

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

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

2. **AUTOR:** Diego Fernando Panamá.

3. **DIRECTOR:** Ing. Walter Armando Palacios Cuenca

4. **COMITÉ LECTOR:** Ing. Karla Dávila. Mgs
 Dra. Cristina Echeverría.

 Ing. Eduardo Chagna. Mgs

5. **AÑO:** 2017

6. **LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN:** Laboratorio de Biotecnología de la UTN, Ibarra.

7. **BENEFICIARIOS:** Aportará conocimiento al sector forestal relacionado con micropropagación.

HOJA DE VIDA DEL INVESTIGADOR



APELLIDOS: Panamá

NOMBRES: Diego Fernando

C. CIUDADANIA: 100357215-1

TELÉFONO CONVENCIONAL: 2 914 518

TELEFONO CELULAR: 0980524809/0981766705

CORREO ELECTRÓNICO: fgdiego@live.com

DIRECCIÓN: Cotacachi, calle Gonzáles Suárez.

AÑO: 2017

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

Guía: FICAYA - UTN

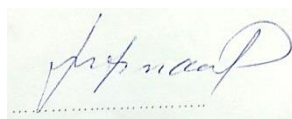
Fecha: 01 de junio del 2017

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. 11 páginas.**

DIRECTOR: Ing. Walter Armando Palacios Cuenca.

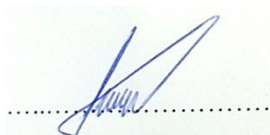
El objetivo general de la presente investigación fue: Establecer metodologías para la micropropagación de *Humiriastrum procerum* mediante el empleo de explantes. Entre los objetivos específicos se encuentran: a) determinar la mejor fuente de explante, formas de colecta y traslado; b) definir métodos de desinfección adecuados; y c) 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 Tesis



Diego Fernando Panamá

Autor

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

Autor: Diego Fernando Panamá
Director de Tesis: Ing. Walter Armando Palacios Cuenca
Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales
Carrera de Ingeniería Forestal
Universidad Técnica del Norte
Ibarra-Ecuador
fgdiego@live.com
Teléfono: 2914518/0980524809/0981766705

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*.

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*.

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.

METODOLOGÍA

Descripción del sitio

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.

1. 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.

2. Transporte del material vegetativo

Para el transporte de las yemas, meristemas y hojas, se aplicó los métodos, que se indica en la Tabla 1.

Tabla 1
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 éstos 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. 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 (Tabla 2).

Tabla 2
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	AI	~	1,5 ml/l ¹	~
	A	~	0,5 – 1,5 ml/l ¹	~
	Kin	~	0,5 – 1 – 1,5 ml/l ¹	~
	AG3	~	~	~
	BA	3 ml/l ¹	~	1 ml/l ¹
P	6 ml/l ¹	~	2 ml/l ¹	6 ml/l ¹
2-4				
D				
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

4. Esterilización

La esterilización del material de cristalería, medios de cultivo, agua destilada, pinzas, algodón, guillet, bisturís, se lo 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.

5. Tratamientos para la siembra

Para la siembra se elaboraron 20 tratamientos, (Tabla 3, 4, 5).

En la Tabla 3 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 3
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)	

En la Tabla 4 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 4
Tratamientos para los 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 (TDM)	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		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		Murashige & Skoog (1962), más reguladores de crecimiento: AIA(1,5 mg/l ¹) Kin (1,5 mg/l ¹) AG3 (1,5 mg/l ¹) (MM6)

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 las hojas.

Tabla 5
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 1 % + en NaClO al 20% durante 20 minutos. (TDH3)	SM al 50% para incubación y para medio de callo al 100% además se adicióno 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)	

6. Siembra del material vegetativo

a) Siembra de yemas

Las yemas para el ensayo se obtuvieron de una muestra vegetativa colocada en un vaso de precipitación que contenía cisteína 25 mg/l¹. Sobre una caja petri se cortó diagonalmente con el bisturí un explante de 1,5 cm de tallo 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.

b) 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.

c) Siembra de hojas

La siembra de las hojas consistió en dos fases:

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.

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).

7. 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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Forma de traslado del material vegetativo

En la Figura 1 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, el uso del contenedor delimito el resecamiento y los daños en el transporte del material (Montes *et al.*, 2016).

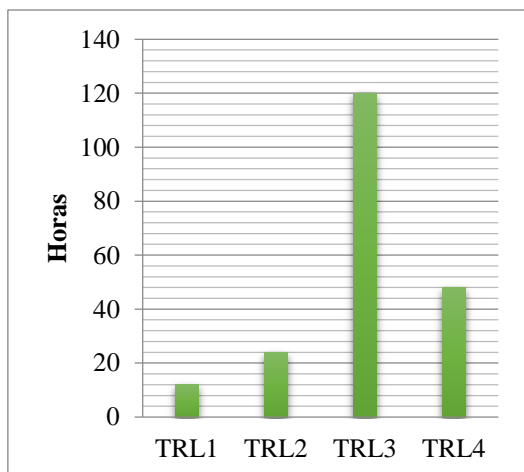


Figura 1. Tiempo de conservación del material vegetativo.

2. Contaminación de los explante

La Figura 2 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).

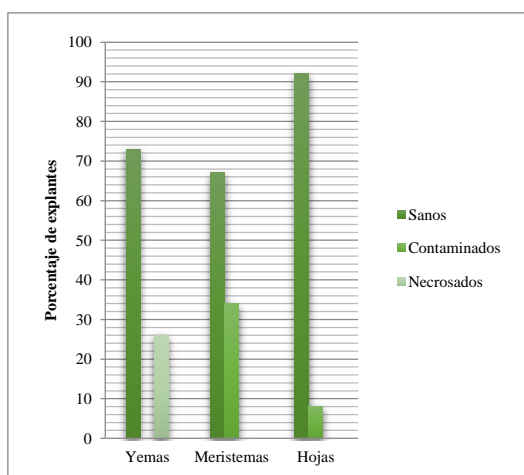


Figura 2. Calidad de los explantes.

3. Métodos de desinfección

En la Figura 3 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).

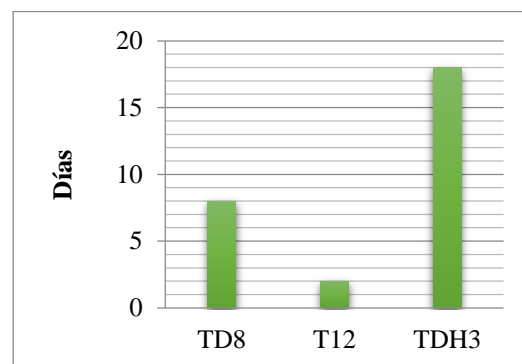


Figura 3. Inicio de contaminación según los tratamientos.

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 Estreptomycin $2g/l^{-1}$ 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. Medios de cultivo

En la Figura 4 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).

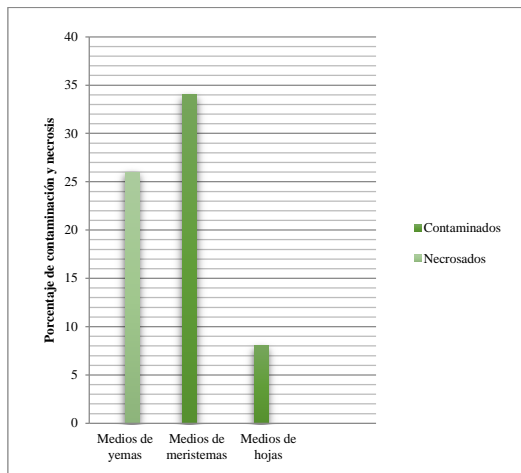


Figura 4. Comportamiento de los medios de cultivo

5. Obtención de vitroplantas

No se obtuvo vitroplantas ya que los ensayos no arrojaron resultados positivos, debido a la contaminación endógena, microbiana y necrosis del material vegetativo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

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 (25ml/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 (25mg/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.

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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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*. Recuperado de:

<http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/796/4/03%20FOR%20171%20TESIS%20Y%20ANEXOS.pdf>

- 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>.
- Castillo, A. (2008). *"Propagación de plantas por cultivo "in vitro": una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo"*.
- Fossard, R. (1999). *Notes on Tissue Culture*. Xarma Pty. Ltd., Queensland, <http://www.xarma.com.au/culture.html>
- Gamboa, J. y Abdelnour, A. (1999). *Micropropagación de melina (Gmelina arborea ROXB)*.
- Layne, J. y Sanchez, M. (2006). *Desinfección de ápices de yuca (Manihot esculenta Crantz) cv. 'Querepa Rosada' con hipoclorito de sodio*.
- Mendoza, M; Tamayo, A. y Pacheco A. (2010). *Establecimiento de un protocolo para la multiplicación "in vitro" de bambú (Guadua angustifolia): fase I*. Recuperado de: <http://tierratropical.org/wp-content/plugins/download-monitor/download.php?id=126>
- Montes, S; Lalama, J; Echeverría, M 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>
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Pérez, J. (2016). *Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo "in vitro" de Aloysia tryphilla*.
- Ribas, L. (2003). *Establecimiento de culturas asépticas de Aspidosperma polyneuron*. *Ciência Florestal.* 13(1): 115-122.
- Roca, W. y Mroginski, L. (Eds.). (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Colombia: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).
- Rojas, S. (2004). *Propagación asexual de plantas*. Bogotá, Colombia. P 7. Consultado el 2 de abril del 2014.
- Seneviratne, P. (1996). *The problem of phenolic exudates in in vitro culture of mature Hevea brasiliensis*. *Journal of Plantation Crops*, 24(1), 54-62
- 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.
- 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.
- 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.