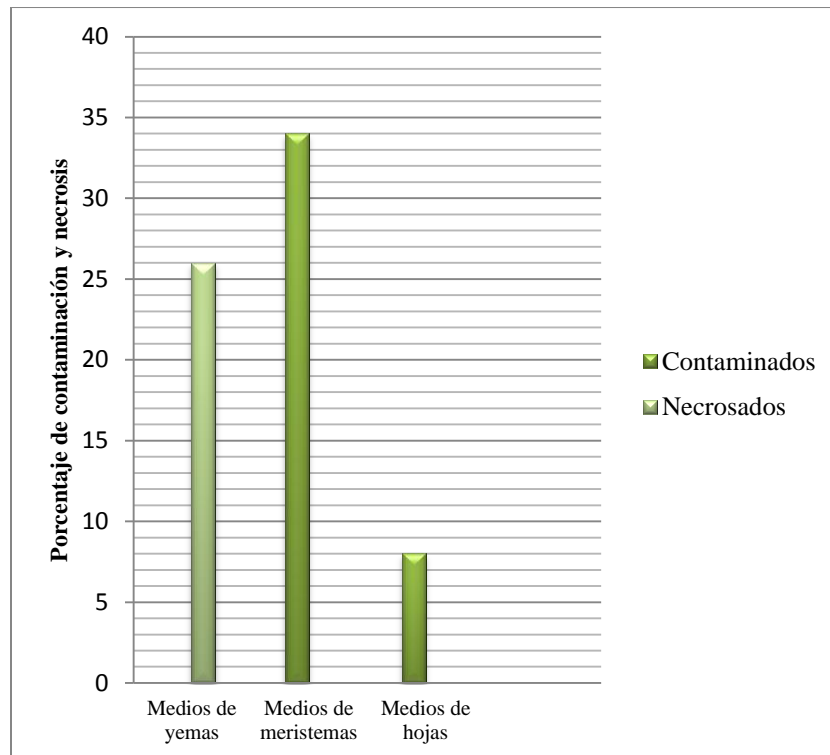


Figura 8. Comportamiento de los medios de cultivo

4.5. Obtención de vitroplantas

En la Tabla 8, se muestra los tratamientos y los porcentajes del material vegetativo sano, contaminado y necrosado. No se obtuvo vitroplantas ya que los ensayos no arrojaron resultados positivos, debido a la contaminación endógena, microbiana y necrosis del material vegetativo.

Nota: En el T17, T18, T19 y T20 la evaluación de contaminación a las 48 horas corresponde a los explantes sembrados en el cultivo de incubación, a partir del subcultivo en el medio de callo MC3 la contaminación se presentó a partir de 432 horas (18 días).

Tabla 8

Tiempos de evaluación de los tratamientos

TRATAMIENTOS	TIEMPOS DE EVALUACIÓN														
	24 HORAS			48 HORAS			72 HORAS			120 HORAS			192 HORAS		
FACTORES DE EVALUACIÓN	S	C	N	S	C	N	S	C	N	S	C	N	S	C	N
T1	100%	0%	0%	20%	73,33%	6,66%	0%	86,66%	13,13%	~	~	~	~	~	~
T2	100%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	~	~	~	~	~	~
T3	100%	0%	0%	100%	0%	0%	~	~	~	0%	73,33%	26,66%	~	~	~
T4	100%	0%	0%	100%	0%	0%	~	~	~	0%	80%	20%	~	~	~
T5	100%	0%	0%	100%	0%	0%	~	~	~	7%	73,33%	20%	~	~	~
T6	100%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	~	~	~	~	~	~
T7	100%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	~	~	~	~	~	~
T8	100%	0%	0%	100%	0%	0%	~	~	~	~	~	~	46,66%	13,33%	40%
T9	100%	0%	0%	100%	0%	0%	~	~	~	~	~	~	73,33%	0%	26,66%
T10	100%	0%	0%	100%	0%	0%	~	~	~	~	~	~	0%	100%	0%
T11	100%	0%	0%	0%	0%	100%	~	~	~	~	~	~	0%	100%	0%
T12	100%	0%	0%	67%	34%	0%	~	~	~	~	~	~	0%	100%	0%
T13	100%	0%	0%	0%	47%	53%	~	~	~	~	~	~	0%	100%	0%
T14	100%	0%	0%	13%	33%	53%	~	~	~	~	~	~	0%	100%	0%
T15	100%	0%	0%	0%	47%	53%	0%	100%	0%	~	~	~	~	~	~
T16	100%	0%	0%	7%	87%	7%	0%	100%	0%	~	~	~	~	~	~
T17	100%	0%	0%	90%	10%	0%	~	~	~	~	~	~	~	~	~
T18	100%	0%	0%	67%	33%	0%	~	~	~	~	~	~	~	~	~
T19	100%	0%	0%	92%	8%	0%	~	~	~	~	~	~	~	~	~
T20	100%	0%	0%	67%	99%	0%	~	~	~	~	~	~	~	~	~

S= explantes sanos, C= explantes contaminados y N= explantes necrosados.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El traslado más apropiado del material vegetativo fue el envuelto en papel periódico y humedecido con cisteína 25 mg/l^{-1} y dentro del cooler (TRL3).
- Los mejores explantes se consiguieron de hojas de rebrote más jóvenes que presentaban mejores características físicas, además fueron las que menos contaminación presentó.
- El mejor método de desinfección, para las yemas se obtuvo con la aplicación de hipoclorito de sodio al 20% durante 20 minutos + bicloruro de mercurio (25 ml/l^{-1}) más al vacío durante 40 minutos (TD9), para los meristemas fue en hipoclorito de sodio al 20% durante 40 minutos + bicloruro de mercurio (25 mg/l^{-1}) más al vacío durante 40 minutos (T12) y para las hojas fue en Benomilo al 1% durante 20 minutos + en hipoclorito de sodio al 20% durante 20 minutos (TDH3).
- No se pudo identificar qué medio de cultivo pre-germinativo brindan los mejores resultados debido a la contaminación endógena y microbiana además de la necrosis del material vegetativo.
- No se obtuvo vitroplantas debido a la contaminación y necrosis del material vegetativo.

5.2. Recomendaciones

- Para próximas investigaciones se recomienda emplear plántulas de regeneración natural y adaptarlas a un vivero cerca del laboratorio para así, conseguir material sano.
- En investigaciones futuras en cultivo “*in vitro*” de *Humiriastrum procerum* se recomienda que se usen los explantes de las hojas ya que presentan un alto grado de respuesta en la fase de desinfección.

- En estudios futuros de *Humiriastrum procerum* se recomienda, usar agentes desinfectantes como Benomilo e hipoclorito de sodio y que se utilicen otros fungicidas. Que se estudien diferentes concentraciones y tiempos.

- Ensayar el uso de otros reguladores y estimuladores de crecimiento en los medios de cultivo para acelerar el desarrollo de los explantes de hojas.

- En futuras investigaciones de *Humiriastrum procerum* se recomienda, usar diferentes agentes antibióticos en diferentes dosis en el medio de cultivo, para evitar la contaminación endógena y microbiana.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnour, A y Escalant, J. (1994). *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Costa Rica: Biblioteca Orton IICA/CATIE.
- Acosta, M; Caballero, I; Alvarado, Y y Leiva, M. (2002). *Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento "in vitro" de la guayaba (Psidium guajava L)*
- Ahuja, M. (1993). *Biotechnology and clonal forestry*. In: M.R. Ahuja and W.J. Libby (eds.), *Clonal forestry I, Genetics and biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. pp: 135-144.
- Abdullah, A & Grace, M. (1985). "*in vitro*" adventitious shoot formation from embryonic and cotyledonary tissues of *Pinus brutia* Ten. *Plant Cell, Organ and Tissue Culture* 5: 35-44.
- Aitken, J. (1981). *The influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of Pinus radiata*. *Can. J. For. Res.* 11: 112-117.
- Benavides, E. (2010). "*ESTUDIO DE TRATAMIENTOS PRE GERMINATIVOS EN DOS TIPOS DE SEMILLA DE CHANUL Humiriastrum procerum (Little) Cuatr. EN EL SECTOR DE LA COMUNIDAD CAPULÍ, PROVINCIA DE ESMERALDAS – ECUADOR*".
- Benítez, N. (2004). *Comportamiento fonológico de tres especies maderables con riesgo de extinción en Colombia y altos índices de explotación en el Choco: Huberodendron patinoi "Carrá", Cariniana pyriformis Mier "Abarco" y Humiriastrum procerum Little "Chanó"*. LYONIA, Volumen 7. Recuperado de: <http://www.lyonia.org/PDF>. Chocó - Colombia. p. 107
- Buitrago, A. (2008). *Biotecnología aplicada en especies forestales*.
- Cabrera, P. (2011). *Formación de callos y establecimiento de suspensiones celulares en el cultivo de cacao (Theobroma cacao L.)*

- Calderón, C. (2013). *“Evaluación in vitro del brasinoesteroide BB-6 y del oligosacárido Pectimorf en Capsicum annum L. variedad Jalapeño M.”*
- Castillo, A. (2008). *“Propagación de plantas por cultivo “in vitro”: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo.*
- Cedeño, E. (2015). *Micropropagación de banano orito (Musa acuminata AA) a partir de meristemos florales.*
- Chang, S. (1991). *Clonal propagation of Virginia pine (Pinus virginiana Mill.) by organogenesis.* Plant Cell Reports 10: 131-134.
- Cisne, J; Muños, I y Reyes, H. (s.f). *Reguladores de crecimiento, l-cisteína y ácido ascórbico en el cultivo in vitro de mora (Rubus glaucus Benth)*
- Cubero, J. (2003). *Introducción a la mejora genética vegetal.* España: Mundi-Prensa Libros.
- Domínguez, L. (2011). *Propagación in vitro de selecciones de guayabo (Psidium guajava L) y respuesta a hormonas y periodos de subcultivo.*
- Edwin, G. (2008). *Plant propagation by tissue culture 3 ed.* Netherlands. Springer. p. 37.
- Espinoza, A. (2014). *Propagación clonal in vitro de anturio (Anthurium andreanum) a través de callo u organogénesis indirecta.*
- Figueroa, R. (2015). *Efectos de diferentes dosis de citoquinina en interacción con un compuesto orgánico en la germinación in vitro de semilla de moringa (Moringa oleifera Lam).*
- Fossard, R. (1999). *Notes on Tissue Culture.* Xarma Pty. Ltd., Queensland, <http://www.xarma.com.au/culture.html>
- Fuentes, L; Rojas, A y Pérez, Y. (2011). *Estrategias para obtener variedades tolerantes a salinidad. el cultivo in vitro como herramienta útil para la mejora de leguminosas forrajeras.*

GADI. (2015). *PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DEL CANTÓN IBARRA*. Recuperado de http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PDOT/ZONA1/NIVEL_DEL_PDOT_CANTONAL/IMBABURA/IBARRA/INFORMACION_GAD/01%20CANTON%20IBARRA_PDOT/1%20Plan%20de%20Desarrollo%20y%20Ordenamiento%20Territorial%20del%20Cant%C3%B3n%20Ibarra/PORTE%201%20-%20PLAN%20IBARRA%202031.pdf

GADT. (2015). *PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL TIMBIRE* recuperado de: http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/0860015270001_PDO T+FINAL+2015_12-08-2015_15-16-01.pdf.

Gamboa, A y Abdelnour, J. (1999). *Micropropagación de melina (Gmelina arbórea ROXB)*.

Gisbert, M. (2010). *Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica*.

Gutiérrez, C. y OLIVA M. (2003). *Curso, Principios y Prácticas en el Cultivo de Tejidos Vegetales, Teoría*. San José – Costa Rica. Páginas 4 – 40.

Gutiérrez, A. (s.f). *El Chanul Suplica Protección*. Recuperado de: <http://www.revista-mm.com/ediciones/rev56/especie.pdf>

González, A. (1999). *Hormonas de las plantas*. Recuperado de <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm>.

Gonzales, C. (1998). *Micropropagación Vegetativa “in vitro” De Aliso (Alnus acuminata)*. Edición *Graficas de ADEFOR*. Cajamarca – Perú. Páginas 6-13.

Hartman, H y Kester, D. (1997). *Propagación de plantas*. México Df., MX. Continental. p. 592-607

Hurtado, D. y Merino, M. (2001). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Editoriales Anfred. México. Páginas 15- 20, 35 – 65, 67- 84, 162 – 178.

- ITTO. (s.f). *Especies menos usadas CHANUL (Humiriastrum Procerum)*. Recuperado de:
<http://www.tropicaltimber.info/es/specie/chanul-humiriastrum-procerum/#lower-content>.
- Jacome, J. (2011). *Evaluación de tres mezclas de sustratos y tres fitohormonas en enraizamiento de brotes laterales de babaco (Carica pentagona), barrio Pinllocruz, cantón Mejía, provincia de Pichincha.*
- Jácome, A. (2013). *Micropropagación in vitro de la especie endémica: jiguerón (Aegiphila ferruginea), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción.*
- Jadán, G; Oña, M y Lorena, E. (2010). *Evaluación del efecto de brasinoesteroides en las etapas de establecimiento, multiplicación y enraizamiento in vitro de banano variedad Williams. Tesis de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología. ESPE-Sangolquí: EC. 10-18 p.*
- Jaramillo, K. (2013). *Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de arrayán (Myrcianthes hallii) (O. Berg) mc vaugh. Quito, Pichincha. Tesis Ing. Agr. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Carrera de Ingeniería Agronómica. Quito, EC. 87 p.*
- Jaramillo, K y Ordoñez, M. (2013). *Evaluación de medios de cultivo sobre las fases de micropropagación “in vitro” de la especie forestal nativa Yagual (Polylepis incana) en la Provincia de Pichincha-2012. Tesis Ing. En Biotecnología. Sangolquí, EC. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología. p. 20; 24-25*
- Jaramillo, K y Ramírez, P. (2013). *Evaluación de Medios de Cultivo para la Micropropagación de Faique (Acacia macrantha). Mc Vaugh. Quito, pichincha. Tesis Ing. Agr. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Carrera de Ingeniería Agronómica. 111 p.*
- Jiménez, E. (1998). *Generalidades del cultivo “in vitro”. J. Pérez (Eds.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas.*

- Jiménez, J. (2015). *Desarrollo de protocolos para la propagación para la propagación in vitro de chuncho (Cedrelinga catenaeformis Ducke) y quishuar (Buddleja incana Ruiz&Pav) mediante la técnica de la organogénesis.*
- Layne, J y Sanchez, M. (2006). *Desinfección de ápices de yuca (Manihot esculenta Crantz) cv. 'Querepa Rosada' con hipoclorito de sodio*
- 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).*
- Li-Chun Huang y Toshio Murashige. (s.f). *Un protocolo de micropropagación para Cinnamomum camphora recuperado de <https://www.jstor.org/stable/20064971>*
- Lincango, L. (2015). *Evaluación de 2 hormonas y 2 medios de cultivo para la micropropagación in vitro de jacarandá (Jacaranda mimosifolia D. Don.) Quito, Pichincha.*
- Little, E y Dixon, R. (1969). *Árboles comunes de la provincia de Esmeraldas.* Quito– Ecuador.
- López, R. y I. Montero, G. (2005). *Manual de identificación de especies forestales en bosques naturales con manejo certificable por comunidades.* Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Bogotá. 128pp.
- Loya, D. (2014). *Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de yalomán (Delostoma integrifolium D. Don). Quito, Pichincha.*
- MAE. (2012). *Sistema de clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental*
- MAE. (2004). Recuperado de: <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/09/ley-forestal.pdf>
- Delgado M. (2013). Maderas de Colombia Recuperado de: http://d2ouvy59p0dg6k.cloudfront.net/downloads/maderas_de_colombia_15_version_aprobada.pdf
- Marcucci, S; Gallo, L; Zelener, N; Torales, S y Sharry, S. (2010). *Bioteología y mejoramiento vegetal II.* Aplicación de la bioteología en la mejora y conservación de especies forestales.

- Marín, L; Hernández, K; Andrade, A y Triagos, M. (2014). *Micropropagación*. Recuperado de: <http://micropropagacionunad.blogspot.com/2014/11/micropropagacion-resumen-1.html>
- Marín, J. (1997). *La micropropagación y la mejora de especies frutales*. Zaragoza, ES. Pedro Cerduna.
- Martínez, R. (2001). *Embriogénesis somática a partir de callos de Nim (Azadirachta indica)*. Ciencias Forestales y del Ambiente, 144.
- Mejía, R. (1994). *Agrobiotecnología Fundamentos y Aplicaciones, Propagación Comercial 312 especies de plantas por cultivo "in vitro"*. La Molina Perú, páginas.
- Méndez, M. (2014). *Efectos de cinco dosis de quitosano para el establecimiento in vitro del plátano dominico hartón (Musa AAB Simmonds) en la zona de Daule*.
- Mendoza, M; Tamayo, A y Pacheco, A. (2010). *Establecimiento de un protocolo para la multiplicación "in vitro" de bambú (Guadua angustifolia): fase I*.
- Montes, S; Lalama, J; Echeverría, J y Salazar, S. (2016). *Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero*. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5761558>
- Morán, E. (1996). *Micropropagación masiva de plantas por métodos biotecnológicos*. En E. Morán Luques, *Apuntes Teóricos*. Departamento de Biología de la Universidad de Oriente.
- Mora, J. (2013). *"Efectos de aplicación de fitohormonas sobre el crecimiento y rendimiento de forraje del pasto Dallis (Brachiaria decumbens), en la zona de Febres-cordero, provincia de Los Ríos"*
- Morales. (2013). *Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field*. In: *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Pp 71-94. Recuperado de http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-009-2075-0_5#page-1

- Mott, R & Amerson, H. (1981). *A tissue culture process for the clonal propagation of loblolly pine plantlets*. Technical Bulletin No. 271, North Carolina Agriculture Research Service, Raleigh, North Carolina. 14 p.
- Muñoz, Y. (2003). *Embriogénesis Somática En cedro (Cedrela odorata Linnaeus) A Partir De Cotiledones*, Tesis para obtener el Título de Bióloga. Universidad Nacional Agraria La Molina Perú – Lima.
- Mroginski, L, (2010). *Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales*. Recuperado de www.argenbio.org/adc/uploads/Libro_INTA_II/Parte_I.pdf.
- Nava, J; Jiménez, A; Sánchez, A; Arenas, M; Ventura, E y Evangelista, S. (2011). *Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de Laelia eyermaniana Rchb. f. generadas in vitro*
- Newton, R.J., K.A. Marek-Swize, M.E. Magallanes-Cedeno, N. Dong, S. Sen, and S.M. Jain. (1995). *Somatic embryogenesis in slash pine (Pinus elliottii Englem.)*. In: S.M. Jain, P.K. Gupta, and R.J. Newton (eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*. Volume III. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp: 183-195.
- Nieto, V y Valdivieso, M. (2013). *Establecimiento de un protocolo de regeneración “in vitro” y aclimatación para Fichsia pilaloensis y Fichsia hybrida para su conservación*. Tesis Ing. Biotecnología de los Recursos Naturales. Quito, EC. Universidad Politécnica Salesiana. Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. p. 24; 33.
- Murashige, T & Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Ochoa, F. (2014). *Efecto de tres dosis de ácido indolbutírico (aib) y tres concentraciones de sales, sobre el enraizamiento crecimiento y rendimiento de micro-esquejes de dos variedades de papa (Solanum tuberosum L.) en condiciones de invernadero*.
- Olmos, S; Luciani, G y Galdeano, E. (2010). *Métodos de propagación y conservación de germoplasma*.

- Oña, L. (2010). *Evaluación del efecto de brasinoesteroides en las etapas de establecimiento, multiplicación y enraizamiento in vitro de banano variedad Williams. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí.*
- Orellana, P. (1998). *Introducción a la micropropagación masiva.* Santa Clara, CU. Instituto de biotecnología de las plantas. 123 p.
- Orozco, G. (2014). *Aplicación de cuatro reguladores vegetales, en la potencialidad productiva del limón sutil en la cooperativa los Guayacanes, cantón Arenillas.*
- Ortega y Gasset, J. (1914). *Meditaciones del Quijote.* Publicaciones Residencia de Estudios, series II, Vol. 1, Madrid.
- Paliz, K. (2012). *Desarrollo de un protocolo de micropropagación de chirimoya (Annona cherimola) a partir de segmentos de nodales para la producción masiva de plantas de alto rendimiento.*
- Patiño, M. (2011). *Evaluación de Métodos de desinfección y medios de cultivo para la multiplicación “in vitro” de guarango (Caesalpinia spinosa Mol.O.Kuntz).* Tesis Ing. Forestal. Riobamba, EC. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ingeniería Forestal. p. 9-10, 13-14
- Pazmiño, G. (2015). *Determinación de la tasa de conversión de embriones somáticos del clon promisorio de piñón (Jatropha curcas L.) CP0 52.*
- Pérez, J. (2016). *Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo “in vitro” de Aloysia tryphilla.*
- Pierik, R. (1990). *Cultivo “in vitro” de las plantas superiores.* Trad. Ayerbe, L. 3era Edición. Ediciones Mundi-prensa. Madrid. España 325 p.
- Ponce, J. (1998). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología.* Instituto de Biotecnología de las Plantas.

- Pozo, Y. (2002). *Establecimiento y multiplicación in vitro en la micropropagación de la Guana (Hildegardia cubensi Ur)*. Recuperado de <http://roa.ult.edu.cu/bitstream/123456789/782/1/Tesis%20de%20Yanet%20Pozo%20ok.pdf>
- Puluc, R. (2015). *evaluación de medios de cultivo para la propagación in vitro de anturio (Anthurium andreanum); diagnóstico y servicios realizados en el departamento de biotecnología del ingenio Magdalena S.A., la democracia, escuintla, Guatemala, C.A.*
- Radice, S. (2004). *Morfogénesis “in vitro”: Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Buenos Aires, AR. INTA. p. 25-30.
- Raisman, J. (1999). *Hormonas de las plantas*. Recuperado de: <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/auxinas.htm>.
- Ramírez, M. (2010). *Efecto del sustrato y fertirriego en el crecimiento inicial de vitro-plantas de Musa sp. cv.Roatán. Naturaleza y Desarrollo 8 (2),ISSN: 2007-204X*. Recuperado de http://www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidiroaxaca.ipn.mx.revista/files/pdf/vol8num2/NatyDes_Vol-8-2-Art3.pdf
- Remache, L. (2011). *Desarrollo de una técnica de micropropagación in vitro de cedro (Cedrela montana) a partir de ápices, hojas y entrenudos*.
- Ribas, L. (2003). *Establecimiento de culturas asépticas de Aspidosperma polyneuron*. *Ciência Florestal*. 13(1): 115122.
- Rivero, M. (2015). *AGROBIOTECNOLOGÍA*. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/251288386/In-VITRO-Agrobiotecnologia>
- Rojas, S. (2004). *Propagación asexual de plantas*. Bogotá, Colombia. P 7. Consultado el 2 de abril del 2014.
- Rojas, M. (2007). *El Chanul: Suplica Protección. Revista el Mueble y la Madera*. Recuperado de www.revista-MM.com. Pág. 1- 3- Las maderas en Colombia, Edición 56,SENA, Regional Antioquia, Colombia. p. 16.

- Rojas, S. y Garcia, J.; Alarcón, M. (s.f). *Propagación asexual de plantas*. Cali, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.
- Roca, W. y Mroginski, L. (Eds.). (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Colombia: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).
- Roca, W. y Mroginski, L. (1993). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Cali, CO. CIAT. p 1039.
- Sabit. (2006). *Cultivo de tejidos en la agricultura*. Universidad Central del Ecuador Facultad de Ciencias Agrícolas Laboratorio de Biotecnología Agrícola. p. 16-17
- Sigma-Aldrich. (2012). *Phytigel* recuperado de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p8169?lang=en®ion=EC>
- Supliguicha, P y Vera, S. (2015). *Evaluación del crecimiento in vitro de plántulas de orquídea Dacyglossum edwardii en medios de cultivo simples con suplementos orgánicos frente a medio de cultivo murashige y skoog modificado como testigo*.
- Sen. (1993). *Micropropagation of conifers by organogenesis*. Plant Physiol. 12: 129-135.
- Seneviratne, P. (1996). *The problem of phenolic exudates in in vitro culture of mature Hevea brasiliensis*. Journal of Plantation Crops, 24(1), 54–62
- Tautorus, T.E., L.C. Fowke and D.I. Dunstan. (1991). *Somatic embryogenesis in conifers*. Can. J. Bot. 69: 1873-1899.
- Terán, C. (2002). *Estudio de la demografía, fenología y dispersión del Chanul Humiriastrum procerum (Little) Cuart. En el norte de la provincia de Esmeraldas*. Tesis de Ingeniero Forestal, Universidad Técnica del Norte. Ibarra – Ecuador. p 4 – 6.
- Thorpe, (1991). *Introducción al cultivo de Tejidos y Biotecnología Vegetal Resumen del Curso. Técnicas y Aplicación de Biotecnología en Especies Forestales*. Corporación Andina de Fomento. Caracas Venezuela. Pág. 91-107.

- TORO, M. (2004). *Establecimiento de protocolos para regeneración in vitro de cerezo dulce (Prunus avium) var. lambert.*
- Troncoso, A. (s.f). *En la investigación de Conservación de plantas de interés forestal.*
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN); (2006). *Libro rojo de las plantas de Colombia. Especies maderables amenazadas.* Bogotá – Colombia. p 87 – 88.
- Urcuango, P. (2014). *Evaluación de medios de cultivo para la micropropagación “in vitro” de capulí (Prunus serotina ssp capulí Cav) a partir de segmentos nodales.* Quito, Pichincha.
- Valarezo, R. (2015). *Obtención de callos embriogénicos a partir de explantes florales en 2 clones de cacao (Theobroma cacao L.)*
- Villalobos, A y Thorpe, T. (1991). *Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. Argentina.* Recuperado de: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo6.pdf>.
- Villalobos A., V.M., T.A. Thorpe and E.C. Yeung. (1983). El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. *Ciencia y Desarrollo* 51: 43-59.
- Villamar. L. (2014). *ESTANDARIZACIÓN DE LAS ETAPAS DE MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE LA GUABA (Inga insignis) ENDÉMICA DE LA PROVINCIA DE IMBABURA.*
- Villamizar, E. (2005). *Estandarización del Protocolo “in vitro” para el Establecimiento de Encenillo (Weinmannia tomentosa H.B. & K.) y de Rodamonte (Escallonia myrtilloides L.F) en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos del Jardín Botánico José Celestino Mutis.* Universidad Francisco De Paula Santander, Facultad de Ciencias Agrarias y Del Ambiente, Programa De Ingeniería De Producción Biotecnológica San José De Cúcuta. p. 7; 11-12 San José de Cúcuta, CO.
- Von Arnold S; I. Hakman. (1988). *Regulation of somatic embryo development in Picea abies by abscisic acid (ABA).* J. Plant Physiol. 132: 164-169.

Zibbu, G. & Batra, A. (2010). *Effect of adeninesulphate on organogenesis via leaf culture in an ornamental plant: thevetia peruviana (pers) schum. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 1(2), 1-9.*

CAPÍTULO VII

ANEXOS

Anexo 1

Reconocimiento del lugar de recolección del material vegetativo



Figura 9. Reconocimiento del lugar de recolección del material vegetativo.



Figura 10. Ubicación de dónde se recolectó el material vegetativo.



Figura 11. Localización de dónde se recolectó el material vegetativo.



Figura 12. Material vegetativo de hojas.

Anexo 2

Preparación del material vegetativo para el traslado



Figura 13. Aplicación de cisteína.



Figura 14. Elaboración de paquetes de material de hojas.



Figura 15. Elaboración de los paquetes que contienen las yemas-meristemas.



Figura 16. Lavado del material vegetativo.

Anexo 3

Desinfección del material vegetativo en el laboratorio



Figura 17. Lavado de hojas.



Figura 18. Lavado de yemas.



Figura 19. Lavado del material vegetativo.



Figura 20. Desinfección de yemas.

Anexo 4

Aplicación de agentes de desinfección en el material vegetativo



Figura 21. Desinfección de yemas.



Figura 22. Desinfección de yemas en NaOCl.



Figura 23. Desinfección de yemas en Kasumin.

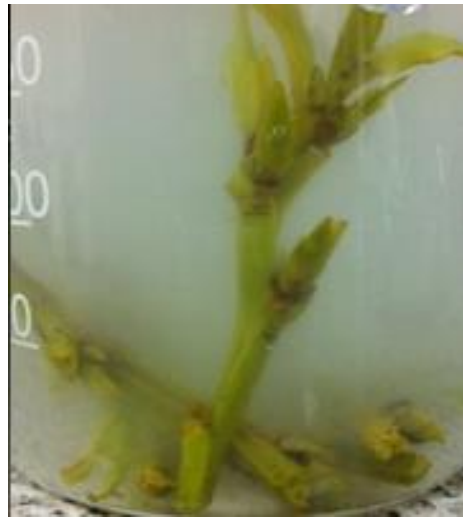


Figura 24. Desinfección de yemas en Benomilo.



Figura 25. Desinfección de meristemas más al vacío.



Figura 26. Desinfección de hojas.

Anexo 5

Preparación de los medios de cultivo



Figura 27. Soluciones madres para la elaboración de medios de cultivo.

Anexo 6

Cultivo de yemas



Figura 28. Medios de cultivo.



Figura 29. Siembra de yemas.



Figura 30. Siembra de yemas.



Figura 31. Siembra de yemas.

Anexo 7

Cultivo de meristemas



Figura 32. Siembra de meristemas.



Figura 33. Siembra de meristemas.

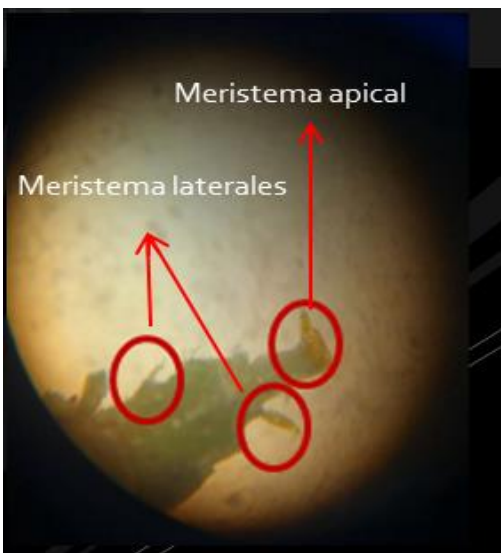


Figura 34. Extracción de meristemas laterales.

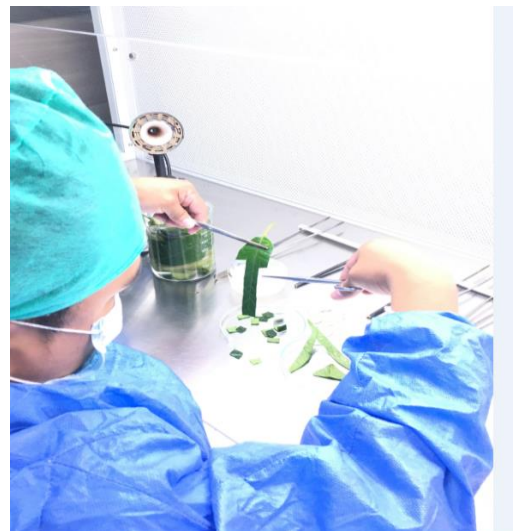


Figura 35. Siembra de hojas.

Anexo 8

Cultivo de hojas



Figura 36. Siembra de hojas.



Figura 37. Explantes de siembra de hojas.



Figura 38. Explantes de hojas en incubación.

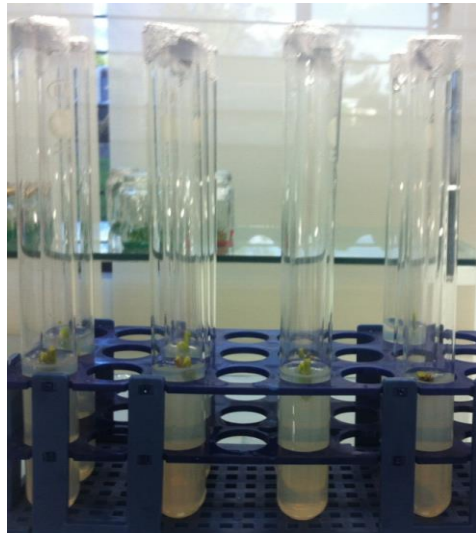


Figura 39. Material de yemas en incubación.

Anexo 9

Evaluación del material vegetativo cultivado



Figura 40. Incubación a la oscuridad.



Figura 41. Material de yema necrosada.



Figura 42. Material de meristema contaminado.



Figura 43. Material de hoja necrosada.

LISTA DE ABREVIATURAS

b.h.T: Bosque Húmedo Tropical.

DAP: Diámetro a la Altura del Pecho.

FCAE: Federación del Centro Awa del Ecuador.

GADI: Gobierno Autónomo Descentralizado de Ibarra.

GADT: Gobierno Autónomo Descentralizado de Timbiré.

ITTO: International Tropical Timber Organization.

MAE: Ministerio del Ambiente del Ecuador.

msnm: metros sobre el nivel del mar.

OCDE: Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos.

OIMT: Organización Intergubernamental que promueve la conservación, Manejo sustentable, uso y comercio de los recursos del bosque Tropical.

PNBV: Plan Nacional para el Buen Vivir.

SENPLADES: Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo.

SM: Sales y Minerales.

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

UTN: Universidad Técnica del Norte.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Abscisión: separación de una parte pequeña de un cuerpo.

Acervo: conjunto de bienes o valores morales o culturales que pertenecen a un grupo.

Adventicio: que se desarrolla de forma extraña o fuera de su lugar habitual

Autótrofa: capacidad de ciertos organismos de sintetizar todas las sustancias esenciales para su metabolismo a partir de sustancias inorgánicas, de manera que para su nutrición no necesitan de otros seres vivos

Axénico: consiste en una sola especie microbiana, proveniente de una sola célula.

Corimbo: inflorescencia formada por un eje alargado del que parten los ejes secundarios, siendo estos más largos cuanto más abajo están insertados, de forma que las flores quedan todas casi a la misma altura.

Dormancia: período en el ciclo biológico de un organismo en el que el crecimiento, desarrollo y actividad física se suspenden temporalmente.

Drupa: fruto carnoso de forma redondeada que tiene en su interior una única semilla envuelta en una capa leñosa dura o hueso.

Endógena: que se origina por causas internas.

Estípula: apéndice foliáceo, filiforme, espinoso y escamoso que tienen algunas hojas a uno y otro lado de la base del pecíolo.

Explante: tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento.

Fotoperíodo: parte del día en que un ser vivo está expuesto a la luz.

Genotipo: conjunto de los genes que existen en el núcleo celular de cada individuo.

Lampiña: órgano vegetal que no tiene pelo.

Lenticelas: estructuras pequeñas, circulares o alargadas que se forman en la corteza o superficie de los troncos, tallos y ramas de muchas especies de árboles y demás plantas.

Letargo: estado de adormecimiento e inactividad en que quedan algunos seres vivos en determinadas épocas del año en que las condiciones del medio les son desfavorables.

Micobiota: conjunto de microorganismos fúngicos en un determinado nicho.

Epifítica: que vive sobre otro, aunque sin ser parásito de él.

Microbiana: de los microbios o relacionado con ellos.

Necrosado: muerte de las células y los tejidos de una zona determinada de un organismo vivo.

Perennes: que dura siempre o mucho tiempo

Polímeros: sustancia química que resulta de un proceso de polimerización.

Primordios foliares: conjunto de células embrionarias que tiene la propiedad de dividirse a un ritmo considerable para formar los distintos órganos de la planta.

Pseudobulbo: órgano de almacenamiento que deriva de parte de un tallo entre dos nódulos de hojas.

Totipotencia: es la potencia celular máxima, que le confiere a la célula la capacidad de dirigir el desarrollo total de un organismo.

Transgénico: ser vivo que ha sido concebido artificialmente mediante ingeniería genética con mezcla de DNA de otros organismos en sus genes.

Vástagos: tallo nuevo que brota de un árbol o de una planta.

Xenobióticos: todo compuesto químico que no forme parte de la composición de los organismos vivos.