



**UNIVERSIDAD DE PINAR DEL RÍO
“HERMANOS SAÍZ MONTES DE OCA”
FACULTAD DE FORESTAL Y AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO FORESTAL**

**CONSERVACIÓN Y PROPAGACIÓN DE ÁRBOLES SUPERIORES DE *Cordia
alliodora* (Ruiz & Pav). Oken, EN LA MICRORREGIÓN SUR DE MANABÍ**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias
Forestales**

BLANCA SOLEDAD INDACOCHEA GANCHOZO

**PINAR DEL RÍO
2013**



**UNIVERSIDAD DE PINAR DEL RÍO
“HERMANOS SAÍZ MONTES DE OCA”
FACULTAD DE FORESTAL Y AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO FORESTAL**

**CONSERVACIÓN Y PROPAGACIÓN DE ÁRBOLES SUPERIORES DE *Cordia
alliodora* (Ruiz & Pav). Oken, EN LA MICRORREGIÓN SUR DE MANABÍ**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias
Forestales**

Autora: Ing. Blanca Soledad Indacocha Ganchozo, MSc.

**Tutores: Prof. Tit., Maurilio García López, Dr.C
Prof. Tit., Rogelio Sotolongo Sospedra, Dr.C**

**PINAR DEL RÍO
2013**

AGRADECIMIENTO

Al culminar el presente trabajo investigativo, quiero dejar constancia de la imperecedera gratitud, a la prestigiosa Universidad Pinar del Río, “Hermanos Saíz Montes de Oca”, que abre sus puertas a profesionales extranjeros, como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

Gratitud a la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).

A la Universidad Estatal del Sur de Manabí, por acceder a ser becaria y apoyarme económicamente para alcanzar mis sueños y forjarme un futuro profesional competitivo.

Consigno eterna gratitud a mis tutores de tesis Dr. C. Maurilio García y Dr. C. Rogelio Sotolongo, por sus valiosos aportes académicos y científicos en la conducción del presente trabajo investigativo.

Especial reconocimiento a mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología, Johann , Christian, Otto, Azucena, Mirella y Anita, quienes a lo largo de este tiempo han puesto a prueba sus capacidades y conocimientos, en el desarrollo de esta investigación, la misma que ha finalizado llenando todas nuestras expectativas.

Agradecimiento a la Mg.Sc. Mayra Marcillo y Dra. Mariana Alarcón, por la paciencia y apoyo incondicional en la culminación del presente trabajo.

A los alumnos de los semestres de séptimo y noveno de la carrera de Ingeniería Agropecuaria del año 2012.

Son muchas las personas especiales, a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía, algunas están aquí conmigo, y otras, en mis recuerdos y mi corazón.

Sin importar donde estén, o si alguna vez, llegan a leer esta dedicatoria, quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Blanca Soledad Indacochea de Álvarez

DEDICATORIA

La concepción de este proyecto está dedicada primordialmente a Dios, por haberme guiado por el sendero del bien, brindándome su protección y fortaleza en este nuevo desafío.

A mis padres, pilares fundamentales en mi vida, cuyo ejemplo de amor, bondad, abnegación y trabajo han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar, no solo para mí, sino, para mis hijos, nietos, hermanos y familia en general.

Con especial admiración y cariño a mi amado esposo, Santiago Oldemar, compañero inseparable de cada jornada, él representó gran esfuerzo y tesón en momentos difíciles.

A mis hijos Jefferson Ricardo y Blanca Viviana, mis nietos Ricardo Oldemar, Jefferson Alejandro, Sheyla Valentina, Ricardo Abad.

Mis hijos políticos Liliana y Johann.

Gracias, porque cada uno de ustedes ha motivado mi formación académica y me han brindado apoyo en la trayectoria de mi vida.

Blanca Soledad Indacochea de Álvarez

SÍNTESIS

Se realizó un estudio ecológico en siete localidades del cantón Jipijapa, Provincia de Manabí, República del Ecuador, con la finalidad de determinar la estructura horizontal y vertical de los bosques secundarios; así, como diversidad alfa, beta y estructura por clases diamétricas de las especies forestales, se seleccionó la especie *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav). Oken, presente en todas las localidades y por su valor biológico y económico considerada como especie clave para la restauración de estos bosques, con el fin de establecer un programa de mejora forestal de *C. alliodora* se desarrollaron protocolos para la propagación vegetativa, a partir de material vegetal proveniente de la selección de fenotipos superiores de la especie. El primer protocolo, define una metodología de macropropagación por medio de estaquillas cultivadas en sustratos orgánicos con la aplicación de auxinas. El segundo protocolo, estableció una metodología de micropropagación, a partir de yemas apicales de plantas de dos años de edad (vivero) y brotes epicórmicos inducidos de los árboles seleccionados. Los mejores resultados se obtuvieron con explantes de plantas juveniles provenientes del vivero y cultivados en el medio de cultivo MS suplementado con KIN 2,5 mg/L y AIB 0,80 mg/L. En la fase de aclimatización, se logró un 89% de supervivencia.

ÍNDICE

	Página.
INTRODUCCIÓN	1
1. Introducción.....	1
2. Problema.....	5
3. Objetivo general.....	6
4. Objetivos específicos.....	6
5. Novedad científica.....	7
6. Aporte teórico.....	7
7. Aporte práctico.....	7
8. Estructura de la tesis.....	8
I.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1.1. La especie.....	9
1.1.1. Características botánicas.....	9
1.1.2. Ecología y biogeografía.....	11
1.1.3. Situación actual de la especie.....	12
1.1.4. Importancia y utilización de <i>Cordia alliodora</i>	12
1.1.5. Conservación de biodiversidad y manejo forestal sostenible, participativo.....	14
1.1.6. Importancia de la conservación de la biodiversidad.....	16
1.2. Diversidad biológica.....	18
1.3. Conservación.....	20
1.4. La aplicación de la biotecnología a los programas de mejoramiento, producción y conservación forestal.....	22
1.5. Biotecnología vegetal.....	22
1.5.1. Medios de cultivo <i>in vitro</i>	23
1.5.2. Macroelementos.....	24
1.5.3. Propagación vegetativa.....	24
1.5.4. Propagación vegetativa <i>ex vitro</i> (por estacas).....	26
1.5.5. Propagación vegetativa <i>in vitro</i>	29

II. MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1. Área de estudio.....	35
2.1.1. Ubicación geográfica del cantón Jipijapa.....	35
2.2. Caracterización de las áreas asociadas a <i>Cordia alliodora</i>	36
2.2.1. Tamaño de muestra.....	36
2.2.2. Variables.....	37
2.2.3. Estructura horizontal.....	38
2.2.4. Estructura vertical.....	38
2.2.5. Diversidad alfa (α).....	39
2.3. Macropropagación y micropropagación de <i>Cordia alliodora</i>	40
2.3.1. Propagación <i>ex vitro</i>	40
2.3.1.1. Obtención de explantes.....	40
2.3.1.2. Inducción del enraizamiento.....	41
2.3.2. Propagación <i>in vitro</i>	42
2.3.2.1. Obtención de explantes.....	42
2.3.2.2. Establecimiento del cultivo aséptico.....	43
2.3.2.3. Multiplicación.....	45
2.3.2.4. Enraizamiento.....	46
2.3.2.5. Adaptación y Endurecimiento.....	46
2.4. Establecimiento de la plantación.....	47
2.4.1. Preparación del terreno.....	48
2.4.2. Plantación.....	48
 III.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 49
Estructura horizontal.....	49
3.1. Estructura de las poblaciones de <i>C. alliodora</i> por localidad.....	49
3.2. Estructura diamétrica de <i>C. alliodora</i>	50
3.3. Estructura vertical.....	50
3.3.1. Diversidad.....	50
3.4. Propagación <i>ex vitro</i>	59
3.4.1. Inducción de enraizamiento.....	59

3.5. Propagación <i>in vitro</i>	64
3.5.1. Desinfección y establecimiento del material vegetal.....	64
3.5.2. Inducción y multiplicación.....	69
3.5.3. Enraizamiento.....	75
3.5.4. Adaptación y endurecimiento de vitroplantas.....	77
3.6. Establecimiento de la población de mejora.....	82
3.6.1. Comportamiento de las miniestacas y de vitroplantas en plantación.....	82
CONCLUSIONES	89
RECOMENDACIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICES DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ubicación geográfica del cantón Jipijapa.....	36
Figura 2. Marcha analítica para el establecimiento de la propagación de <i>Cordia alliodora</i>	41
Figura 3. Curvas de abundancia de especies por localidades. El ajuste (líneas discontinuas) es en base a la función logarítmica (<i>Los datos de abundancia están transformados a escala logarítmica (Ln).</i>).....	54
Figura 4. Dendrograma resultado de la clasificación de los sistemas agroforestales de las localidades objeto de estudio.....	56
Figura 5. A) Miniestacas de dos meses con aparecimiento de brotes y raíces: B) Plantas AIB de 1000 mg/L C) Plantas con AIB de 500,mg/L.	60
Figura 6. Propagación vegetativa de estaquillas de <i>Cordia alliodora</i>	64
Figura 7. A)Desinfección de explantes en la zaranda orbital. B) Flujo laminar desinfectado y Explantes en incubacion.....	68
Figura 8. Brotes epicórmicos de clones seleccionados y yemas apicales y axilares de plantas de dos meses en la fase de multiplicación.....	69
Figura 9. Brotes epicórmicos, yemas apicales y axilares de plantas de dos meses en la fase de enraizamientos.....	75
Figura 10. Adaptación y endurecimiento de vitroplantas.....	77
Figura 11. Plantación de plantas de macropropagación y micropropagación en el campo definitivo.....	83
Figura 12. Metodología para la propagación <i>in vitro</i> de <i>Cordia alliodora</i> ..	88

ÍNDICES DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Localidades y tipos de bosques donde se llevó a cabo el estudio.....	37
Tabla 2. Variantes de desinfección de los explantes empleados.....	44
Tabla 3. Promedios de diámetro y altura de la estructura de las poblaciones de <i>C. alliodora</i> por localidad.....	49
Tabla 4. Distribución por clases diamétricas de <i>Cordia alliodora</i>	50
Tabla 5. Números de especies e individuos por localidad.....	51
Tabla 6. Listado de las especies forestales por localidad junto al índice de valor de importancia (IVIE).....	52
Tabla 7. Diversidad de especies por localidad.....	53
Tabla 8. Regeneración Natural de <i>Cordia alliodora</i>	57
Tabla 9. Resultados del efecto de AIB y ANA en diferentes concentraciones sobre el comportamiento del enraizamiento de estaquillas de <i>C. alliodora</i>	61
Tabla 10. Resultados de la desinfección en explantes de <i>C.alliodora</i>	66
Tabla 11. Resultados de la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>C. allidora</i> en los diferentes balances hormonales.....	69
Tabla 12. Resultado de las variables morfológicas en plantación.....	82

ANEXOS

Fotos: Fase de micropropagación.....	(Anexo A)
Fotos: Aclimatación vitroplantas.....	(Anexo B)
Fotos: Fase macropropagación.....	(Anexo C)
Fotos: Plantación de plantas: macropropagación y micropropagación en el campo definitivo etapa inicial.....	(Anexo D)

INTRODUCCIÓN

La *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken laurel, es un árbol maderable de la familia Boraginaceae, que ha sido sobreexplotada por el valor comercial de la madera y por actividades de conversión del uso de la tierra para el desarrollo de sistemas agroforestales, esta especie ha sido evaluada e identificada como especie clave para el mantenimiento de la integralidad ecológica Indacochea, (2011). En la actualidad la especie está reconocida entre las 10 especies prioritarias para la reforestación, protección, conservación y creación de plantaciones comerciales (Grijalva *et al.*, 2012).

Las plantaciones forestales tienen una función creciente en el abastecimiento de madera para la industria forestal mundial, el aporte de las innovaciones en genética y biotecnología permite obtener árboles de buen crecimiento y características deseadas; entre las especies con potencialidad de uso comercial, rápido crecimiento, calidad y uso de la madera es *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken (Laurel). La producción de material seleccionado de especies forestales requiere, por una parte, un mayor conocimiento de la biología reproductiva; así, como de los condicionamientos fisiológicos que influyen en la capacidad morfogenética en relación con la juvenilidad de los materiales. Así mismo, no es frecuente encontrar en la naturaleza estados juveniles en árboles adultos como fuente de material para propagación, aunque para algunas especies puede ser resuelto, a través de la obtención de rebrotes de tocón, brotes epicórmicos, podas a ras de suelo, enraizamiento seriado de

estacas, injertos y etiolación. Ante este panorama la biotecnología se presenta como una alternativa para la producción y mejoramiento de especies forestales.

Baquero *et al.*, (2005), manifiesta que en la silvicultura mundial, la aplicación de técnicas de micro propagación en especies forestales de uso maderable ha constituido una alternativa muy útil para aumentar el número de plantas requeridas para el establecimiento de plantaciones en los programas de propagación masiva, forestación, reforestación, protección y aprovechamiento. Así mismo, para aquellas en que su comportamiento es más recalcitrante, el desarrollo de sistemas de propagación vegetativa mediante micro propagación y embriogénesis somática *in vitro*, permite la obtención de clones de genotipos seleccionados. Bajo estas condiciones, es posible producir material vegetal en cualquier época del año y entregarlo de acuerdo con el programa de siembra establecido por el reforestador.

Ecuadorforestal (2011), expresa que el laurel es una especie forestal muy popular en el Ecuador, debido a su alta calidad, a la dureza de su madera y, a su rápido crecimiento, teniendo gran demanda para la industria, la ebanistería y la agroforestería.

Debido a sus propiedades estéticas como: color, brillo, y veteado; y por sus propiedades de fácil trabajabilidad, es ampliamente demandada por distintas industrias, por empresas de muebles, para la elaboración de puertas, ventanas, artesanías y para la ebanistería fina. La importancia de la propagación vegetativa,

es la reproducción de características fenotípicas deseadas y adicionalmente, constituyen una ventaja en un ambiente más o menos constante, al cual la especie ya está bien adaptada. Entre las ventajas que ofrece esta técnica está la de brindar ganancias genéticas rápidas, adecuadas para programas de mejoramiento forestal.

La fragmentación de los hábitats, deforestación y conversión a sistemas agroforestales han llevado a la reducción del número de individuos de la especie, si, a esto, se le suma que la especie es estrictamente alógama con mecanismos de heteromorfia a la variación estilar Boshier, (2010), junto con la presencia de un fuerte mecanismo de incompatibilidad Boshier, (1995) fuerzan a la polinización y la fertilización cruzada, lo cual hace que el tamaño mínimo viable necesario para la especie sea aún mayor, determinado su sensibilidad a sufrir por la endogamia Frankham *et al.*, (2007). La especie se reproduce naturalmente vía semilla con tasas de germinación regularmente bajas, menores del 30% Hartmann y Kester, (1996). Fundamentalmente por la pérdida de su viabilidad entre los 2 a 3 meses, y con mucha irregularidad las producciones de semilla. De manera, tal que, no se cuenta con una fuente de material estable y en cierta medida superior, ya sea por el escaso desarrollo de fuentes de semillas; así, como por la inexistencia de metodologías para la micro propagación y/o macro propagación, que junto a su propagación, impulsaren la conservación de la especie.

Los países tropicales contienen más del 50% de las especies forestales del mundo Vilanova, (2006). El Ecuador alberga más del 46 % de la diversidad de árboles de los bosques secos y tropicales (Grijalva *et al.*, 2012).

De acuerdo con Conabio, (2010), en décadas pasadas se establecieron plantaciones forestales en Centroamérica, América del Sur y Nigeria. Ahora la especie ha comenzado a ser importante en los programas de reforestación y conservación de varios países como: Brasil, Congo, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Costa de Marfil, Puerto Rico, Sierra Leona, Trinidad, Uganda y Venezuela. La *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken se ha empleado en plantaciones permanentes junto con *Coffea arabica* L (café), *Theobroma cacao* L (cacao), *Cocus nucifera* L (coco), *Psidium guajava*. L. (guayaba), *Coccoloba guanacastensis* (poró) y *Cedrela odorata* L (cedro). En temporales con *Musa paradisiaca* L (plátano), *Oryza sativa*. L (arroz) y *Manihot esculenta* Crantz (yuca). No existen sistemas silviculturales a gran escala para el manejo de las masas naturales de árboles de *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken (Laurel).

Considerando que el sistema agroforestal cafetalero de Jipijapa, ha sido pobremente descrito en su diversidad y en su estructura, es preciso conocer este tipo de bosques para contribuir a la información acerca de la riqueza de especies en estos tipos de vegetación, para una mejor toma de decisiones en la realización de actividades de manejo y conservación, así como la identificación de especies claves que permitan el desarrollo de los sistemas y faciliten la reconversión al bosque original.

La investigación aborda temas relacionados a la ecología y la propagación *in vitro* de *Cordia alliodora*, que se distribuye naturalmente en bosques secos, bosques húmedos tropicales y subhúmedos tropicales, no solo acerca de sus características estructurales del bosque; sino, también elabora metodologías para

la obtención de plántulas y que ofrecerían una ventaja para los programas de mejoramiento forestal de *Cordia alliodora* y de reforestación en zonas deforestadas.

A partir de un soporte documental se trazan pautas para implementar un método de conservación, que permita, además disponer de material para crear plantaciones comerciales de la especie.

En este sentido, se establece metodologías de propagación vegetativa *in vitro* para la especie que representa un avance para el diseño de pautas para la conservación de la especie, que unida a la propagación vegetativa *ex vitro* permiten establecer una plantación de mejora por el método de conservación *quasi in situ*, lo que proporcionará material vegetal selecto para futuros programas de mejora forestal y plantaciones comerciales de alta calidad, de la especie.

PROBLEMA

¿Cómo cambia la estructura del bosque en los sistemas agroforestales del cantón Jipijapa, como consecuencia de la fragmentación de los hábitats, deforestación, baja tasa de germinación, pérdida de viabilidad de sus semillas?.

Por lo anteriormente, expuesto se propone la siguiente hipótesis: Los métodos utilizados hasta el momento para la reproducción no han podido dar respuesta a las necesidades de plantas para llevar a cabo la recuperación de *C. alliodora*, por lo que es de esperar que la inducción de brotes de yemas apicales y brotes epicórmicos *in vitro*, a partir de segmentos nodales tomados de plantas de dos meses de edad, provenientes de vivero y de brotes epicórmicos tomados de árboles plus seleccionados del campo permitirá la regeneración de plantas

completas, nueva vía para la reproducción de la especie, proporcionando plantas para la reconversión al bosque original y el establecimiento de plantaciones comerciales.

Teniendo en cuenta la hipótesis, el trabajo se propone el siguiente objetivo general siguiente:

Objetivo general

Establecer una metodología para la propagación vegetativa de la especie, a través de la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* y *ex vitro*.

Objetivos específicos:

- Caracterizar la composición y estructura de las formaciones de la especie de *Cordia alliodora*.
- Establecer metodología para la multiplicación *in vitro* y *ex vitro*, partiendo de árboles plus seleccionados en el campo.
- Evaluar los parámetros morfológicos de la plantación de mejora, a partir de material vegetal propagado vegetativamente de la especie *Cordia alliodora*.

La importancia de este resultado radica en que:

Permitirá la reproducción de *Cordia alliodora* y, por tanto, su protección y recuperación; además, crea las bases para la preservación de programas de mejora forestal y plantaciones comerciales de alta calidad de la especie. Así

mismo, permitirá al contar con un número suficiente de plantas, con la finalidad de producir madera para las industrias de muebles y construcción.

La **novedad científica** de este trabajo radica en el estudio detallado de la estructura de las áreas donde se distribuye *Cordia alliodora*, la evaluación de la estructura de las poblaciones de la especie, se establece una metodología para la micropropagación y macropropagación, a partir de yemas apicales y brotes epicórmicos de árboles plus superiores directamente de campo.

Creación de una población de mejora de la especie que contribuiría a la implementación del método de conservación *quasi in situ* de *Cordia alliodora* en el cantón Jipijapa para un programa de mejora forestal.

Aporte teórico

Se caracterizan las áreas donde se desarrolla la especie *Cordia alliodora* sobre la base de elementos de la estructura del bosque y poblacional.

Se diseñan los protocolos para la propagación vegetativa de la especie.

Información actualizada del recurso genético *C. alliodora* en los agro ecosistemas de Jipijapa.

Aporte práctico

Se establece una población de mejora, a partir de la propagación vegetativa, tanto *in vitro* como *ex vitro* que sirva de fuente de material selecto y viable para la conservación y el fomento de la especie *C. alliodora*.

Estructura de la tesis:

La tesis está organizada en cuatro capítulos que comprenden: Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, además se incluyen las Conclusiones y Recomendaciones y Bibliografía.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. La especie

Nombre científico: *Cordia alliodora* (Ruiz y Pavón) Oken, citado por Torres, (1995). Laurel (Colombia, Ecuador, Panamá), Palo Santo (Perú), *dze-uí* (Costa Rica), Pardillo (Venezuela).

El género *Cordia alliodora* que incluye alrededor de 200 especies que van desde arbustos a árboles de gran tamaño, se encuentra en América Latina desde Misiones (Argentina) (latitud 25° Sur) hasta Sinaloa (México) (latitud 25° Norte), el cual está incluido en la familia *Lauraceae*. (Torres, 1995).

1.1.1 Características botánicas

Árbol

El árbol alcanza hasta 25 m. de altura y 90 cm. de diámetro, presenta un fuste recto, raíces tablares poca o mediamente desarrolladas. La copa es angosta e irregular, con ramas ascendentes, verticiladas en la parte superior, la superficie del tronco es finamente fisurada, por sectores tienen apariencia parda oscura muy rápidamente después de exponerla al aire (FAO *et al.*, 1998).

Hojas

Simples, alternas; de lámina elíptica u oblonga, ápice agudo, base cuneiforme; de 6 a 15 cm de largo y 2,5 a 4,5 cm de ancho, verde amarillento el haz, y verde más

claro el envés; con nervadura pinnada; con peciolo pubescentes de 1 a 2 cm de largo (FAO *et al.*, 1998).



Flores

Las flores son hermafroditas; blancas en panículas axilares o terminales de 5 – 15 cm de largo; sésiles o cortamente pediciladas (Torres, 1995).

Inflorescencias en panículas, grandes (10-30 cm de ancho), muy abundante y tangente de color blanco, ubicada en el ápice de las ramas; con flores de 1 cm. Aproximadamente, con corola gamopétala, campanulada; al secarse se tornan del color del tabaco. La floración se presenta en los meses de junio hasta agosto (Torres, 1995).



1.1.2. Ecología y biogeografía

El pardillo se distribuye desde México hasta Bolivia. También se encuentra en las Antillas e introducido en Florida USA.

Su rango altitudinal va desde el nivel del mar hasta los 1500 msnm. Es una especie abundante en la vegetación secundaria en selvas perennefolias FAO *et al.*, (1998). En el Ecuador es muy frecuente el laurel en las regiones del Litoral o Costa y Oriental o Amazonía; en esta última, la madera es más densa y oscura (Torres, 1995).

Ritcher y Dallwitz, (2000), reconocen que *C. Alliodora* es una especie de rápido crecimiento con respecto a otras especies forestales y se adapta a una amplia variedad de suelos. No obstante, no se cuenta con suficiente material de siembra de buena calidad para satisfacer estas necesidades y suplir la demanda media anual (BIRF *et al.*, 1999).

La especie se reproduce naturalmente vía semilla con tasas de germinación regularmente bajas, menores del 30% Hartmann y Kester, (1996) fundamentalmente por la pérdida de su viabilidad entre los 2 a 3 meses, y con mucha irregularidad por las producciones de semilla. De tal manera, que hoy no se cuenta con una fuente de material estable y en cierta medida superior, ya sea por el escaso desarrollo de fuentes de semillas; así, como por la inexistencia de metodologías para la micropropagación y/o macropropagación, que junto a su propagación, impulsaren la conservación de la especie.

1.1.3 Situación actual de la especie

La sobre-explotación o aprovechamiento prematuro, sin un ritmo adecuado de reposición, ha generado escasez de esta especie, lo que ha determinado la necesidad urgente de elaborar metodología para su producción masiva.

La explotación forestal no sostenible, la tala ilegal de madera y un limitado control forestal técnico y sistemático, constituyen las mayores amenazas que enfrentan los bosques nativos del Ecuador, Entre las familias con diez o más especies amenazadas o extinguidas Bignoniácea ocupa el primer lugar MAE, (2010), *C. alliodora* está considerada como una especie amenazada, debido fundamentalmente a la alteración, destrucción y fragmentación de sus hábitats por la actividad humana.

1.1.4. Importancia y utilización de *Cordia alliodora*

La *Cordia alliodora* (Laurel), es frecuentemente cultivado por su madera y también como una planta ornamental por sus flores abundantes, que son muy

visitadas por la abejas. La especie tiene potencial melífero. La madera se emplea en la ebanistería, durmientes, construcción, vehículos, botes, remos, chapas, objetos torneados e instrumentos FAO *et al.*, (1998). Es muy cotizada en el mercado local, debido a su nobleza y propiedades tecnológicas favorables y facilidad para trabajar Torres, (1995).

C. alliodora está entre las especies más recomendadas para la zona del bosque muy húmedo premontano en Ecuador Grijalva *et al.*, (2012), por su parte Garibaldi, (2008) la reporta para el bosque secundario temprano, aunque con un índice de valor de importancia muy bajo.

La recuperación de la estructura de estos bosques, de su riqueza, de su diversidad y un manejo adecuado de esta especie en los agroecosistemas cafetaleros debe estar dirigido a mantener la formación boscosa como entidad, evitando la degradación total de estos sitios y; además, promover la presencia de especies de valor económico en éstos. Por lo tanto, cualquier actividad de conservación y fomento de esta especie, resulta crucial en la zona (norte-litoral) de Manabí. Al respecto, muchos autores consideran que dichas acciones deben concentrarse en poblaciones naturalmente “viables”; Ruiz y Fandiño, (2009) y que se garanticen sobre los principios de una base genética local (Kjær *et al.*, 2004).

Desde hace muchos años se viene señalando la importancia creciente de la vegetación secundaria en los trópicos americanos Silva *et al.*, (2010) y la tendencia de las especies de rápido crecimiento y baja densidad de madera que prosperan en los bosques de segundo crecimiento para constituirse en el recurso

maderable del futuro Vargas, (2008). Los bosques secundarios son también de considerable importancia ecológica, en términos de crecimiento forestal, acumulación de biomasa, beneficios hidrológicos y de la biodiversidad (Sardinero, 2000).

1.1.5. Conservación de biodiversidad y manejo forestal sostenible, participativo.

Debido al fuerte vínculo entre conservación de la diversidad biológica y desarrollo sostenible, las actividades económicas no sostenibles constituyen la causa principal de la degradación ambiental. Los bosques degradados pueden cumplir una variedad de funciones sociales, productivas y de protección que podrían ser beneficiosas, tanto, para la seguridad alimentaria de la población como para el medioambiente Scherr, (2003). La degradación forestal se ha definido como la reducción de la capacidad de un bosque para producir bienes y servicios (OIMT, 2002).

La estructura de la vegetación, la diversidad de especies y los procesos de los ecosistemas, han sido identificados como componentes esenciales para la persistencia a largo plazo de los sistemas naturales Ruíz y Aide, (2005). El conocimiento de la estructura de la vegetación nos proporciona información sobre aquellas especies más susceptibles a los disturbios en una región determinada Ramírez *et al.*, (2001) y nos ayuda a predecir patrones sucesionales (Jones et al., 2004).

La restauración ecológica de áreas disturbadas es un tema de mucha actualidad y al mismo tiempo uno de los más complejos de abordar, debido a vacíos en el conocimiento sobre las poblaciones, comunidades, ecosistemas y paisajes naturales, sin dejar de considerar otros componentes representados en lo social, político y económico, en la medida que constituyen fuerzas responsables de alteración y profunda transformación de los ecosistemas (Barrera y Valdés, 2007).

Para monitorear el efecto de los cambios en el ambiente, es necesario contar con información de la diversidad biológica en comunidades naturales y modificadas (diversidad alfa), y también de la tasa de cambio en la biodiversidad entre distintas comunidades (diversidad beta), para conocer su contribución al nivel regional (diversidad gamma), y poder diseñar estrategias de conservación y llevar a cabo, acciones concretas a escala local (Moreno, 2001).

El estudio de la composición, estructura y dinámica de un bosque representa un paso inicial para su conocimiento, pues asociado a ese conocimiento puede ser construida una base teórica que sustente la conservación de los recursos genéticos, la conservación de áreas similares y la recuperación de éstas, siendo el punto de partida para la adecuación de criterios y métodos de conservación y recuperación (Pinto *et al.*, 2009).

La estructura, composición y diversidad arbórea son características, a través de las cuales, se puede conocer el estado, la distribución actual, así como

obtener información base para entender relaciones y modelar cambios futuros de tipos de bosques a escala de paisaje, con el fin de obtener herramientas sobre su conservación y manejo (Matteucci y Colma, 1982; Finegan *et al.*, 2001; Louman *et al.*, 2001 y Moreno, 2001).

La diversidad beta es clave para entender que gradientes ambientales controlan la diversidad en las comunidades ecológicas Moreno, (2001) y desde el punto de vista de la conservación es tan importante como la diversidad alfa, porque explica cómo se puede influenciar la diversidad a gran escala (Condit *et al.*, 2002).

1.1.6. Importancia de la conservación de la biodiversidad

La conservación de la diversidad biológica forestal, incluidos los recursos genéticos forestales, es fundamental para sostener los valores productivos de los bosques, para mantener el estado sanitario y la vitalidad de los ecosistemas forestales, y de este modo, mantener sus funciones protectoras y ambientales.

La mayor amenaza para los bosques y la diversidad que contienen, es su transformación para otros usos de las tierras. La presión creciente de las poblaciones humanas y sus aspiraciones por un mejor nivel de vida, sin la debida preocupación por la sostenibilidad de los recursos, que constituyen la base de tales desarrollos, aumentan la preocupación a este respecto. Aunque es inevitable que se produzcan en el futuro cambios en el uso de las tierras, tales cambios deben programarse para ayudar a conseguir objetivos complementarios. Esto,

puede realizarse incluyendo las preocupaciones sobre la conservación como componente importante de la planificación del territorio y de las estrategias de ordenación (Wolcox, 1990).

Las áreas protegidas constituyen una parte notable de las estrategias de conservación. Sin embargo, éstas áreas son insuficientes para asegurar por sí solas la conservación de los árboles y otras especies forestales e incluso, aunque se alcanzase el objetivo mundial expresado a menudo del 10 al 12% de áreas conservadas, situadas adecuadamente y ordenadas de forma apropiada, lo que por desgracia no suele ser el caso en el momento actual, se ha estimado que en las próximas décadas sólo podría conservarse en tales áreas, alrededor del 50% de las especies de las zonas tropicales.

La mayoría de las especies amenazadas, sobreviven en poblaciones muy pequeñas y es posible que un número considerable de éstas perduren en la actualidad, debido a la alta longevidad que presentan, puesto que la reproducción o reposición de los individuos que mueren es muy escasa.

Bonet, (1996) plantea que cuando el tamaño de una población se reduce a niveles muy bajos, desaparece gran parte de la diversidad genética, y puede que no sea capaz de sobrevivir y desaparezca a las pocas generaciones como resultado de diversos accidentes genéticos como la acción de genes deletéreos que se manifiestan como resultado de la endogamia producida.

En muchas especies, los individuos que integran una población cuyos efectivos han disminuido mucho experimentan una reducción en su viabilidad y éxito reproductivo por motivos que nada tienen que ver con su constitución genética, y puede llegar a existir un umbral de densidad por debajo del cual la población no puede llegar a recuperarse, este efecto denominado “ efecto Allee “ puede ser debido a que los organismos modifican física o químicamente su medio, o a que su éxito de emparejamiento sea dependiente de la densidad Herrera, (1993).

1.2. Diversidad biológica

El concepto de diversidad biológica se refiere a la variabilidad de especies nativas, su variabilidad genética y los ecosistemas en donde se relacionan y evolucionan. Las mediciones sobre la diversidad de especies, en un contexto ecológico, contribuyen al conocimiento de la estructura necesaria para la resistencia de los ecosistemas (Nichols y Nichols, 2003).

El término biodiversidad comprende diferentes escalas biológicas: desde la variabilidad en el contenido genético de los individuos y las poblaciones, el conjunto de especies que integran grupos funcionales y comunidades completas, hasta el conjunto de comunidades Harper y Hawksworth, (1994). La importancia de su estudio radica principalmente en constituir un eje de la ecología y la genética, ya que las medidas de diversidad se consideran indicadores del buen funcionamiento de los ecosistemas (Frankham, 2002; Magurran, 1989).

Un indicador de biodiversidad puede ser una especie, un componente estructural, un proceso o cualquier otro elemento de los sistemas ecológicos que puede

ayudar a evaluar los objetivos de la gestión Onaíndia, (2002). La pérdida de biodiversidad, a cualquier escala, como consecuencia de las actividades humanas, ya sea de manera directa (sobre explotación) o indirecta (alteración del hábitat), es uno de los problemas ambientales que han suscitado mayor interés mundial y éstos pueden ser irreversibles o persistentes por períodos prolongados Foster, (1993). Algunos de los cambios pueden percibirse como positivos, ya que favorecen a especies utilizadas como recursos, o crean condiciones favorables para los seres humanos. Sin embargo en otros casos, los cambios introducidos por causas humanas directas o indirectas, pueden afectar la calidad ambiental, así como las opciones futuras de manejo Detwyler, (1971).

Los dramáticos cambios provocados por la conversión de bosques a tierras agrícolas sobre la diversidad biológica en los últimos 50 años podrían colocar a muchas especies en estado de amenaza crítica (Laurance y Cochrane, 2001; Laurance, 2006; Pérez y Laurance, 2006). Sumado a ello, los efectos globales de los cambios climáticos podrían poner en peligro a las especies con incapacidad de emigrar, a través de paisajes “hostiles” para alcanzar nuevas áreas con clima y hábitats más apropiados Laurance, (2006).

La estructura de los ecosistemas, han sido identificados como componentes esenciales para la persistencia a largo plazo de los sistemas naturales (Ruíz *et al.*, 2005).

La complejidad estructural puede ser usada como una expresión de la riqueza de especies, porque genera diferentes condiciones ecológicas que favorecen a otras especies Osorio, (2009). El efecto de la estructura del bosque sobre la diversidad

es complejo y difícil de generalizar, lo que reafirma la importancia de estos estudios, tanto, a nivel local como regional.

1.3. Conservación

La conservación de especies forestales es la gestión de la utilización de éstas por el ser humano, de tal suerte, que produzcan el mayor y sostenido beneficio para las generaciones actuales, pero que mantenga en su potencialidad para satisfacer las necesidades y las aspiraciones de las generaciones futuras Kjær *et al.*, (2004). Ésta, debe entenderse en un sentido amplio y moderno que implica la utilización racional y sostenida de los recursos naturales a largo plazo. La preocupación principal de la conservación debe estar en los procesos evolutivos, que fomentan y mantienen la diversidad genética, y no empeñarse en preservar la actual distribución de la variación como un fin en sí mismo (Vargas *et al.*, 2008; Frankham *et al.*, 2007).

La conservación puede realizarse en dos modalidades: *in situ* y *ex situ*, estas dos modalidades son complementarias y permiten garantizar la conservación del patrimonio genético de las especies y sus poblaciones (Pezoa, 2001; Kjær, *et al.*, 2004) sin embargo, ambas tienen sus limitaciones, pues muchas veces no permiten el mantenimiento de la diversidad genética neutral y adaptativa de una especie. Las decisiones sobre cuales estrategias y métodos de conservación utilizar en determinada especie no solo dependerán de sus características biológicas, los modelos de variación genética y estado de conservación, pero

también en cuánto se conoce de su silvicultura y su manejo (Vargas. 2008; Volis y Blecher, 2010).

El método *quasi in situ* concibe una nueva estrategia para lograr un puente entre la *ex situ-in situ* y está dirigida fundamentalmente para especies forestales amenazadas, aquellas con una presión por aprovechamiento que reducen continuamente el tamaño y número de sus poblaciones o que se pretenda llevar a cabo un programa de mejoramiento forestal. En este método las colecciones *ex situ* se mantienen en ambientes de forma natural o seminatural, donde se preserva, tanto, la diversidad genética neutral y adaptativa como parte complementaria de la estrategia de conservación *ex situ – in situ* Volis y Blecher, (2010). El método consiste en cinco pasos Volis y Blecher, (2010): (1) estudio y análisis de la distribución de la especie; (2) muestreo de poblaciones de acuerdo con un diseño de estructura ecológica espacial; (3) plantar en sitios apropiados (por ejemplo, en sitios con hábitat natural o seminatural y en medio ambiente similar) y mantener las colecciones; (4) estudiar las características históricas de la vida y los efectos bióticos y abióticos en la demografía de la población; y (5) reintroducir (o trasladar) plantas, preferentemente utilizando semillas de colecciones vivientes y monitorear el éxito de su reintroducción.

Para que un método, sea eficiente se requiere de dos elementos de conservación: de un tamaño de la población mínima viable y área dinámica mínima, relacionado con la mayor área de hábitat protegido y, por tanto, se necesita encontrar vías de reproducción vegetativas efectivas para el establecimiento de las colecciones (Heywood y Dulloo, 2005).

1.4. La aplicación de la biotecnología a los programas de mejoramiento, producción y conservación forestal

En su sentido más amplio, la biotecnología es el manejo de los sistemas biológicos para el beneficio de la humanidad e incluye los métodos convencionales de fitogenética y cultivo. Además, la “nueva” biotecnología, ofrece una serie impresionante de técnicas para superar las limitaciones biológicas convencionales debidas a las grandes dimensiones de los árboles y a los procesos sexuales retardados, comunes a las especies leñosas. Estas técnicas incluyen: cultivo de células y micropropagación, selección genotípica *in vitro*, conservación *in vitro* y un gran número de nuevas tecnologías en el campo de la genética molecular (Sánchez et al., 1999).

El cultivo *in vitro*, se ha utilizado para la propagación de especies amenazadas, con el fin de aumentar rápidamente el número de individuos, superar problemas de fertilidad y de biología reproductiva, así como proporcionar material para su reintroducción en la naturaleza y contribuir a la conservación de germoplasma a mediano y largo plazo.

1.5. Biotecnología vegetal.

Según CIAT. (1991), el cultivo de tejidos vegetales, es una técnica que consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario, además

adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana.

Botti, C. (1992), manifiesta que la técnica de cultivo de tejidos, se basa en tres objetivos fundamentales:

- a. La parte de la planta o explante, sea órgano, tejido o célula, debe aislarse del resto de la planta. Esto, efectivamente altera las interacciones intercelulares de los tejidos o de órganos que pueden estar ocurriendo en la planta intacta.
- b. El explante debe ser mantenido en un medio definido y controlado. Las características genéticas fisiológicas y bioquímicas del tejido, la composición química del medio y las condiciones físicas del ambiente, van a determinar el potencial de respuesta del explante.
- c. Deben mantenerse asepsia. La mayoría de los medio de cultivo favorecen el desarrollo de algas, hongos o bacteria que producen metabolitos tóxicos para el explante y, finalmente, influye en la organización y en las técnicas a emplear de un laboratorio dedicado al cultivo *in vitro*.

1.5.1. Medios de cultivo *in vitro*.

Sakai.udl.es. (2010), expresa que de entre la gran diversidad de medios de cultivo *in vitro*, utilizados habitualmente, el medio Murashige y Skoog (MS) es el medio más conocido. Se elaboró tomando el cultivo *in vitro* de tabaco como modelo y siguiendo un procedimiento cuantitativo se determinaron las concentraciones más adecuadas de todos los nutrientes. El medio MS, es apto para la mayoría de las especies, por lo que es de amplia utilización, excepto para las más sensibles a la salinidad, ya que se caracteriza por tener una

elevada concentración salina. En esos casos, puede recurrirse a otros medios o simplemente utilizarlo diluido (1/2 MS, 1/4 MS).

1.5.2. Macroelementos.

Uam.es. (2010), expresa que los elementos esenciales se clasifican según un criterio de cantidad, en macronutrientes y micronutrientes. La diferencia se encuentra en las concentraciones relativas que presentan unos y otros en los tejidos vegetales. Consideramos macronutrientes minerales, a los que están presentes en el tejido por encima del 0.1%, y son: N, S, P, K, Ca y Mg. Los elementos C, H y O, aunque son nutrientes, no se incluyen en estos fundamentos de la nutrición mineral, por no ser objeto de adición, como fertilizantes de los cultivos. El N, S y P, junto con C, H y O, son los constituyentes mayoritarios de las moléculas estructurales de las plantas, mientras que K, Ca y Mg, desempeñan funciones que tienen que ver con el agua y la conformación de proteínas. Todos participan también en otras funciones básicas, en el metabolismo de las plantas.

1.5.3. Propagación vegetativa

La propagación vegetativa, se define como la multiplicación de una planta, a partir de una célula, un tejido, un órgano (raíces tallos, ramas, hojas) Rojas *et al.*, (2004). Esto es posible, debido a que las células vegetales conservan la capacidad de regenerar la estructura entera de la planta; esta capacidad se debe a factores como la totipotencia, es decir, que cada célula vegetal viviente contiene en su núcleo, la información genética necesaria para reconstituir todas las partes de la planta y sus funciones, a través de reproducción somática basada

exclusivamente en mitosis; y la desdiferenciación o capacidad de las células maduras de volver a una condición meristemática y desarrollar un punto de crecimiento nuevo (Rojas *et al.*, 2004 y Vieira, 2007).

Las técnicas de propagación vegetativa son muy importantes para la conservación de la integridad genética del material deseado, estas técnicas, también pueden ser utilizadas de cara a la obtención de material vegetal para actuaciones de reforzamiento, introducción o reintroducción cuando la reproducción por vía sexual no resulta factible o eficaz Matthews, (1999). La propagación vegetativa es la reproducción asexual que se logra, a través de diferentes partes de una planta provista de yemas y con capacidad de enraizamiento dando origen a la formación de nuevos individuos. De esta manera, se puede asegurar la transmisión de los caracteres genéticos de la variedad vegetal, conservando siempre las características importantes como la pureza genotípica en generaciones sucesivas, lo cual es imposible lograrlo por vía sexual. Es una técnica que comprende desde procedimientos sencillos, conocidos desde tiempos inmemorables por los campesinos de todo el mundo, hasta procedimientos tecnológicamente muy avanzados, basados en la técnica del cultivo de tejidos vegetales, mediante los cuales se puede lograr la propagación masiva de plantas genéticamente homogéneas, mejoradas y libres de enfermedades Kléver, (2005). En estos casos se debe tener la precaución de mantener controlada la identidad genética del material propagado y de tener en cuenta, no solo la producción de un determinado número de individuos, sino, también la producción de un mínimo número de genotipos distintos.

El éxito de la propagación vegetativa depende de muchos factores como, por ejemplo, el tipo de especie que se quiere reproducir, el método de reproducción vegetativa que se emplee, las características fisiológicas del material a multiplicar, el genotipo empleado y la metodología de manejo utilizada durante el proceso de propagación. Rodríguez y Nieto, (2002).

La producción de material seleccionado de especies forestales requiere, por una parte, un mayor conocimiento de la biología reproductiva, así como de los condicionamientos fisiológicos que influyen en la capacidad morfogénica en relación con la juvenilidad de los materiales (Hodson *et al.*, 2004).

1.5.4. Propagación vegetativa *ex vitro* (por estacas)

La estaca es una porción separada de la planta, provista de yemas caulinares y hojas, e inducida a formar raíces y brotes, a través de manipulaciones químicas, mecánicas y/o ambientales Baldini, (1992). En una acepción más amplia, se denominan estacas: a raíces, hojas, fracciones de hojas utilizadas como tales; con la finalidad de obtener nuevas plantas Cuculiza, (1956). El objetivo de la multiplicación por este método, es conseguir estacas enraizadas de calidad, que respondan bien y rápidamente al trasplante, presenten gran uniformidad y sean la mejor base para alcanzar plantas de calidad López y Carazo, (2005).

En la multiplicación por estacas, solo es necesario, que un nuevo sistema de raíces adventicias se desarrolle, ya que la estaca posee yemas con aptitud potencial para desarrollar nuevos vástagos Hartmann y Kester (1995).

Las raíces adventicias son de dos tipos: raíces preformadas y de heridas (inducidas). Las preformadas se forman naturalmente durante los primeros

periodos de desarrollo del vástago, pudiendo emerger antes de la realización de estacas o permaneciendo en dormición hasta que se realicen las mismas y sean colocadas en condiciones ambientales favorables. Las de herida desarrollan sólo después que la estaca es cortada, por efecto de la herida producida en la preparación de la misma. Éstas, son consideradas como formadas *de novo* (nueva formación) Davies y Hartmann, (1988).

Varias clases de reguladores de crecimiento, tales como auxinas, Citokininas, giberelinas y etileno e inhibidores, como el ácido abscísico y fenólico, influyen sobre la iniciación de raíces. De ellas, la auxina es la que tiene el mayor efecto sobre la formación de raíces en estacas (Hartmann y Kester, (1995).

En relación con la aplicación de reguladores de crecimiento, algunos estudios mencionan que estacas tratadas con Ácido Indobutírico (AIB) no responden al proceso de rizogénesis o no aumentan la producción de raíces (García *et al.* 2005; Bonfil *et al.* 2007; Latsague *et al.* 2008).

Sin embargo, otros autores reportan que para inducir enraizamiento o estimular la rizogénesis, algunas especies requieren previamente un tratamiento con hormonas promotoras de raíces, varios autores han realizado ensayos para el enraizamiento de estacas, empleando reguladores del crecimiento en diversas especies de plantas leñosas:

Costa *et al.*, (2009) emplearon ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA), en las concentraciones de 1 000, 2 000, 3 000, 4 000 y 5 000 mg/L, aplicados en inmersión rápida para enraizar estacas semi-leñosas de *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, (camu-camu), encontrando que la

utilización de reguladores del crecimiento aumentaron el número de estacas enraizadas, obteniendo el mayor porcentaje (12 %) con la concentración de 3 000 mg/L de ANA.

La especie *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betcher) Chee (te) es un árbol de la familia Myrtaceae de importancia medicinal, con gran poder antiséptico, es una planta de difícil enraizamiento de las estaquillas, por lo que Carvalho *et al.*, (2012), se usaron dos reguladores del crecimiento: ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en las concentraciones de: 0; 1 000; 2 000 y 4 000 mg/L para inducir la producción de raíces. El mejor regulador del crecimiento resultó AIB en la concentración de 4 000 mg/L. El regulador ANA en la concentración de 4 000 mg/L resultó ser fitotóxico para las estacas de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betcher) Chee.

Giraldo *et al.*, (2009) evaluaron dos sustancias promotoras de enraizamiento en estacas de *Gliricidia sepium* (Jacq). (mataratón), *Trichanthera gigantea* (Bonpl.) Nees (nacedero) y *Salix humboldtiana* Willd (sauce).

Según, Gárate, (2010) el enraizamiento de estacas pueden verse alterado por diversos factores, así:

1. En las estacas, si la brotación de las yemas se produce antes de emisión de raíces, aquella compete y puede agotar las reservas hídricas y nutritivas de las propias estacas.
2. El enraizamiento es más rápido, si las áreas de esclerenquima se organizan aisladamente y están separadas por amplias zonas de parénquima.

3. En las estacas de ramas hay que tener en cuenta su polaridad, éstas enraízan por su parte basal.
4. La eliminación de yemas o de hojas, impide la formación de raíces.
5. El estado nutricional de la estaca, determina su capacidad de enraizamiento
6. En las especies leñosas, las estacas menores a un año, enraízan mejor, aunque en algunas especies (olivo) la capacidad rizogénica aumenta con la edad de los órganos de los que se separan las estacas.
7. En general, las estacas tomadas de las plantas jóvenes, enraízan mejor que las tomadas de las plantas adultas.
8. Las técnicas culturales encaminadas a rejuvenecer las plantas (poda) o a incrementar su actividad vegetativa (riego y fertilización), mejoran la capacidad rizogénica de las estacas.
9. Existen variaciones estacionales en la capacidad de enraizamiento.

1.5.5. Propagación vegetativa *in vitro*

No es frecuente encontrar en la naturaleza estados juveniles en árboles adultos como fuente de material para propagación, aunque para algunas especies puede ser resuelto, a través de la obtención de rebrotes de tocón, brotes epicórmicos, podas a ras de suelo, enraizamiento seriado de estacas, injertos y etiolación Carrizosa y Serrano, (1996). Ante este panorama, la biotecnología se presenta como una alternativa para la producción y mejoramiento de especies forestales.

Las técnicas de cultivo *in vitro*, han sido utilizadas de forma extensiva en la propagación y conservación de recursos fitogenéticos en agricultura, Saucedo *et al.*, (2007), sin embargo, su utilización en especies leñosas, se ha visto limitada

por problemas en el establecimiento (por fenolización), falta de respuesta a la inducción, hiperhidricidad y los relativos a la aclimatación del material propagado Lynch, (1999). En la mayoría de los casos, la micropropagación en especies leñosas se ha llevado a cabo, utilizando semillas como fuente de explantes, formación vía callos Clemente, (1999) y un reducido número de especies en las que ha sido exitosa la embriogénesis somática y las yemas axilares Fay *et al.*, (1999). A pesar, de estas dificultades para muchas especies forestales de gran valor económico y sujeto a una sobreexplotación, ésta constituye una opción para su recuperación y ensayos preliminares de mejoramiento genético.

Actualmente, el cultivo de tejidos de especies forestales es una alternativa, cuyas ventajas más sobresalientes sobre los sistemas tradicionales de propagación son: utiliza poco material como fuente de inicio para establecer el cultivo; elimina el efecto de las estaciones del año; es factible obtener plantas libres de enfermedades y, en algunas ocasiones los tiempos de propagación son más cortos; además, ha tenido un papel muy importante como herramienta para estudios fisiológicos, bioquímicos , anatómicos y morfológicos (Luna, 2002; Sánchez, 2002).

Dentro de esta técnica de propagación el cultivo de meristemas, yemas y ápices, es una manera sencilla de obtener nuevos brotes, los cuales pueden enraizarse y, así, producir nuevas plantas. Este sistema se basa en la formación de nuevos brotes, a partir de meristemas preexistentes, por lo que no implica fenómenos de dediferenciación y rediferenciación celular como ocurre en organogénesis y embriogénesis somática.

Con estos planteamientos coinciden Toribio y Celestino, (2000), quienes enfatizan en que la inducción del desarrollo de brotes axilares, seguido del enraizamiento de los mismos, además de ser la forma más común de regeneración, es la que presenta mayores garantías de estabilidad genética.

La propagación clonal de plantas, a partir de yemas apicales, meristemos apicales o explantes nodales, generalmente ha acelerado la proliferación de brotes axilares durante los subcultivos. Existen cuatro pasos para este tipo de micro propagación: el establecimiento, la multiplicación, el enraizamiento y la aclimatación. El desarrollo de este tipo de protocolos para especies de árboles tropicales, es importante para la producción masiva de germoplasma, que de otra manera se pudiera perder por la imposibilidad de propagar este material o la incompatibilidad del material vegetal usado en los métodos de propagación convencional (por ejemplo: enraizamiento de estacas o injertos) (Pijut *et al.*, 2012).

Arora *et al.*, (2010), lograron la propagación clonal de un árbol de 40 años de edad de *Azadirachta indica* A.Juss, usando segmentos nodales cultivados en un medio MS (Murashige y Skoog) que contenía 1.11 mg/L de BA (benziadenina), 1.43 mg/l de AIA (ácido indolacético), y 81.43 mg/L de hemisulfato de adenina. Los explantes colectados en marzo-abril respondieron mejor al cultivo *in vitro*. Los brotes fueron enraizados en un medio que contenía 2.46 mg/L de AIB. Los autores también observaron que los explantes nodales gruesos obtenidos de la región media se desarrollaron mejor.

Castro y Sánchez, (2010) lograron propagar árboles plus de *Eucalyptus pellita* F. Muell, mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales in vitro. Para la fase de

establecimiento emplearon como fuente de explantes segmentos nodales obtenidos, a partir de brotes epicórmicos de árboles plus. Para la proliferación evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de BAP, donde las dosis de 0,25 y 0,5 mg L⁻¹ les permitieron obtener 8,83 y 7,88 brotes por explantes en 30 días. El enraizamiento se logró, cuando se adicionó al medio de cultivo 1 mg L⁻¹ de AIB con un 80% de brotes que formaron raíces.

En general, las ventajas de estos métodos son: constituyen un sistema ideal para la propagación clonal; ofrecen la máxima estabilidad genética; es relativamente sencillo, fácilmente se encuentran las condiciones adecuadas; es ideal para la conservación *in vitro* de germoplasma, ya sea, por crecimiento retardado o por criopreservación. Particularmente, en el cultivo de ápices se requieren explantes de mayor tamaño que los utilizados en el cultivo de yemas axilares, lo que facilita la manipulación y tienen una mayor probabilidad de supervivencia; sin embargo, este método no es aplicable, cuando se requieren plantas libres de patógenos (Pérez *et al.*, 1999).

Todos estos métodos de cultivo de tejidos, parten de contar con el material vegetal o explante, bajo condiciones asépticas para garantizar su óptimo desarrollo, por lo que deben eliminarse todo tipo de organismos ajenos; el material y medio deben ser esterilizados, a fin de evitar al máximo cualquier contaminación. Éste es uno de los puntos críticos, al requerirse la experimentación de diversos métodos de desinfección adecuados al tipo de explante, que permitan la eliminación de contaminantes sin dañar el tejido vegetal (Rebolledo *et al.*, 2006).

Sin embargo, en los procesos de micro propagación vegetal, la presencia de microorganismos contaminantes, tanto, externos como endógenos, afectan el desempeño de los explantes una vez inoculados en condiciones *in vitro*, haciendo indispensable el uso de técnicas que permitan la eliminación de dichos contaminantes (Pérez y Jiménez, 1995; Leifert y Cassells, 2001; Suárez *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2006; López, 2007).

La desinfección de explantes aislados de plantas leñosas perennes, ha sido siempre una de las limitantes más severas para el establecimiento *in vitro* de este tipo de especies, reportándose contaminaciones superiores a 90 %, como en explantes de *Psidium guajava* - Myrtaceae (guayaba dulce) Vilorio, (1993); *Swietenia macrophylla* King (caoba), *Cedrela odorata* (cedro) Abdelnour y Muñoz, (1997); *Quillaja saponaria* Mol (Quillay) Prehn *et al.*, (2003); y *Tabebuia rosea* Bertol DC (roble) (Suárez *et al.*, 2006).

López *et al.*, (2010) evaluaron diferentes protocolos de desinfección de explantes (disco de hoja) de *Cordia alliodora*, para determinar la eficiencia en el menor grado de contaminación sin comprometer su viabilidad.

Collado *et al.*, (2004) con el objetivo de lograr el establecimiento *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King, (caoba) emplearon brotes jóvenes tomados de plantas sembradas en condiciones de campo.

De acuerdo con un estudio previo desarrollado para la propagación *in vitro* de material vegetal seleccionado de *Tabebuia rosea* Bertol DC y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Okén laurel Ramírez *et al.*, (2004) permitió ajustar protocolos de este material en cultivo *in vitro*, Schuler *et al.*, (2005). Sobre la base de estos

resultados produjeron plantas de *Tabebuia rosea* Bertol DC) y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav) Okén, a partir de semillas de árboles plus y llegan a la conclusión de que esta última especie mostró ser recalcitrante para el cultivo *in vitro*.

Las tasas de crecimiento, desarrollo y muchas de las características fisiológicas y morfológicas de las plantas formadas *in vitro*, están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso de los recipientes. El incremento de conocimientos acerca del control ambiental del cultivo de tejidos en condiciones estériles, está provocando una evolución de las distintas técnicas empleadas en la micropropagación de plantas. El ambiente *in vitro* en recipientes con baja tasa de ventilación presenta unas tasas bajas de flujo de materia y energía, con mínimas variaciones de temperatura, elevada humedad relativa y grandes cambios diarios de la concentración de CO₂ en el interior de los recipientes. El tipo de recipiente de cultivo (tamaño, forma, material y sistema de cierre) puede condicionar la evolución de la composición gaseosa en su interior durante el período de cultivo. Ante los distintos factores de estrés que tienen que soportar durante las fases de la micro propagación las plantas producidas en recipientes con nulo o escaso intercambio gaseoso, pueden manifestar alteraciones o déficit en cuanto a su estructura anatómica, morfológica y fisiológica. Como consecuencia, estas plantas presentan un fenotipo incapaz de sobrevivir al trasplante directo al invernadero o campo (Cañal *et al.*, 2001).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Áreas de estudio

El cantón Jipijapa, conocido tradicionalmente por su producción cafetera a nivel nacional, se localiza al suroeste de la provincia de Manabí. Su cabecera cantonal es la ciudad de Jipijapa, situada a 45 Km al sur de Portoviejo y, a 403 Km al suroeste de Quito.

El cantón contaba en el 2008 con una población de 50 011 habitantes en el área urbana y de 23 751 habitantes en el área rural, con un equilibrio entre hombres y mujeres, destacándose que la mayoría de la población, es joven menor de 18 años de edad.

Las parroquias urbanas de Jipijapa, están subdivididas en: Miguel Morán Lucio, San Lorenzo y Manuel Inocencio Parrales y Guale.

La investigación se realizó en las parroquias rurales: América, El Anegado, Pedro Pablo Gómez, Julcuy, La Unión, Membrillal y Puerto Cayo.

2.1.1. Ubicación geográfica del cantón Jipijapa.

El cantón Jipijapa, tiene una extensión territorial de 1 420 Km². Se sitúa entre los 01:10' y 01:47' de latitud sur y entre los 80:25' y 80:52' de longitud oeste, con una altura media de 303 msnm. Limita al norte con los cantones: Montecristi, Portoviejo y Santa Ana; al sur, con la provincia del Guayas y cantón Puerto López; al este, por los cantones Paján y 24 de Mayo y al oeste, por el Océano Pacífico. El acceso al cantón es vehicular por vías de primero y segundo orden que lo conectan directamente con las ciudades vecinas de Portoviejo, Montecristi, Puerto

López, Pedro Carbo y, posteriormente, con el resto de ciudades del país. (Figura 1).

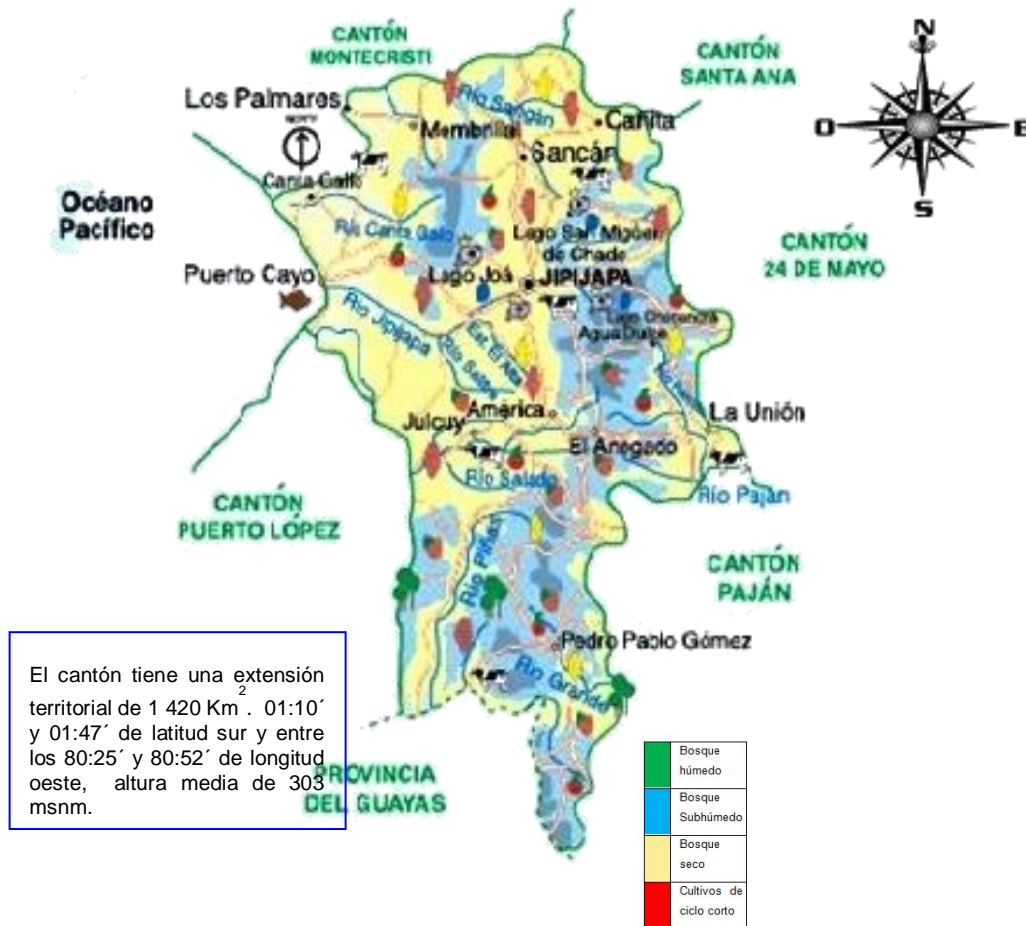


Figura 1. Ubicación geográfica del cantón Jipijapa

2.2. Caracterización de las áreas asociadas a *Cordia alliodora*. (Ruiz& Pav.)

Okén

2.2.1. Tamaño de muestra

Se empleó la metodología de inventario rápido”, Gentry (1985; 1988); Keels et al., (1997), citados por Garibaldi (2008); además, para establecer el tamaño de las

parcelas se tuvo en cuenta los criterios de muestreo utilizados por Duivenvoorden (1994); Cuevas et al., (2002); Galindo et al., (2003); Sánchez y López (2003); Matos (2006); Mosquera et al., (2007). Se plantea que para este tipo de bosque, el décimo de hectárea (0,1 ha) como tamaño de parcelas transitorias es adecuado para muestrear desde el punto de vista florístico. Para estudios de dinámica forestal se ha llegado hasta parcelas de 1 ha, pero son permanentes. (Tabla1).

Tabla 1. Localidades y tipos de bosques donde se llevó a cabo el estudio

Localidad	Acrónimo	Tipo de Bosque
La Unión	Un	Bosque húmedo
Pedro Pablo Gómez	PPG	Bosque húmedo
Membrillal	Mem	Bosque seco
Julcuy	Jul	Bosque seco
Puerto Cayo	PC	Bosque seco
La América	Am	Bosque subhúmedo
El Anegado	An	Bosque subhúmedo

2.2.2. Variables

Independientes

- Localidades

Dependientes

Diversidad

- Riqueza de especies
- Abundancia
- Dominancia
- Diversidad

- Distribución por clases diamétricas de *C. alliodora*.

Dasométricas

- Diámetro a 1,30 m ($D_{1,30}$) de *C. alliodora*
- Altura de *C. alliodora*

2.2.3. Estructura horizontal

La estructura horizontal se evaluó mediante la determinación de los valores de abundancia, dominancia, y la frecuencia relativa de cada especie; así como las distribuciones de abundancia de árboles por clase diamétrica Mostacedo y Fredericksen, (2000); Moreno, (2001). Se calculó el Índice de Valor de Importancia Ecológica (IVIE), formulado por Keels *et al.*, (1997), para cada especie, a partir de la suma de los parámetros de la estructura horizontal. La obtención de índices de valor de importancia similares para las especies indicadoras, sugieren la igualdad o por lo menos la semejanza del rodal en su composición, estructuras, sitio y dinámica Lamprecht, (1990). Para el análisis de la distribución por clases diamétricas de *C. alliodora* considerando intervalos de clase de 10 cm.

$$IVIE = AR + DR + FR$$

Dónde:

AR = Abundancia relativa

DR = dominancia relativa

FR = frecuencia relativa

2.2.4. Estructura vertical:

Se determinó la altura promedio y diámetro de especies en cada localidad y se compararon dichas variables dasométricas, mediante la Prueba U de Mann Whitney para muestras independientes $\alpha = 0,05$, programa Statistical Package For Social Science (SPSS versión 15) para Windows. Ver 15.0.1, 2006, para detectar si existían diferencias significativas.

La regeneración natural se evaluó siguiendo la metodología propuesta por Orozco y Brumer, (2002), se establecieron 3 subparcelas anidadas (brinzal, latizal bajo y latizal alto).

2.2.5. Diversidad alfa (α)

La diversidad (**alfa**) de especies forestales por tipo de cobertura vegetal, fue estimada mediante la riqueza de especies. Descrita como el número de especies en cada tratamiento, que es considerada el indicador más importante de diversidad Magurran, (1989), sobre todo en muestras con más de 3 000 individuos.

La dominancia fue calculada por el Índice de Simpson (Simpson EH, 1949) y la diversidad por el Índice de Shannon (H') (Shannon y Weaner, 1949), se calculó, también la equitatividad que describe la abundancia proporcional de especies. Para determinar la similitud entre las diferentes localidades en función de la composición florística y la abundancia de cada especie, se realizó el análisis de conglomerados jerárquicos mediante la medida de similitud de Sorensen (diversidad beta β) (Bray-Curtis) Beals, 1984; McCune y Beals, (1993). También, se usó el método de ordenación por análisis de correspondencia (Hill, 1973) para facilitar el ordenamiento de las mismas, conforme a la composición y abundancia de especies.

Los cálculos de ambas medidas de diversidad fueron realizados con el programa BioDiversity Pro. 2006.

2.3. Macro propagación y micro propagación de *Cordia alliodora*.

En la Figura 2, se muestra la marcha analítica propuesta para la propagación vegetativa de *C. alliodora*, por ambas modalidades: *ex vitro* (macropropagación) de material juvenil y la propagación *in vitro* (micropropagación), a través de dos vías plantas de dos meses de edad (vivero) y brotes epicórmicos (árbol plus) obtenidos de árboles seleccionados del campo; pero, en este caso se utilizaron los explantes de yemas apicales y de plántulas de vivero.

2.3.1. Propagación *ex vitro*

2.3.1.1. Obtención de explantes

La obtención de los explantes se seleccionó en las comunidades La Unión y El Anegado, para llevar a cabo la micro propagación del material vegetal de árboles plus con las siguientes características: forma de fuste, dominancia del eje principal (Dominancia completa en el eje inicial), ángulo de inserción de las ramas (60 a 90°), forma de copa (circular) y diámetro de copa (Copa vigorosa mayor a 10 m) y plantas de dos años de edad, provenientes de semillas (vivero).

Las plantas madres se cultivaron en funda de polietileno 5 x 4 cm. bajo condiciones controladas en un sistema forzado (invernadero), en un sustrato compuesto de 50% de tierra de cafetal y 50% de arena de río.

Las plantas fueron expuestas semanalmente a tratamientos de fertilización utilizando Yara-Mila Complex AGRIPAC (Ecuador) con dosis 50 mg /L; manejo de plagas y enfermedades, se empleó Cobrex nordox Fungicida cúprico Industrier As.(Noruega) 2 mg/L y manejo de plantas y labores culturales mediante cortes

regulares, a través de poda, tanto, para la producción de esquejes como para el mantenimiento del material vegetal, de donde se obtuvieron miniestacas de 12 cm de longitud a diferentes partes de las plántulas eliminando todas sus hojas. Las miniestacas se ubicaron en recipientes que contenían agua destilada para evitar la deshidratación.

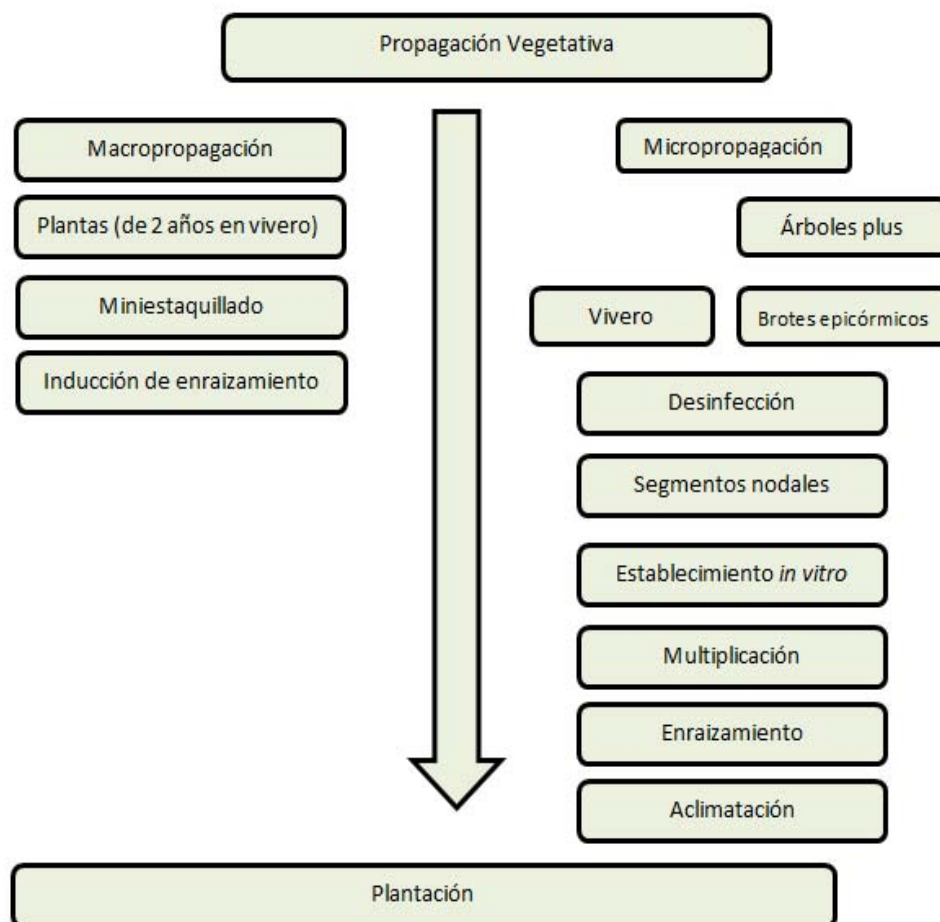


Figura 2. Marcha analítica para el establecimiento de la propagación de *Cordia alliodora*.

2.3.1.2. Inducción del enraizamiento

Se diseñaron 9 concentraciones con auxinas para inducir el enraizamiento y un testigo al cual no se le aplicó ningún regulador del crecimiento. Las hormonas

utilizadas fueron ANA en concentraciones de 1 000, 3 500, 4 000 y 20 000 ppm y AIB de 500, 1 000, 1 500, 4 000 y 20 000 ppm, ambas en forma de polvo enraizador, evaluándose la longitud de las raíces.

Para el enraizamiento de las miniestacas, se utilizó un sustrato en proporción 50% aserrín + 50% tierra de cafetal, el cual fue desinfectado con Vydate insecticida, nematicida E.I Du Pont De Nemours And Company (Estados Unidos) a 5 g/L dejándola en reposo y cubierta con polietileno durante 12 horas para después proceder al llenado de las bandejas y la plantación de las miniestacas. El aserrín de madera, contiene las siguientes características: se compone principalmente de fibras de celulosa unidas con lignina. Según análisis, su composición media es de 50% de carbono(C), 42% de oxígeno (O), 6% de hidrógeno (H) y 2% de Nitrógeno asociados a otros elementos (N). Tierra de cafetal en el examen físico y químico tierra de cafetal: El PH 6.3, Nitrógeno 3.1 %, Fósforo (P) 1.63 % , Potasio 1.5 % , Calcio 2.8 % , Magnesio 1.3 % , C. orgánico 47 % , Sulfato 33% , Cobre 35%, el Hierro 17% , el Manganeso 43.8%. Se evaluó la ocurrencia de enraizamiento, la longitud de la raíz mayor y el número de raíces por tratamiento, pasados los dos meses.

2.3.2. Propagación *in vitro*

2.3.2.1. Obtención de explantes

Se utilizaron segmentos nodales, obtenidos, a partir de las siguientes fuentes:

- Plantas de dos meses de edad en vivero.
- Brotes epicórmicos, a partir de árboles plus de *C. alliodora*.

En las dos localidades estudiadas: La Unión (Un) y El Anegado (An), fue realizada la selección de árboles plus donantes de brotes epicórmicos, pues las poblaciones asociadas a localidades tenían mayores tamaños poblacionales, gran regeneración natural que refleja una buena salud genética con parámetros dasométricos promedios altos y gran variabilidad garantiza el proceso de selección. Los individuos seleccionados como árbol plus se identificaron con la aplicación de la metodología de Murillo *et al.*, (2010). Para seleccionar los árboles plus se consideró de acuerdo a cada una de sus características: Forma de fuste recto, Dominancia del eje principal (Dominancia completa en el eje inicial), Angulo de inserción de las ramas (60 a 90°), Forma de copa (Circular), Diámetro de copa (Copa vigorosa mayor a 10 m).

A individuos de *C. alliodora* se les realizó una herida en el lado este del tronco en forma de semianillo, a una altura de 30 a 40 cm de la base del tronco, aplicándole una solución de la citoquinina BAP a concentración de 6,0 mg/L, siguiendo la metodología de Murillo *et al.*, (2001).

Pasados 90 días, los brotes fueron colectados y transportados en hielo a las áreas del laboratorio para continuar con la propagación *in vitro*.

Los explantes axilares y apicales de las plántulas de dos meses y los brotes epicórmicos fueron cortados y sumergidos en una solución de ácido ascórbico a concentración de 150 mg/L para evitar la oxidación fenólica.

2.3.2.2. Establecimiento del cultivo aséptico

Las plántulas de dos meses fueron fumigadas dos veces por semana con una mezcla de Vitavax y Benlate a la concentración de 1 g/L para asegurar una mayor

sanidad de los materiales, mientras que los brotes se fumigaron antes de seccionarse.

Los explantes se colectaron en solución de ácido ascórbico 150 mg/L, seccionado de brotes a 3 cm. de longitud, fueron lavados en agua destilada (2-3 veces), y luego sumergidos en agua destilada por 10 minutos a objeto de bajar el contenido endógeno de fenoles, inmediatamente se sumergieron en bicloruro de mercurio a concentración de 0,25% más dos gotas de Tween 80 durante cinco minutos en la zaranda orbital marca: Vwr Modelo: Incubating Orbital Shaker Serie: 100928002, se suministraron tres enjuagues de agua destilada estéril. En la cabina de flujo Bioseguridad marca: Labconco, Modelo: 3450001, Serie: 1008293010, se procedió según los cinco tratamientos (tabla 2.), se condensan los procesos con las respectivas sustancias químicas utilizadas en la desinfección del material vegetal de *Cordia alliodora*.

Tabla 2. Variantes de desinfección de los explantes empleados.

Variant e	Ca(ClO) 2 g/L	NaCl O %	T Mi n	EtO H %	T mi n	Gentamicin a mg/L	Povidin n %	T mi n	Ácido ascórbic o mg/L
T1	2,5	75	2	75	1				150
T2	2,5	50	1	75	½				150
T3		40	2	70	1	80	1	5	150
T4		2,5	3	75	1		5	5	150
T5		2,5	2	75	1	80	2.5	5	150
❖ Alcohol Marca: Weir, Grado: 97% Laboratorio Farmacéutico Weir (Ecuador)									
❖ Povidin Jabón Líquido, Antiséptico, Bactericida, Fungicida, Esporicida, Viricida. Contiene: Yodopovina 7.5% U.S.P (0.75% Yodo Disponible) Lab. Dr. A. Bjarner C.A (Ecuador)									

En el establecimiento se utilizó un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado a la mitad de concentración de nitratos, suplementado con 4 mg/L,

vitaminas de Morel (D-Calcium pantothenate 1 mg/L, myo-Inositol 100 mg/L, Nicotinic acid 1 mg/L, Pyridoxine • HCl 1mg/L, Thiamine • HCl 1 mg/L y Biotina 0.2 mg/L) y 30 g/L de sacarosa, libre de hormonas, solidificado con agar 7 g/L y el pH fue ajustado a 5,7 con hidróxido de sodio (NaOH). (1 a 2 gotas (NaOH) en solución 2N (equivale a 4 gr en 100 ml de agua), el mismo que sirve para subir, en caso de que el pH supere los 5.7 se utiliza (media gota) de Ácido Clorhídrico (HCl). En este medio se mantuvieron por 21 días.

Los experimentos fueron evaluados a los 7 días, teniendo en cuenta: porcentaje de explantes contaminados (C), porcentaje de explantes fenolizados (F), porcentaje de explantes establecidos (E).

Los medios de cultivo se distribuyeron en tubos de ensayo con capacidad de 60 ml (15 ml/tubo) o en frascos con capacidad de 100 ml (25 ml/frasco) y se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 120°C de temperatura y 1,5 atmósferas de presión.

2.3.2.3. Multiplicación

Los explantes establecidos en la etapa anterior se cultivaron en medios constituidos por las sales del MS, suplementado con 4 mg/L vitaminas de Morel, 30 g/L de sacarosa, agar 7 g/L ajustando el pH a 5,7. Para definir el balance hormonal adecuado se diseñaron las siguientes variantes: **M1**: Kinetina (KIN) 0,25 mg/L + AIB 0,40 mg/L, **M2**: Kinetina (KIN) 0,50 mg/L + AIB 0,50 mg/L, **M3**: Kinetina (KIN) 1mg/L + AIB 0,60 mg/L, **M4**: Kinetina (KIN) 1,5 mg/L + AIB 0,70 mg/L, **M5**: Kinetina (KIN) 2,5 mg/L + AIB 0,80 mg/L y un testigo sin hormonas, se

mantuvieron por 28 días y se subcultivaron tres veces. En esta etapa, se evaluó a las tres semanas: el número de brotes por explante.

Comprobados los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, se realizó un ANOVA ($p < 0,05$) de clasificación simple para determinar el efecto de las variantes sobre la multiplicación y una Prueba de Duncan para detectar las diferencias entre variantes de la multiplicación. Para los análisis estadísticos, se empleó el software SPSS 15.0 para Windows, Versión 15.0.1, (2006).

2.3.2.4. Enraizamiento

Los brotes se individualizaron y los que medían de 15 a 20 mm y que presentaban al menos dos hojas bien diferenciadas se transfirieron para un medio líquido, con soporte de papel de filtro, que contenía las sales del medio MS reducidas a la mitad de su concentración, sacarosa 15 g/L, carbón activado 1,0 g/L y para la inducción del enraizamiento se emplearon las auxinas **E1**: ANA 1,0 mg/L, **E2**: AIB 1,0 mg/L, **E3**: AIA 1,0 mg/L junto al testigo. El experimento se desarrolló en cámaras con temperaturas entre 23-27°C con un fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad luminosa (klx) entre 3-4 obtenida de lámparas fluorescentes.

2.3.2.5. Adaptación y Endurecimiento

Las vitroplantas de *C. alliodora* de tres a seis cm de longitud, que poseían como promedio tres raíces y que la raíz mayor medía entre tres y cinco cm aproximadamente, se extrajeron de los tubos de cultivo y se colocaron en bandejas de 72 orificios que contenían tierra de cafetal 50% + 50% aserrín. Previamente, se recortaron las raíces con más de dos cm. de longitud, dejándolas

de un tamaño de dos cm. Las bandejas se colocaron en una cámara húmeda con 100 % cobertura. El riego se efectuó por nebulización tres veces al día, cada dos minutos durante 30 días; evaluándose el porcentaje de sobrevivencia.

Las plantas que a los 30 días habían sobrevivido se trasladaron al umbráculo, donde había un 70% de sombra y se trasplantaron a bolsas de polietileno que contenían el mismo sustrato reduciendo el riego hasta intervalos de 4 días, En esta etapa se realizaron aspersiones del fungicida Vitavax cada siete días, hasta que las plantas, fueron llevadas a plantación pasados los 60 días monitoreando su altura, diámetro en cm y el vigor.

2.4. Establecimiento de la plantación

Para la realización de estos estudios se estableció una plantación de *C. alliodora* con plántulas obtenidas por cultivo *in vitro*, en los predios experimentales del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Estatal del Sur de Manabí.

Los datos de la plantación son los siguientes:

Ubicación: Km. 1 Carretera a Noboa, Campus los Ángeles

Fecha de plantación: noviembre de 2012

Suelo: franco arcilloso con pendiente de un 40% (Álvarez, 2012).

La plantación sigue un diseño de bloques con un total de 216 plántulas a un espaciamiento de 4 x 3 m. con la única restricción de la no contigüidad entre bloques de ramets procedentes del mismo clon Pardos y Gil (1986).

2.4.1. Preparación del terreno

Con la ayuda de un GPS **Marca:** Garmin, **Modelo:** GPS Map 60 Cx, se replantea el terreno en cinco parcelas y se señaliza cada una de las plántulas en función de árbol plus y de las localidades Unión y Anegado, y se preparó el terreno manualmente con tubo de plantar.

2.4.2. Plantación.

Cada plántula fue desembolsada y colocada en un hoyo de 25 x 25 cm x 30 cm de profundidad, donde previo a la plantación, se colocó una capa de sustrato compuesto por tierra de cafetal 70% + arena de río 30%.

Al momento de la plantación, se midió la altura y el diámetro, al mes de plantadas se procedió a la evaluación mensual de 170 individuos con relación a altura de la planta, diámetro, porcentaje de mortalidad y vigor de acuerdo a Quevedo, (1993):

- Excelente (calificación 3): abundante follaje (9 a más yemas), color verde intenso de las hojas, y apariencia saludable del plantón.
- Buena (calificación 2): mediano follaje (6-8 yemas), color verde intenso, con presencia de color verde pálido, apariencia saludable del plantón.
- Regular (3): poco follaje (1-5 yemas), color predominante verde amarillento, y apariencia débil del plantón.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estructura horizontal

3.1. Estructura de las poblaciones de *C. alliodora* por localidad

En la Tabla 3, se presenta la abundancia de *C. alliodora* por localidad, así como los promedios de las variables diámetro (cm) y altura (m). De acuerdo a la prueba de comparación de muestras independientes de U Mann Whitney, se comprobó que existen diferencias significativas entre localidades.

Tabla 3. Promedios de diámetro y altura de la estructura de las poblaciones de *C. alliodora* por localidad.

Localidad	Número de individuos	Diámetro (cm)	Altura (m)
La Unión	294	21,72 ± 21,2 b	8,48 ± 6,7 d
Pedro Pablo Gómez	128	25,87 ± 16,4 b	10,68 ± 4,6 c
Membrillal	76	25,44 ± 10,1 b	16,17 ± 6,5 a
Julcuy	39	28,04 ± 16,9 b	10,85 ± 5,9 c
Puerto Cayo	70	7,55 ± 8,9 c	5,76 ± 6,3 e
América	170	22,36 ± 16,0 b	8,04 ± 4,6 d
Anegado	139	33,97 ± 19,3 a	14,17 ± 5,8 b

Letras desiguales indican diferencias significativas $P < 0,05$, para la Prueba U de Mann Whitney.

Puerto Cayo presenta los valores más bajos de ambas variables dasométricas, resultado esperado de acuerdo a las condiciones ambientales de esta localidad. Las mejores poblaciones desde el punto de vista dasométrico son: El Anegado y Membrillal, este último favorecido por ser un bosque de transición seco - húmedo y distante de los núcleos poblacionales, además, de que sus propietarios aún no comercializan su madera.

En las localidades (El Anegado, La América, La Unión y Pedro Pablo Gómez), donde es mayor el cultivo del café, el dosel del bosque está permanentemente abierto y la abundancia de *C. alliodora* es favorecida por ser una especie heliófila.

3.2. Estructura diamétrica de *C. alliodora*

Al analizar cada localidad en la Tabla 4, se comprobó que la mayoría de ellas, tienen algún grado de alteración en cuanto a la distribución por clases diamétricas, con excepción de La Unión y El Anegado, que son las localidades con mayor abundancia de la especie y riqueza como medida de diversidad y, además, están bien estructuradas desde las clases inferiores a las superiores.

Tabla 4. Distribución por clases diamétricas de *Cordia alliodora*

Clases Diamétricas (cm)	Unión (Un)	Pedro Pablo Gómez (PPG)	Membrillal (Mem)	Julcuy (Jul)	Puerto Cayo (PC)	América (Am)	Anegado (An)
10,0	102	18	9	3	48	42	7
20,0	70	30	10	15	16	39	19
30,0	40	50	21	8	5	64	44
40,0	63	20	36	4	1	10	33
50,0	10	3		3		8	17
60,0	1			6			4
70,0	3	2				2	6
80,0	1	2				2	4
90,0	1						1
100,0		3				3	4
120,0	1						
140,0	1						
150,0	1						

3.3. Estructura vertical

3.3.1. Diversidad

Riqueza de especies

En la Tabla 5, se presentan la cantidad de números de especies e individuos identificados por localidad, la mayor cantidad de especies se encontraron en la

zona de bosque subhúmedo, donde la presión por el establecimiento del café es menor que la zona de bosque húmedo, por lo que hay una mayor cantidad de especies del bosque original. En las zonas de bosque seco, la extracción de madera y la conversión a rastrojales, incide fuertemente en la riqueza de especies.

Tabla 5. Número de especies e individuos por localidad.

Localidad	# Especies	# Individuos
Unión	10	398
Pedro Pablo Gómez	14	204
Membrillal	11	119
Julcuy	5	70
Puerto Cayo	6	206
América	16	255
Anegado	19	234

En Julcuy aparte de lo señalado anteriormente, incide, además, el pastoreo que reduce significativamente la presencia de individuos, con respecto al resto de las zonas de estudio.

En la Tabla 6, se presenta la lista de especies más importantes identificadas en los muestreos de campo, se destaca *C. alliadora* con un Índice de valor de importancia (IVIE) superior a 1, esta especie se encontró en todas las localidades y es notable su abundancia.

Tabla 6. Listado de las especies forestales por localidad junto al índice de valor de importancia (IVIE).

Especies	Un	PPG	Mem	Jul	PC	Am	An	IVIE
<i>Cordia alliodora</i>	294	130	76	39	72	170	139	1,619
<i>Sapindus saponaria</i>	10	2	9	10	4	9	10	1,036
<i>Citrus sinensis</i>	19	10	10			8	9	0,752
<i>Manguifera indica</i>	10	10	10			8	9	0,746
<i>Guasuma ulmifolia</i>		2	1		42	3		0,604
<i>Musa sapientum</i>	10	10	1			9		0,592
<i>Musa cavendishi</i>	10	10	1			7		0,590
<i>Inga edulis</i>		10	1			6	8	0,588
<i>Cedrela odorata</i>		8	1			3	1	0,580
<i>Mauria beringo</i>		3				9	2	0,438
<i>Swietenia macrophylla</i>		2				1	1	0,431
<i>Albizia guachapelí</i>					42		1	0,315
<i>Persea americana</i>	10						10	0,299
<i>Prosopis juliflora</i>			8	10				0,298
<i>Triplaris cumingiana</i>						3	9	0,294
<i>Cordia eriostigma</i>						7	1	0,291
<i>Inga spp.</i>		2				4		0,290
<i>Trema micranta</i>					42			0,171
<i>Crescentia cujete</i>	15							0,153
<i>Jacquiia pubescens</i>				10				0,150
<i>Nectandra spp.</i>							10	0,150
<i>Inga edulis</i>	10							0,150
<i>Ocotea tonduzu</i>	10							0,150
<i>Syzygium jambos L.</i>							10	0,150
<i>Inga heteropoda</i>							9	0,149
<i>Psidium guajaba</i>						7		0,148
<i>Pithecellobium arboreum</i>					4			0,146
<i>Tabebuia bignonia</i>		4						0,146
<i>Cecopria garciae</i>							2	0,144
<i>Annona muricata</i>							1	0,144
<i>Coffea arábica</i>			1					0,144
<i>Chrysophyllum caimito</i>						1		0,144
<i>Solanum spp.</i>							1	0,144
<i>Mutingiacalabura</i>				1				0,144
<i>Tabebuia ecuadorensis</i>		1						0,144
<i>Mauria heterophylla</i>							1	0,144

Diversidad de especies

En la Tabla 7, se presentan los valores de dominancia y diversidad de cada localidad, en general, indican que la diversidad de especies es baja y la dominancia alta, estos valores están influenciados por la alta presencia de *C. alliodora*, especie favorecida en el manejo por su valor maderero.

Tabla 7. Diversidad de especies por localidad.

Índice de Diversidad	Un	PPG	Mem	Jul	PC	Am	An
Simpsons (D)	0,553	0,418	0,428	0,363	0,244	0,452	0,365
Simpsons (1/D)	1,809	2,393	2,337	2,757	4,099	2,215	2,741
Shannon H' Log Base 10,	0,495	0,651	0,573	0,53	0,648	0,648	0,742
Shannon Hmax Log Base 10,	1	1,146	1,041	0,699	0,778	1,204	1,279
Shannon J' (Equitatividad)	0,495	0,568	0,551	0,758	0,833	0,538	0,581
Leyendas: Unión (Un), Pedro Pablo Gómez (PPG), Membrillal (Mem), Julcuy (Jul), Puerto Cayo (PC), América (Am) y Anegado (An).							

Puerto Cayo, y Julcuy aún cuando tienen la menor riqueza de especies, la distribución más uniforme entre éstas, hace que los valores de diversidad sean más altos, de acuerdo a las curvas de abundancia de la Figura 3 tienen los valores más bajos del ajuste a la función logarítmica (R^2) (como indicador de diversidad).

Las características de las curvas y el valor R^2 del resto de las localidades, especialmente de La Unión, confirman el efecto de la elevada abundancia de *C. alliodora*, esto provoca que el primer tramo de la curva tenga una caída abrupta, aunque existan otras especies con algún grado de importancia.

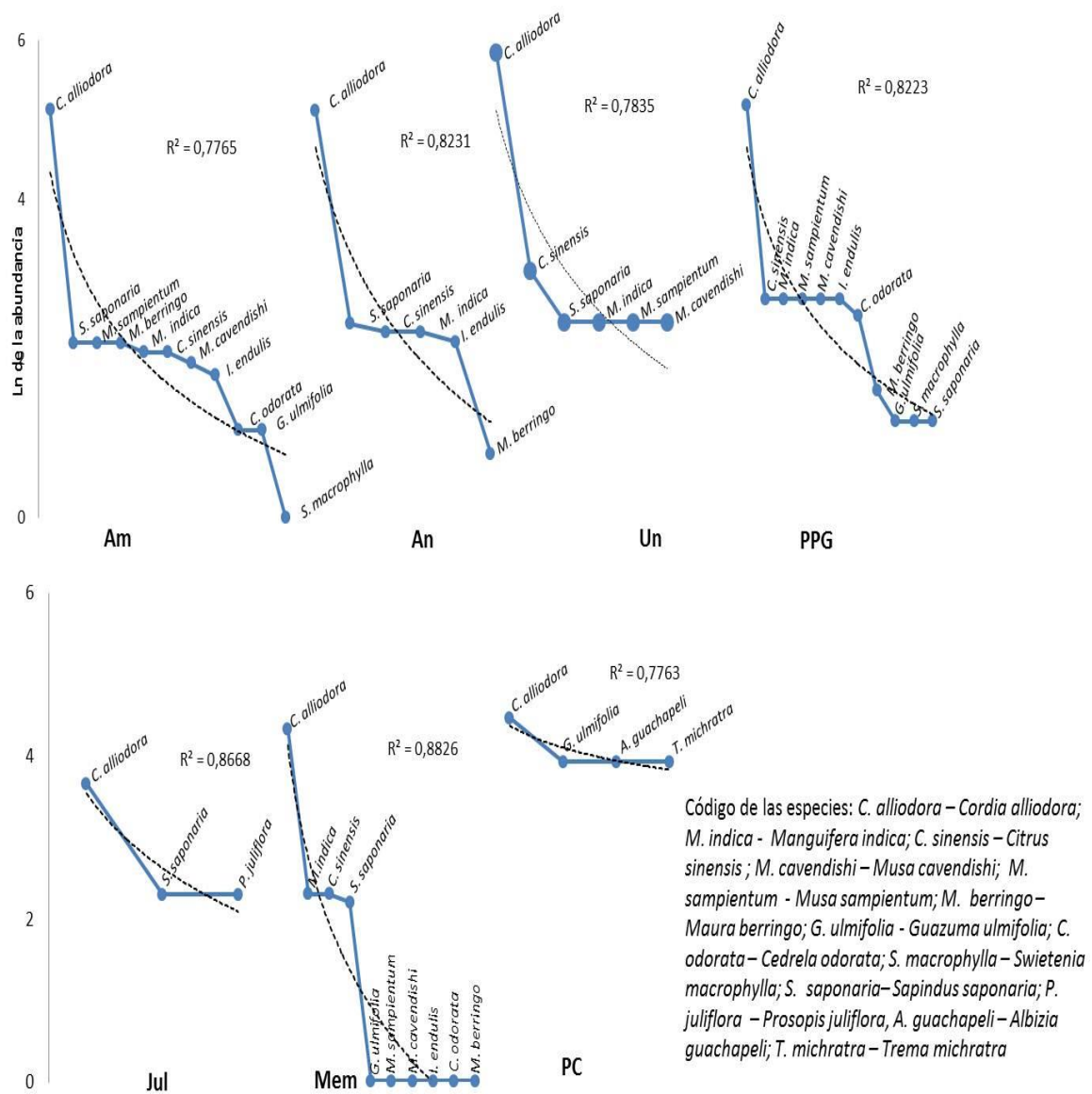


Figura 3. Curvas de abundancia de especies por localidades. El ajuste (líneas discontinuas) es en base a la función logarítmica.

Los datos de abundancia están transformados a escala logarítmica (Ln)

Diversidad β

Como resultado del análisis de clúster, se obtuvo el dendrograma de la Figura 4, según este diagrama se forma un conglomerado donde se incluyen todas las localidades menos Puerto Cayo, que por sus características en cuanto a riqueza y abundancia se diferencia del resto de las localidades.

La ordenación de las localidades por medio del análisis de correspondencia revela la presencia de tres ecosistemas bien definidos; el primero, constituido por los bosques secundarios húmedos y subhúmedos; el segundo, por las localidades del bosque secundario seco típico y el tercero, por el bosque seco costero.

Este resultado desde el punto de vista del manejo es útil, pues se puede enfocar en función de las similitudes entre las formaciones de cada grupo. La singularidad del bosque secundario seco costero, debe constituir objeto de especial atención, por la complejidad e importancia de este ecosistema.

Desde el punto de vista de diversidad beta, Puerto Cayo, es la única localidad que aporta un cambio, su similitud con las demás localidades no sobrepasa el 50%. Por su condición de zona costera, aparecen especies que la singularizan con respecto a las demás.

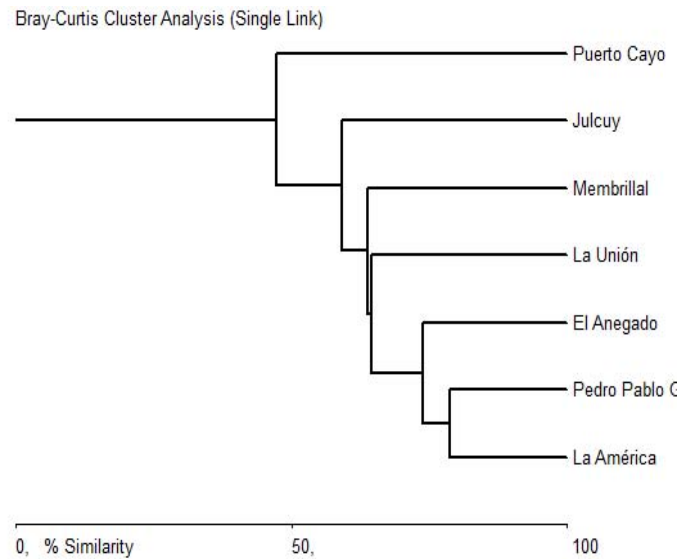


Figura 4. Dendrograma resultado de la clasificación de los sistemas agroforestales de las localidades objeto de estudio.

La regeneración natural no es homogénea en cada una de las localidades, resultando en forma general, baja para la especie. Las localidades, donde es mayor la regeneración son Puerto Cayo y La Unión, esta última con una dinámica favorable para la renovación de la población de *C. alliadora*. Por otro lado, en El Anegado, cuya principal actividad agrícola es la producción de café posee los valores menores de regeneración, esto se debe a que el agricultor cuando realiza las labores culturales en su finca, corta la vegetación que se encuentra en el sitio y va fragmentando la regeneración natural de las especies presentes en el área, sólo quedan las que están visibles de *C. alliadora* (Tabla 8). Gran parte de los árboles de mayor altura de *C. alliadora* por la calidad de su madera, son comercializados por los campesinos.

Tabla 8. Regeneración Natural de *Cordia alliodora*

Regeneración	Localidades							
	Un	PPG	Mem	Jul	PC	Am	An	Total
Brinzal	21	0	4	1	35	2	1	64
Latizal bajo	3	0	3	1	1	6	6	20
Latizal alto	78	17	2	1	12	36	0	146
Total regeneración	102	17	9	3	48	44	7	230
% regeneración	35	13	12	7	69	26	5	25,1
Total especies	294	128	76	39	70	170	139	916

Legendas: Unión (Un), Pedro Pablo Gómez (PPG), Membrillal (Mem), Julcuy (Jul), Puerto Cayo (PC), América (Am) y Anegado (An).

La regeneración observada de especies maderables se encuentra bastante disminuida; dando cuenta de los efectos de extracción y reconversión sobre la dinámica de la regeneración de especies comerciales.

El uso y manejo inadecuado de estos sistemas agroforestales, es el principal impacto ambiental que se distingue y ha tenido sus consecuencias sobre la conservación del bosque. Esta tendencia parece mantenerse y no hay indicios de que esta situación vaya a cambiar en el corto plazo. Los dramáticos cambios provocados por la conversión de bosques a tierras agrícolas, sobre la diversidad biológica en los últimos 50 años podrían colocar a muchas especies en estado de amenaza crítica (Laurance y Cochrane, 2001; Laurance; 2006; Pérez y Laurance 2006). Sumado a ello, los efectos globales de los cambios climáticos podrían poner en peligro a las especies con incapacidad de emigrar, a través de paisajes “hostiles” para alcanzar nuevas áreas con clima y hábitats más apropiados Laurance, (2006).

Perder biodiversidad, es perder oportunidades de mejorar la calidad de vida, así como, la posibilidad de incorporar diferentes especies y sus variedades a la dieta humana; de obtener sustancias naturales de importancia para el mantenimiento de la salud y cura de enfermedades; de proteger la calidad del agua y el suelo, mediante el mantenimiento de la cubierta forestal y de disfrutar de opciones recreativas y estéticas.

El aspecto anterior se corrobora en los valores de importancia (IVIE) presentados en la Tabla 6, que son muy bajos en general, excepto para *C. alliodora* que alcanza valores de frecuencia y abundancia relativa muy altos con respecto a las demás especies.

La abundancia, dominancia, la distribución diamétrica regular de *C. alliodora*, así como, la frecuencia de individuos adultos aislados y en regeneración natural, observada sugieren que esta especie es una de las más favorecidas por las perturbaciones, de ahí, su potencial para ser incorporadas a un programa de manejo forestal para la recuperación de estos bosques. El Ministerio de agricultura y Ganadería, a través de su plan de forestación y reforestación ha considerado la especie para ser incorporada en el programa de manejo forestal en el país.

El principal impacto que ha incidido en la situación actual, es la explotación y consecuente degradación de estos bosques que han reducido considerablemente la composición de especies, su estructura y diversidad, al respecto Roarke, y Marzluff, (2004), señalan que a nivel florístico, el tipo e intensidad de uso anterior del sitio determina la recuperación de la composición y riqueza de especies, por lo que la recuperación de estos ecosistemas será a largo plazo.

Debido a la incidencia que el hombre ha ejercido sobre estos ecosistemas, entre ellos; la sobreexplotación, la diversidad de especies es baja y de continuar esta acción en un futuro estas formaciones pueden perder su estructura, debido al uso del suelo que el hombre realiza y cuando ya los cultivos que han implantados en ellos, baja la productividad los abandonan y, entonces, se convierten entonces en rastrojales improductivos (Figura 4).

Se toma en cuenta los resultados obtenidos y el planteamiento de varios autores consultados, acerca de la *Cordia alliodora*, se concluye que es una especie favorecida por el manejo; que se encuentra entre las más recomendadas para la zona del bosque húmedo premontano; que la prioridad que se le está dando, permite asumirla como especie clave para el mantenimiento de la integridad del ecosistema; que cualquier actividad de conservación y fomento resulta de una importancia cardinal en la zona norte-litoral de Manabí y que esas acciones deben garantizarse, a partir de un genofondo local, es que se estructuran las metodologías que permitan su propagación vegetativa *ex vitro* o macropropagación (a través de estaquillas) e *in vitro* o micropropagación, con la finalidad de multiplicar los árboles plus seleccionados y establecer una plantación de mejora, que aporte material vegetal élite para un programa de fomento y mejora forestal.

3.4. Propagación *ex vitro*

3.4.1. Inducción de enraizamiento

El enraizamiento se obtuvo aproximadamente a los 15 días de la inducción en todos los tratamientos; sin embargo, la presencia de reguladores de crecimiento,

favoreció notablemente el desarrollo (Tabla 9). Pasados los 30 días las plantas ya se encontraban apropiadas para su trasplante a bolsas, (figura 5).



Figura 5. A) Miniestacas de dos meses con aparecimiento de brotes y raíces: B) Plantas AIB de 1000 mg/L C) Plantas con AIB de 500,mg/L.

Este resultado coincide con lo recomendado por Soudre *et al.*, (2008), quienes plantean que el período óptimo de enraizamiento es propio de cada especie; pero, por lo general es de 30 a 50 días, para la mayoría de las especies forestales y frutales, después de ese período no vale la pena continuar, porque las estacas que enraícen, posteriormente, tendrán raíces débiles y escasas por lo que, se debe definir un momento de levante, dependiendo de la velocidad de enraizamiento de cada especie.

La prueba de comparación, reveló diferencias significativas entre los tratamientos en cada una de las variables evaluadas, tanto ANA como AIB para la inducción, pero los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento con ANA- 1 000 mg/L y con AIB- 500 mg/L; sin embargo, estadísticamente son iguales. Estos resultados son consistentes con lo descrito por Valarezo (1984), quien menciona

que las sustancias más utilizadas para estimular el crecimiento radicular en estacas son el Ácido indolbutírico (AIB) y el Naftalenacético (ANA).

Tabla 9. Resultados del efecto de AIB y ANA en diferentes concentraciones sobre el comportamiento del enraizamiento de estaquillas de *C. alliodora*.

Tratamientos (ppm)	Enraizamiento (%)	Longitud de la raíz mayor (mm)	Número de raíces
Sin hormonas	52.00 c	10.89 ± 0,3 b	1.89 ± 7,2 b
AIB- 500	95.25 a	11.50 ± 2,1 b	3.27 ± 4,5 a
AIB-1 000	67.30 b	30.47 ± 4,1 a	1.47 ± 6,9 b
AIB- 1 500	68.20 b	11.80 ± 4,8 b	1.80 ± 4,3 b
AIB-4 000	32.58 d	17.55 ± 5,2 a	1.55 ± 5,4 b
AIB- 2 0000	56.23 bc	16.50 ± 3,8 a	1.50 ± 6,3 b
ANA-1 000	89.45 a	14.73 ± 1,5 a	2.80 ± 3,6 a
ANA-3 500	67.68 b	13.67 ± 6,3 b	1.67 ± 5,7 b
ANA-4 000	57.45 bc	12.30 ± 6,7 b	1.30 ± 7,1 b
ANA-20 000	36.70 d	14.58 ± 8,9 b a	1.58 ± 6,6 b

Letras iguales no difieren estadísticamente $P>0.05$ según prueba de Duncan

Es de señalar que a medida, que se incrementa la dosis de ANA y AIB se reduce la producción de raíces, lo cual está relacionado con el efecto inhibitor de estas auxinas en concentraciones altas. Gupta *et al.*, (1989); Ramos, (2000). Coincidiendo también con lo encontrado por Chávez *et al.*, (2000), Santelices y Cabello, (2006) y Santelices, (2007), en cuanto a que las mayores respuestas al enraizamiento de estacas para *Fuchsia magellanica* Lam. y *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser, se lograron con bajas concentraciones de AIB.

En el trabajo realizado por Latsague *et al.*, (2009) reporta que para inducir o estimular la rizogénesis, algunas especies requieren previamente un tratamiento con hormonas promotoras de raíces.

En ensayos en *Swietenia macrophylla* King, los mejores resultados alcanzaron al inducir con AIB a 1 000 mg/L para un 78,5 % con una longitud de 3,9 cm los cuales, además tuvieron mejor comportamiento en campo Sánchez, (2011), por su parte Acosta, (2006) logró el enraizamiento sólo en variantes con combinación de ANA y AIB a 1 000 mg/L para la especie *Triplaris guayaquilensis* Wedd en un 93,33% con longitud de la raíz de 2,89 cm.

Varios autores reconocen que las sustancias más recomendadas para estimular el crecimiento radicular y su inducción en especies forestales son AIB y ANA (Fermينو *et al.*, 2011; Sotolongo *et al.*, 2011).

Gómez *et al.*, (2010) evaluaron la sensibilidad de respuesta de esquejes aplicando un tratamiento con las siguientes concentraciones de AIB: 0 (testigo), 100, 200, 500 y 1 000 mg/L. Por un período de 90 días el ensayo lo establecieron en invernadero con sistema de riego nebulizado sobre cama de enraizamiento, sin control de temperatura y en sustrato de turba desinfectada. La mayor sensibilidad la observaron para la concentración de 1 000 mg/L y concluyeron que la respuesta de los esquejes a la sobrevivencia y, a la inducción de enraizamiento era similar, aunque para la concentración de 1 000 mg/L de AIB tendía a aumentar.

Concentraciones superiores a 3 000 mg/L en ambas auxinas provocaron no sólo la disminución, del enraizamiento, sino, también a la formación de callos en las bases de las miniestacas, que se presentaron en el 15% de las miniestacas en tratamientos con 4 000 mg/L, este comportamiento es similar en especies como

Berberidopsis corallina Hooker Latsague *et al.*, (2008) y *Heliocarpus americanus* var. Vásquez *et al.*, (2006).

Carvalho da Silva *et al.*, (2012) usaron dos reguladores del crecimiento: ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en las concentraciones de: 1 000; 2 000 y 4 000 mg/L para inducir la producción de raíces. El mejor regulador del crecimiento resultó ser: AIB en la concentración de 4 000 mg/L. El regulador ANA en la concentración de 4 000 mg/L resultó ser fitotóxico para las estacas de *Melaleuca alternifolia* Cheel.

Varios autores han referido el efecto negativo del callo basal en las técnicas de propagación *ex vitro* e *in vitro* Chanatasig, (2004), ya que en esa zona no se desarrollan adecuadamente las estructuras y tejidos de transporte que permiten la conexión entre la parte aérea y la radical George, (1996), o en muchos casos no se inducen raíces (Roca, 1991).

El tamaño de las raíces y el número de las mismas, es un aspecto a considerar como elementos de calidad de la miniestaca y coinciden en un número de raíces superiores a tres Ramos *et al.*, (2000) y con longitudes de 2,5 cm. son idóneas, para garantizar su sobrevivencia en campo Sánchez, (2000); Cruz *et al.*, (2005). Por otro lado, cuando se trata de propagación por estacas juveniles, algunos investigadores como Mesén, (1998) considera que con solo obtener una longitud de 1-2 cm de raíz y en un número de tres raíces por estaca, es suficiente para extraer las estacas enraizadas del propagador y ser trasplantadas en bolsas y adaptadas previamente en el vivero, antes de ser llevadas a campo definitivo, mediante este proceso; además, es necesario garantizar el mayor

porcentaje de enraizamiento con una mayor cantidad de raíces distribuidas alrededor del perímetro de la estaca, que obtener estacas con una o dos raíces largas Zorrilla, (2012). Sin embargo, en *C. alliodora* concentraciones bajas de AIB, resultan buenas para alcanzar dichos estándares a los 45 días. (Figura 6)

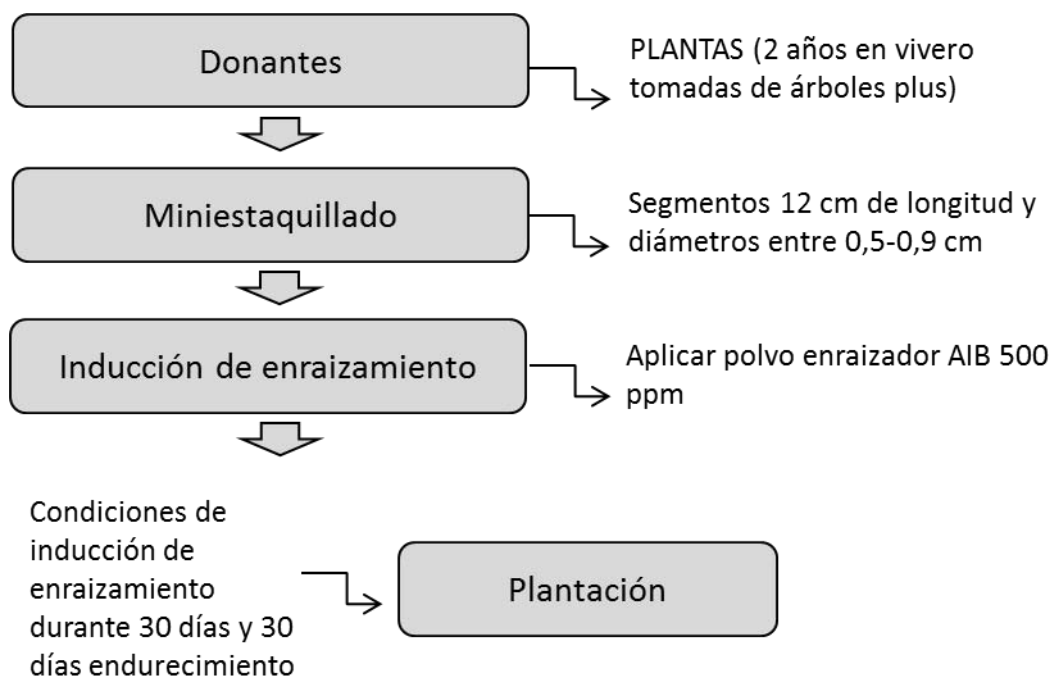


Figura 6. Propagación vegetativa de estaquillas de *Cordia alliodora*

3.5. Propagación *in vitro*

Del total de 62 árboles, sólo 21 de ellos, cumplieron con los criterios de selección y fueron marcados como árboles plus, 9 en la localidad La Unión y 13 en El Anegado, respectivamente, siendo empleados para la micropropagación.

3.5.1. Desinfección y establecimiento del material vegetal

La contaminación y fenolización de los explantes son los fenómenos más comunes y difíciles de controlar durante el cultivo *in vitro* de especies forestales, el primero de éstos, está condicionado por la presencia de “contaminantes”

superficiales y endógenos, hongos y/o bacterias latentes en los espacios inter - celulares, los cuales aparecen, bajo las condiciones ecológicas favorables del cultivo *in vitro* Lobato *et al.*, (1998). Leifert *et al.*, (1994), señalan que en su mayoría son organismos saprófitos de la flora microbiana, limitan la utilización del explante.

En el caso de la fenolización se trata de la oxidación de muchos de los compuestos resultantes de metabolitos secundarios y, además, está determinado por las características de la especie y del propio explante y muy influenciado por los productos habitualmente utilizados para la desinfección del material vegetal y puede presentarse en la etapa de la desinfección o como respuesta en la fase de establecimiento (Hartmann *et al.*, 1997).

El objetivo de esta etapa, es establecer cultivos asépticos, fisiológicamente sanos y vigorosos para iniciar el proceso de multiplicación. Muchos procedimientos para el establecimiento han sido descritos, pero en el caso de especies leñosas se hace más complejo, pues deben combinar, tanto la desinfección superficial como el control de la fenolización del explante.

La evaluación de la desinfección, se realizó pasados los 7 días después de inoculados los explantes en el medio de cultivo de establecimiento (Tabla 10).

Todas las variantes usadas resultaron efectivas para desinfectar más del 50% de los explantes iniciales. La variante de mejores resultados es la T5, porque mostró un porcentaje más alto de explantes útiles para la siguiente fase, es decir, no contaminados y “vivos”. Como se puede apreciar los explantes provenientes de brotes epicórmicos sufrieron mayores pérdidas durante la desinfección, por lo que

el porcentaje de establecidos fue inferior a los de plantas de 2 meses de edad (vivero).

Tabla 10. Resultados de la desinfección en explantes de *C.alliodora*.

Variantes	Plantas de 2 meses (%)			Brotes epicórmicos (%)		
	C	F	E	C	F	E
T1	30	15	55	35	25	40
T2	20	12	68	25	30	45
T3	25	10	65	30	40	30
T4	35	5	60	40	25	35
T5	15	5	80	20	15	65

C-contaminados; F-fenolizados; E-establecidos

En cuanto a la efectividad de los procedimientos, el análisis demostró que la desinfección con hipoclorito de sodio al 2% durante 15 y 20 minutos, proporcionó una menor tasa de contaminación; pero, provocó un aumento considerable del número de explantes que se pierden por fenolización y necrosis, lo que demuestra el efecto dañino que tienen estos desinfectantes sobre los tejidos vegetales. Al respecto, varios autores reportan que el uso de hipoclorito de sodio durante 15 a 20 minutos reduce la contaminación Romano *et al.*, (2000), pero en ocasiones puede provocar la necrosis de los tejidos que en ocasiones conduce a la muerte del explante Sotolongo *et al.*, (2003), García *et al.*, (2000), pero en otras especies ha resultado negativo, pues inhibe el crecimiento y provoca la muerte del explante Camargo y Pascual, (1999).

El tratamiento previo en solución de Vitavax® 300 Carboxín + captan Fungicida, Bayer (México) y Benlate® 50 wp Fungicida, Helm Andina, Ltda. (Colombia), contribuye también a la disminución de la contaminación en particular en las

plantas de 2 meses de edad (vivero) donde funcionó como control sanitario de los donantes y éste ha sido usado con frecuencia en la micropropagación de *Swietenia macrophylla* King (Sánchez, 2000), *Tectona grandis* LF Abdenour y Muñoz, (2005) y *Jacaranda decurrens* (Maloso *et al.*, 2012).

La oxidación fenólica, aparece como consecuencia de los cortes durante la preparación de los explantes y de la acción de los desinfectantes sobre el tejido dañado, constituye un serio problema para la supervivencia de meristemos y ápices sobre todo de especies leñosas. Estos compuestos oxidados son altamente reactivos y fitotóxicos Hu y Wang, (1983), lo cual resulta letal para los explantes. Al respecto, muchos autores consideran la fenolización como la segunda causa de merma de material donante en especies leñosas (Nagori *et al.*, 2004, García *et al.*, 2011), sin embargo en este caso no fue un factor importante en las pérdidas de material proveniente de campo lo que pudiera estar relacionado con la época de colección del explante Merkle y Nairn, (2005) y por la cantidad de compuestos del metabolismo secundario que en material rejuvenecido se encuentran en menor proporción y al uso de ácido ascórbico durante la desinfección, el cual fue suficiente para controlar la oxidación e inhibir la actividad de la polifenoloxidasas y peroxidasas, las cuales se encargan de oxidar los fenoles y transformarlos a quinonas (Saliburry, 1992 y Martin, 2002).

En cuanto, al origen del explante, se puede observar que los provenientes de plantas de dos meses de edad (vivero), muestran siempre un mayor porcentaje de establecimiento en comparación con el material proveniente de brotes epicórmicos de árbol plus seleccionado; lo cual, está relacionado con el estado

de desarrollo del donante y la edad fisiológica del explante, son de gran influencia en el éxito del cultivo *in vitro* (Lameira y Pinto, 2006; Cain y Shelton, 2000; Koenig y Knops, 2000; Pederson *et al.*, 1999).

De esta manera, también la posibilidad de establecer material directamente de campo es más baja, porque al estar expuestos los donantes a las condiciones ambientales, tienen una mayor presencia de contaminantes difíciles de eliminar durante los procesos de desinfección, Sotolongo *et al.*, (2000), no es posible aplicar tratamientos fitosanitarios previos y no contarse con plantas cultivadas bajo condiciones controladas como comúnmente se reporta en otros trabajos de este tipo. Las bacterias y hongos fueron las principales responsables de la contaminación, lo cual parece ser un comportamiento usual para las plantas leñosas, en particular las provenientes de campo, (Abdenour y Muñoz, 2005).

Sin embargo, es importante tener en cuenta, la zona de tejido que se utiliza para iniciar el cultivo *in vitro*, porque tiene gran influencia en la eficiencia de la desinfección. Los explantes tomados de plantas en crecimiento son más fáciles de desinfectar que los explantes de plantas adultas, donde la desinfección se hace muy difícil (Figura 7).

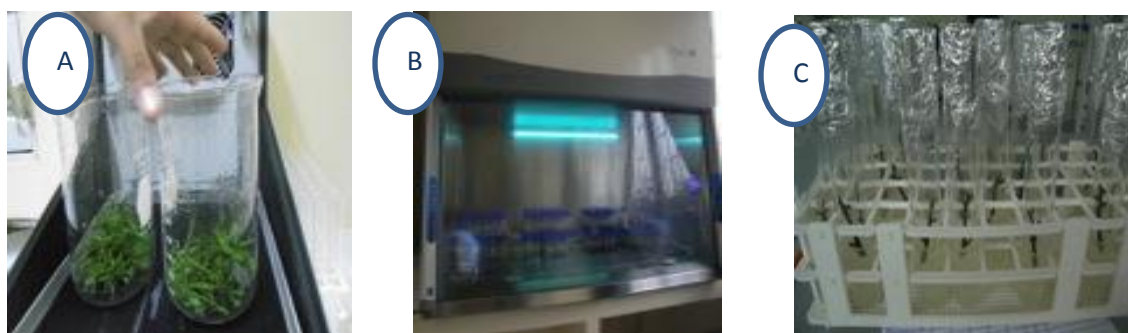


Figura 7. A)Desinfección de explantes en la zaranda orbital. B) Flujo laminar desinfectado y Explantes en incubación

3.5.2. Inducción y multiplicación

La multiplicación comenzó aproximadamente a los 20 días de cultivadas y ocurrió en todas las variantes hormonales, tanto, para los explantes provenientes de plantas de 2 meses de edad, como de los brotes epicórmicos de árbol plus (Tabla 11). Los explantes que no respondieron a la inducción de la brotación y pasadas cuatro semanas se secaron por lo que fueron desechados. La brotación sólo ocurrió en presencia de Kinetina (KIN), obteniéndose entre uno y dos brotes por explante que alcanzaron su mayor desarrollo a las seis semanas de iniciado el cultivo, (Figura 8).

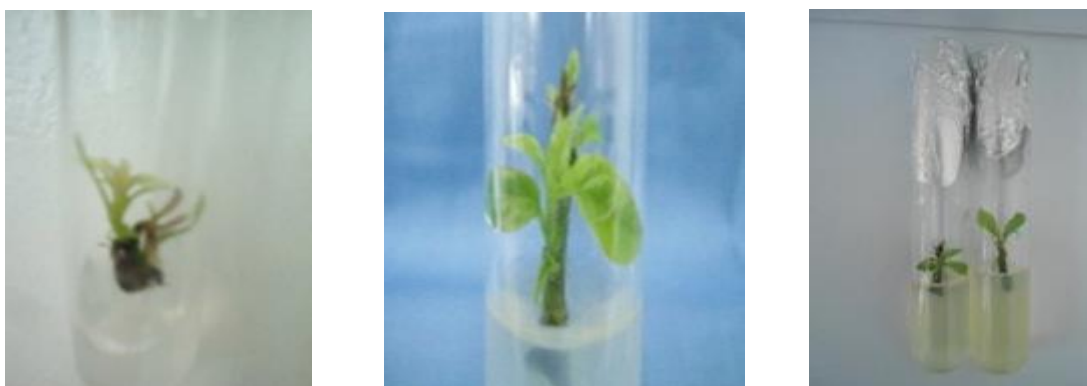


Figura 8. Brotes epicórmicos de clones seleccionados y yemas apicales y axilares de plantas de dos meses en la fase de multiplicación.

Tabla 11. Resultados de la multiplicación *in vitro* de *C. allidora* en los diferentes balances hormonales.

Variantes	Explantes brotados (%)		Promedio del número de brotes por explantes	
	Plantas de dos meses	Brotes epicórmicos	Plantas de dos meses	Brotes epicórmicos
M1	31.2 c	29.9 c	1.62 ± 0,34	1.25 ± 2,22
M2	59.2 b	53.2 a	1.75 ± 1,31	1.12 ± 3,12
M3	46.3 b	50.3 b	1.87 ± 2,11	1.50 ± 1,45
M4	60.3 a	59.3 a	2.00 ± 3,10	1.62 ± 2,63
M5	63.8 a	61.4 a	2.62 ± 2,12	2.00 ± 3,43
Testigo	0	0	0	0

Letras iguales no difieren estadísticamente $p > 0.05$ según prueba de Duncan

Según Paladinez, (2011); Krikorian, (1995) señalan que la etapa de inducción incluye la designación de un medio para estimular el inicio del desarrollo de las yemas, en esta fase del cultivo las auxinas y las citoquininas pueden ser suprimidas, sólo si el sistema es capaz de sintetizarlas, de lo contrario será necesaria su adición al medio de cultivo y esta condición de suministro exógeno es indispensable para el cultivo de las especies leñosas (Billard y Lallana, 2005; Ríos *et al.*, 2005; Quintanilla, 2007).

Los explantes de las plantas de dos meses no necesitaron del período de inducción de la brotación, esta respuesta podría estar asociada a las características juveniles de este tipo de explante, niveles hormonales endógenos bajos y, por tanto, una mayor capacidad de reacción a la inducción morfogénica exógena. En el caso de los explantes de brotes epicórmicos fue necesaria dicha etapa; aunque, se derivaban de material rejuvenecido de individuos adultos, además los brotes epicórmicos se originan de meristemoides en el tallo a los cuales se hace muy difícil romper el balance hormonal endógeno que facilite la inducción (Hernández *et al.*, 2011).

En este sentido, Acosta *et al.*, (2008) señalaron que los fitoreguladores constituyen un grupo de sustancias que, añadidas en cantidades muy pequeñas, modifican las pautas normales de desarrollo de las plantas y pueden ayudar a incrementar la productividad y mejorar la calidad del cultivo.

Las respuestas de los explantes pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos; por ejemplo, a partir de secciones de tallo cercanas a los ápices caulinares se puede producir mayor cantidad de

meristemoides que, a partir de la porción baja del tallo y, esto, también pudiera relacionarse con la respuesta a la inducción Urrego y Marín, (1997), e incluso se ha reportado que puede haber variación en los requerimientos de los reguladores de crecimiento para la organogénesis según el tipo de tejido usado como explante, aunque, éstos sean de la misma especie (Roca *et al.*, 1991, Bastos *et al.*, 2012).

A pesar que, con la fuente de explante proveniente de plantas de dos meses se obtiene mejor establecimiento (Tabla 11) su comportamiento ante la inducción fue similar al de otra fuente donante, lo que hace que los brotes epicórmicos sean una fuente donante idónea para la propagación futura de clones superiores en ensayos de mejoramiento genético en la especie (Wats *et al.*, 2003; Schuler *et al.*, 2005).

Hasta el momento, la micropropagación de *C. alliodora* se ha realizado sobre material tomado de semillas germinadas *in vitro* (Schuler *et al.*, 2005; Nuñez *et al.*, 2008), e Inducción de callos embriogénicos en hojas de clones de *C. alliodora* (laurel) Ortiz, (2012), pero una metodología, a partir de material directo de campo o material juvenil no han sido descritas González *et al.*, (2007). Por lo tanto, en la presente investigación, se realizó la micropropagación con plantas de dos meses de edad (vivero) y brotes epicórmicos de árbol plus seleccionados del campo.

En cuanto al número de brotes inducidos por tratamientos entre las diferentes variantes hormonales, estadísticamente son iguales, tanto en los explantes de dos meses de edad como los de brotes epicórmicos; sin embargo los mejores resultados se obtuvieron con explantes que provenían de plantas de dos meses de edad (Tabla11), donde se alcanzó una brotación de explante 63.8% y un

promedio del número de brotes por explantes de aproximadamente 2.62%, por lo que, siempre la combinación con mejores resultados fue la M5, pues en ella se indujeron más brotes y número de brotes / explante.

Comúnmente, para especies forestales se utiliza BAP en combinación con auxinas para inducir la multiplicación y en menor frecuencia se reportan la Kinetina (KIN), Lamiera y Pinto, (2006); Núñez *et al.*, (2008) manifiesta que parece ser un comportamiento en especies de este género *C. alliodora*, García *et al.*, (2011); Cruz y Quoirin, (2004); Pijut *et al.*, (2012), expresa que algunas especies más recalcitrantes al cultivo *in vitro*. Sin embargo, en este estudio fue permisible inducir la multiplicación con Kinetina, logrando la formación de brotes en la fase de multiplicación.

Las plantas superiores al poseer una mejor carga hormonal endógena comparada con plantas herbáceas, según Schmülling T., (2004) no requieren que se les suministre una elevada carga hormonal para establecerlas y lograr su multiplicación en condiciones *in vitro*, por ello, el resultado obtenido es favorable para la micropropagación *in vitro* de *C. alliodora*; es decir, el tratamiento cinco es el más adecuado para la etapa de multiplicación al usar KIN vs. AIB en cuanto a inducción de brotes se refiere.

Según Saucedo S., (2008) una pequeña cantidad de citoquinina puede ser sintetizada por los brotes en crecimiento y, además, se sabe que es insuficiente para inducir el crecimiento y multiplicación *in vitro* de yemas y brotes, por esta razón los medios de cultivo utilizados en micropropagación de *C. alliodora* contienen un suplemento de kinetina y auxina que favorece al

crecimiento de los explantes; por ello, al utilizar una concentración de Ms, KIN 2,5 mg/L+ AIB 0,80 mg/L, en este ensayo favoreció la multiplicación de brotes, esta interacción entre kinetina y auxina es la más adecuada para la propagación de los brotes en *C. alliodora*, en condiciones *in vitro*.

De hecho los valores de brotes/explante para *C. alliodora* fue (2-3 brotes por explantes) lo que coincide con Daquinta *et al.*, (2001), utilizando explantes consistentes de yemas obtenidas, a partir de brotes enraizados de *Tectona grandis LF*, reportaron que el efecto combinado de kinetina (kin) (1.83 mg/L) con BAP (4,44 o 6,66 mg/L) indujo una tasa de 2,4 a 2,6 nuevos brotes por explante en un período de 6 semanas. Por otra parte, Fonturbel, (2002), manifiesta que promedios bajos (2-3 brotes por explantes), han sido reportados en el cultivo *in vitro* de especies tropicales como: *Swietenia macrophylla* King, *Cedrela odorata* L, *Cedrela fissilis* vell, *Cordia verbenácea* DC y *Jacaranda decurrens*, *Khaya senegalensis* Juss, *Gmelina arborea* Roxb.

Sin embargo, Castro y González, (2002); *Eucalyptus sp*, Ríos *et al.*, (2005), *Tectona grandis LF* (Tiwari *et al.*, (2002), Yasodha *et al.*, (2005) y *Pterocarpus marsupiumr* Roxb, Husain *et al.*, (2008), indicaron que estos promedios son muy bajos en comparación con otras especies señaladas anteriormente.

Monteuuis *et al.*, (1998), Mantovani *et al.*, (2001), lograron con la adición de 1 mg/L y 2 mg/L de BA favorecer el desarrollo de un mayor porcentaje de brotes (64% y 71%,), incrementando también el número de ejes por estaca a dos y tres, respectivamente. Daquinta *et al.*, (2001), cuando combinó el BA (2 mg/L) con AIA (0,02 mg/l), observó el mayor porcentaje de brotación 80% y la mayor

producción de ejes por estaca (4,6 ejes por estaca). Además, la concentración de AIA fue incrementada a 0,2 mg/L, la brotación se disminuyó 55%, lo mismo que el número de ejes por estacas (2 ejes), a la vez se incrementó el porcentaje de microestacas que produjeron callos en lugar de brotes 45%. La kinetina (KIN) y la isopenteniladenina (2ip), aún cuando fueron evaluadas en concentraciones bajas, fueron efectivas para inducir la brotación.

Millán *et al.*, (2007), obtuvieron brotes de las especies *Chlorophora tinctoria* L y *Quercus humboldtii*, alcanzaron 80% de brotes; en esta etapa se ha comprobado que la concentración ideal de BAP es la de 1mg/L, a concentraciones mayores, se produce un aumento en la producción de brotes, sin embargo, son pocos vigorosos y la formación de callos, es también notable.

Posteriormente, Castro *et al.*, (2002) reportaron que la mayor tasa de multiplicación en *Tectona grandis* LF (teca), se obtuvo cuando los explantes consistentes de meristemos apicales obtenidos de brotes epicórmicos fueron cultivados en un medio MS suplementado con 2,22 mg/L de BAP.

Al respecto, García *et al.*, (2011), reportan que al parecer, éste es un comportamiento de determinadas familias como Meliaceae y Boraginaceae, al igual que algunas especies de leguminosas (McCown, 2000; Jha *et al.*, 2004).

En *C. alliodora*, aunque se realizaron hasta tres subcultivos, la tasa de multiplicación, nunca aumentó y se mantuvo aproximadamente en 2,5 brotes. Aunque, por norma general, en las distintas metodologías de micropropagación, se establece que una vez multiplicado el material, éste debe aumentar la tasa de multiplicación en los subsiguientes subcultivos, Ramírez *et al.*, (2003); Sotolongo

et al., (2003); Yasodha *et al.*, (2005); en otras, el comportamiento resulta ser a la mantención del número de brotes por explante Maruyama, (2006); Pérez *et al.*, (2002); Rodríguez *et al.*, (2003) e inclusive la pérdida de la respuesta morfogénica con los subcultivos Ríos *et al.*, (2005); Franck *et al.*, (2004) las cuales son llamadas por McCrown, (2000) y García *et al.*, (2011), como recalcitrantes al cultivo *in vitro*, los resultados en *C. alliodora*, indican que éste, puede ser el caso de esta especie.

3.5.3. Enraizamiento

La evaluación del enraizamiento de los brotes obtenidos de la multiplicación arrojó como resultado que en todas las variantes se indujo la rizogénesis, variando el porcentaje en cada caso para el medio E1 con 62%, E2 el 81% y E3 el 40%, mientras que el testigo no respondió al enraizamiento y éstos pasadas las tres semanas fueron desechadas. (Figura 9).



Figura 9. Brotes epicórmicos, yemas apicales y axilares de plantas de dos meses en la fase de enraizamientos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se demostró la necesidad de una fuente exógena de auxinas para el enraizamiento de los brotes, de forma general, las

más usadas en esta fase son el ANA, AIB, AIA Orellana, (1998). Sotolongo *et al.*, (2011) y Flores *et al.*, (2009), reportan que en especies forestales, el AIB tiene mejor respuesta que los demás reguladores del crecimiento.

Algunas especies de plantas, no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea Castillo, (2004). En muchas especies forestales el enraizamiento puede ocurrir al pasar las plántulas enraizadas a un medio libre de hormonas Daquinta *et al.*, (2001), lo cual puede deberse al contenido endógeno de auxinas que pueden desencadenar la rizogénesis Pelacho *et al.*, (2003); Castillo, (2006); Bernal *et al.*, (2009), además que se reconoce que esta fase tiene requerimientos nutricionales inferiores a la multiplicación, por lo que, en muchas ocasiones disminuir la concentración del medio de cultivo en esta etapa, favorece el enraizamiento (Gamboa y Abdelnour, 2011; González y Vilca, 1998).

Para *C. alliodora* el mejor medio fue aquel con AIB, no sólo por el porcentaje de enraizamiento, sino también por la morfología de las raíces, lo cual coincide con Schuler *et al.*, (2005), Núñez *et al.*, (2008), Castro y Sánchez, (2010), en los que solo una auxina es usada para el enraizamiento y donde los porcentajes de éste oscilan entre 80-95%. Millán *et al.*, (2011), demostraron en *Cedrela odorata* L., *Cedro* que el efecto del AIB en concentración de 1mg/L sobre la rizogénesis radica en el aumento del número de meristemoides que se derivan de tejidos del cambium, especialmente de las células parenquimatosas cercanas a la región más externa del floema cerca del anillo del esclerénquima, los cuales se

diferencian más tarde alrededor del sexto día en el medio de cultivo. Al igual, que trabajos realizados en el CATIE (Leakey *et al.*, 1990; Mesén *et al.*, 1992 y 1996; Mesén, 1993; Mesén y Trejos, 1998; Núñez, 1997) con varias especies, tales como: *Terminalia oblonga* (Ruiz & Pav.) (0.8% de AIB), *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav) (0.8%-1.6% de AIB) y la especie *Hyeronima alchorneoides* (1.6% de AIB); con la especie *C. iguaguana*, los mejores porcentajes de enraizamientos se obtuvieron cuando se utilizaron dosis al 0.8% (T4) y 1.6% (T5) de AIB.

3.5.4. Adaptación y endurecimiento de vitroplantas

La supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización es un indicador que ha sido planteado como muy determinante en los procesos de micropropagación, por ser ésta la última fase de la propagación acelerada de las plantas. Obtener una alta tasa de supervivencia y una buena calidad de las plantas, es importante para reducir el costo de la producción (Castillo *et al.*, 2004).

En esta fase se partió de 180 vitroplantas de las cuales sobrevivieron el 89%, transcurridos los 30 días fueron evaluadas, midiendo entre 15-20 cm de longitud, y posteriormente durante la fase de endurecimiento éstas alcanzaban 25-30 cm de altura y con un diámetro en el cuello de la raíz de 0,4 - 0,6 mm. (figura 10).



Figura 10. Adaptación y endurecimiento de vitroplantas

McCown, (2000) plantea que ésta es una de las etapas más difíciles de un sistema de propagación *in vitro*, pues las plantas regeneradas deben regresar a condiciones naturales que son fisiológicamente estresantes para plantas con finas cutículas y con una reducción en el metabolismo, dado por las condiciones *in vitro*. Las alteraciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas, ocurridas en las vitroplantas como resultado del ambiente *in vitro*, hacen que las plántulas durante las primeras semanas de la aclimatización presenten incapacidad para controlar la pérdida de agua, lo que les provoca un incremento brusco de la transpiración y que puedan alcanzar solamente tasas reducidas en la actividad fotosintética Rogalski *et al.*, (2003). Este hecho puede estar asociado a que las plantas presentan un estado fisiológico característico óptimo para las condiciones medioambientales particulares a las que están expuestas; en cuanto se presenta el estrés, las plantas reaccionan ralentizando o deteniendo sus funciones fisiológicas básicas y reduciendo su vigor Tadeo, (2000). Los valores obtenidos en la especie son similares a otras especies como *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla* para 75 y 85% de sobrevivencia Orellana, (1998), *Psidium salutare*, 75% Sotolongo, (2000) y *Eucalyptus globulus* 90% Abdelnour *et al.*, (2011), pero muy superiores al comportamiento de especies recalcitrantes como *Swietenia macrophylla* King (caoba) el 27% Azofeifa *et al.*, (2009); *Cedrela odorata* L. (cedro) Pérez *et al.*, (2006); Salazar, (2009) plantean que el porcentaje de plantas de *Agave cocui* sp (cocuy) adaptadas en esta fase fue de 60%, y las pérdidas de los explantes principalmente se debieron a daños en el sistema radical, el cual se desprendía con facilidad, dos semanas posteriores al

trasplante, las plantas se colocaron a crecer en condiciones de umbráculo donde presentaron la morfología típica de las plantas de *Agave cocui sp* (cocuy). El porcentaje de supervivencia al trasladar las plantas ya endurecidas a condiciones de umbráculo fue del 100%, donde las plantas exhibieron una morfología normal.

Otros autores Driver *et al.*, (1997), proponen realizar el enraizamiento y la aclimatación simultáneamente, trasplantando las microestaquillas directamente en el campo, después de una etapa previa de endurecimiento *in vitro*: tras la inducción del enraizamiento, las plantas aún en condiciones *in vitro* fueron sometidas a una elevada intensidad luminosa, un fotoperíodo más corto y una temperatura inferior a la normal, durante un par de semanas. Esto favorecía, la lignificación, el desarrollo cuticular y estomático del material y permitía su trasplante directo al campo en condiciones controladas de humedad, luz y nutrientes.

Resultados similares han sido mostrados en *saccharum officinarum* caña de azúcar. Durante la fase de aclimatización en este cultivo, se pueden establecer dos etapas marcadas Rodríguez, (2005): un período de lento crecimiento con baja formación de raíces y número de hojas, que caracteriza los primeros 21 días, en el cual las plántulas realizan sus funciones, a expensas de las reservas adquiridas en la fase *in vitro* y luego de esta fecha se realizan cambios en las condiciones de aclimatización, que provocan una disminución en la mayoría de las variables del crecimiento y desarrollo. Posterior a la adaptación de las plántulas a las nuevas condiciones ambientales, se aprecia un marcado incremento fundamentalmente en las masas fresca y seca.

En la fase de aclimatación se pretende que las plantas que han crecido *in vitro* y, por lo tanto, sólo han estado expuestas a un microambiente escogido por ofrecer unas condiciones mínimas de estrés y un medio para la multiplicación de las plantas, se adapten a condiciones *ex vitro* donde las condiciones no son asépticas, ni la luz, temperatura y humedad están controladas, y donde el crecimiento fue a expensas de una nutrición autotrófica y no heterotrófica como ocurre *in vitro*. Además, que se reconocen todas estas deficiencias o disfunciones provocadas por o durante la incubación *in vitro* es necesario corregirlas de forma gradual, e incluso como va a comenzar la adaptación en condiciones *in vitro*, inclusive induciendo fotoautotrofía *in vitro* mediante incrementos de la tasa de CO₂ y de irradiación en los contenedores de cultivo, a objeto de mejorar la calidad de la planta, los niveles de producción y los costes del proceso de micro propagación.

Estas características de las vitroplantas, sobre todo en especies leñosas, hacen muy complejo el proceso de adaptación o aclimatación, por lo que el control estricto de las condiciones ambientales durante esta fase es determinante en el proceso de micropropagación.

Se pudo comprobar que, el efecto de las características de los substratos utilizados sobre el porcentaje de vitroplantas de *C. alliodora*, sobrevivientes durante las primeras cuatro semanas de la adaptación fue admisible. Se considera que estos resultados, se debieron en general, a que los substratos utilizados en este experimento se caracterizaron por tener una buena estructura, permeabilidad y aireación, o sea, poseían características físicas, químicas y biológicas adecuadas.

De acuerdo con lo obtenido por los autores mencionados en páginas anteriores, el 89% de sobrevivencia alcanzado en este trabajo es aceptable, la aclimatación de vitroplantas de *C. alliodora* se logró en un período de cuatro semanas, el control de los factores ambientales es el aspecto de mayor importancia durante esta etapa, de estos, el que más influyó en el éxito de la aclimatación de vitroplantas de *C. alliodora* fue la humedad relativa, ya que el desarrollo de la plántula y dentro de éste, el proceso de alargamiento celular depende estrictamente de la turgencia de las células que no se garantiza si las pérdidas por transpiración (cuticular y estomática fundamentalmente) son mayores que la absorción de agua. Estos resultados coinciden con Pérez *et al.*, (1998) quienes recomiendan que el manejo de las plantas en esta fase debe ser gradual y sin crear traumas, si se quieren obtener plantas de calidad y homogeneidad suficiente para ser llevadas a campo. En este período ocurren la mayor cantidad de pérdidas y, según el cultivo, posterior a los 30 días se puede lograr sobrevivencias superiores al 90%. Estas diferencias fueron observadas en la fase de aclimatización de vitroplantas de *Solanum tuberosum* L. por Jiménez, (2000), así como Torres, (1999), en el cultivo de la *Gerbera*.

En el trabajo realizado por (De Fossard, 1996; Murashige, 1977; Anderson, 1980), afirman que esta fase todavía presenta problemas, que pueden implicar grandes pérdidas (marchitamiento, desecación, podredumbre de raíces) y en definitiva, una disminución de la supervivencia. La estabilidad fenotípica es esencial y la forma en que ésta puede medirse es, a través de una evaluación del comportamiento en el campo de las plantas regeneradas Martínez, (1990).

3.6. Establecimiento de la población de mejora

Un total de 213 plantas, fueron llevadas a plantación, donde se obtuvo el 5% de mortalidad, por lo que el porcentaje de establecimiento fue del 95%, considerado alto y de ellas, se evaluaron un total de 195.

Tanto, las parcelas procedentes de miniestacas, como las vitroplantas tuvieron un buen comportamiento en altura y diámetro (Tabla 12). Sin embargo, los mejores resultados en cuanto a vigorosidad alcanzaron aquellas que provenían de vitroplantas, lo que podría estar relacionado con la fuente, porque provenían de los mejores árboles plus seleccionado en la localidad La Unión y El Anegado.

Tabla 12. Resultado de las variables morfológicas en plantación.

Localidad	Altura (m)	Diámetro(cm)	Vigor			N
			E	B	R	
1. El Anegado	44,84 ± 18,77	0,94 ± 0,41	18	21	0	39
2. El Anegado	34,52 ± 22,78	0,59 ± 0,36	23	13	0	38
3. La Unión	35,72 ± 18,22	0,91 ± 0,35	21	16	1	38
4. La Unión	37,65 ± 17,51	1,03 ± 0,61	28	6	1	35
5. Vitroplantas	40,78 ± 18,32	0,69 ± 0,28	36	7	2	45
Total	38,87 ± 19,37	0,82 ± 0,43				195

Leyenda:

E = Excelente: Abundante follaje (9 a más yemas)

B = Buena: Mediano follaje (6-8 yemas)

R= Regular: Poco follaje (1-5 yemas) Quevedo, (1993)

3.6.1. Comportamiento de las miniestacas y de vitroplantas en plantación

Los resultados que se obtuvieron para *C. alliodora*, en este caso, el análisis se centró en caracterizar el desarrollo en plantación de plantas propagadas *in vitro* y miniestacas sobre la base de las mediciones de las variables diámetro del tallo, altura y vigor de la planta, a una muestra de 195 individuos.

Como se aprecia en la Tabla 12, las plantas micropropagadas tuvieron una excelentes características en cuanto a vigorosidad, que las plantas producidas por miniestacas. En lo referente, a las plantas macropropagadas, la altura y diámetro es mayor que la vitroplantas, (figura 11).



Figura 11. Plantación de plantas de macropropagación y micropropagación en el campo definitivo.

Rodríguez *et al.*, (2003), en un trabajo realizado en planta medicinal *Artemisia absinthium* L. informan que el trasplante al campo, fue satisfactorio en un 95%, donde las plantas obtenidas por micro propagación alcanzaron superiores rendimientos al momento de la cosecha, tres meses, antes que las obtenidas por el método tradicional de estacas.

Santana *et al.*, (1992) afirman que el método de micropropagación *in vitro*, presenta mejores resultados que el de estacas, para la producción de semillas de *Saccharum officinarum* L (caña de azúcar), sobre todo, en la formación de tallos.

Los resultados obtenidos en *Saccharum officinarum* L (caña de azúcar) según, Glyn, (2005) afirma que, la micro propagación permite obtener caña semilla de

elevada pureza genética, sanidad y vigor, razón por la que su uso se ha difundido en muchos países cañeros.

En *Nothofagus alpina* (Poepp et Endl) Oerst (Roble) Sabja et al., (2008), citando a (Ahuja, 1997; MacRae y Cotterill, 1997; Smith 1997), plantean que: la micropropagación vía organogénesis directa se usa en la producción comercial de diversas especies forestales por la alta capacidad de multiplicación, reversión, mantención del estado juvenil y producción de plantas con buena estructura radical, lo que permite una silvicultura altamente productiva.

Vasil, (1980), concluye que: las plantas propagadas *in vitro*, generalmente presentan un mayor crecimiento y vigor, produciendo semillas de alta calidad.

Lo anterior, está dado por varios factores que influyen en la calidad de las plantas micropropagadas y hacen que ellas tengan un mayor desarrollo en condiciones de plantación, que las plantas obtenidas por estacas. Entre, esos factores está el efecto residual de las citoquininas y auxinas, añadidas al medio nutritivo durante el proceso de cultivo *in vitro* y que favorecen la supervivencia en el campo de las vitroplantas; así, Torres, (1976), refiere que la kinetina produce un efecto residual en las vitroplantas lo que prolongó la supervivencia de plantas de *Xanthium* y mantuvo los niveles de proteína y clorofila en sus hojas.

Esto, probablemente fue debido a que las citoquininas y auxinas estimulan la síntesis de proteínas, por lo que pueden promover la maduración de los cloroplastos y retardar la senescencia de las hojas (Edwin, 1993).

Otro factor, es el efecto de la sacarosa durante el cultivo *in vitro* que incrementa la cantidad de carbohidratos almacenados en las hojas, lo que aumenta la energía

disponible para la supervivencia en el campo de las vitroplantas, que concuerda con la afirmación de Wainwright y Scrace, (1989) quienes señalan que la concentración de azúcar incrementa la cantidad de carbohidratos almacenados en los brotes y, también aumenta la energía disponible para plántulas con hojas formadas *in vitro* que actúan como órganos de reserva de carbohidratos y servirán para desarrollar hojas con mayor eficiencia fotosintética.

La homogeneidad con la que las vitroplantas salen de la aclimatación, es otro aspecto a tener en cuenta, para sustentar la afirmación de que en condiciones de plantación, éstas tienen un mayor desarrollo que las plantas obtenidas por estacas. Esto, es corroborado por Domínguez y Gómez, (2006), que en ensayos previos de aclimatación de vitroplantas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC, (Uña de gato), determinaron la susceptibilidad de la especie para adaptarse a condiciones de ambiente natural. Se seleccionó un clon con la mayor tasa de multiplicación *in vitro*, para su evaluación en la fase de aclimatación y se le sometió a mediciones de supervivencia, crecimiento en altura y vigorosidad expresado en número de hojas desarrolladas en esta fase. Los resultados permitieron obtener el 100 % de supervivencia, con tamaños de vitroplantas entre 17,07 cm y 19,53 cm en el período de pre-aclimatación y con una vigorosidad entre 7 y 14 hojas aproximadamente; características que no han tenido ninguna incidencia en la mortandad. El desarrollo posterior en diferentes substratos, no mostró diferencias significativas en el tamaño de las plantas (20,8-24,8 cm), por lo que, se las considera de tamaño homogéneo. La vigorosidad final de las vitroplantas expresadas en números de hojas, tampoco mostró diferencias significativas por

efecto de los sustratos, por lo que se las considera como plantas de vigor homogéneo para ser destinadas al campo. También debe tenerse en cuenta, también que las plantas obtenidas por micropropagación como paso previo a su traslado a plantación, pasan por un proceso de endurecimiento que las prepara para las condiciones existentes.

El objetivo principal de la aclimatación es conseguir una elevada supervivencia al trasplante, la adquisición de resistencia a las condiciones ambientales naturales y la recuperación de todas las actividades fisiológicas During y Stoll, (1996).

La importancia de establecer la plantación de mejora, con el propósito de adaptar las diferentes técnicas de micropropagación de especies arbóreas se contribuya a la conservación de los recursos forestales, mediante la instalación de bancos de germoplasma, bancos clonales y plantación, lo que proporcionará una amplia gama de material genético, brindando oportunidades para la conservación de especies forestales, estudios científicos y producción comercial. Además, sirven de base para mejorar el proceso de multiplicación de plantas de *C. alliodora* por medio de brotes epicórmicos, yemas apicales lo que abre la posibilidad de establecer un protocolo eficiente de multiplicación masiva de los clones seleccionados por el Programa de Mejoramiento Forestal. (Figura 12).

Una de las posibles vías de futuro para Ecuador, son las explotaciones forestales. En la actualidad, su productividad se ve mermada por la falta de programas de mejora genética para adaptar las especies en el entorno. En todo programa de mejora genética, la propagación vegetativa cumple un papel primordial. El cultivo

in vitro, fruto de la investigación de los últimos años se presenta como una técnica eficaz en especies recalcitrantes.

Al respecto Haines *et al.*, (1992) señala la importancia de las investigaciones sobre las aplicaciones de la biotecnología al mejoramiento de especies arbóreas forestales y las recomendaciones para el establecimiento de prioridades respecto a los objetivos de investigación en el sector, esto indica que será necesario mantener un equilibrio entre la investigación convencional y la investigación biotecnológica moderna, cuyo fomento y aplicación no deberán estar determinados por la capacidad tecnológica, sino, por las necesidades. Se deberá promover la utilización de las biotecnologías modernas para ofrecer soluciones más eficaces a los problemas ya existentes, en el marco de las prioridades establecidas por cada país.

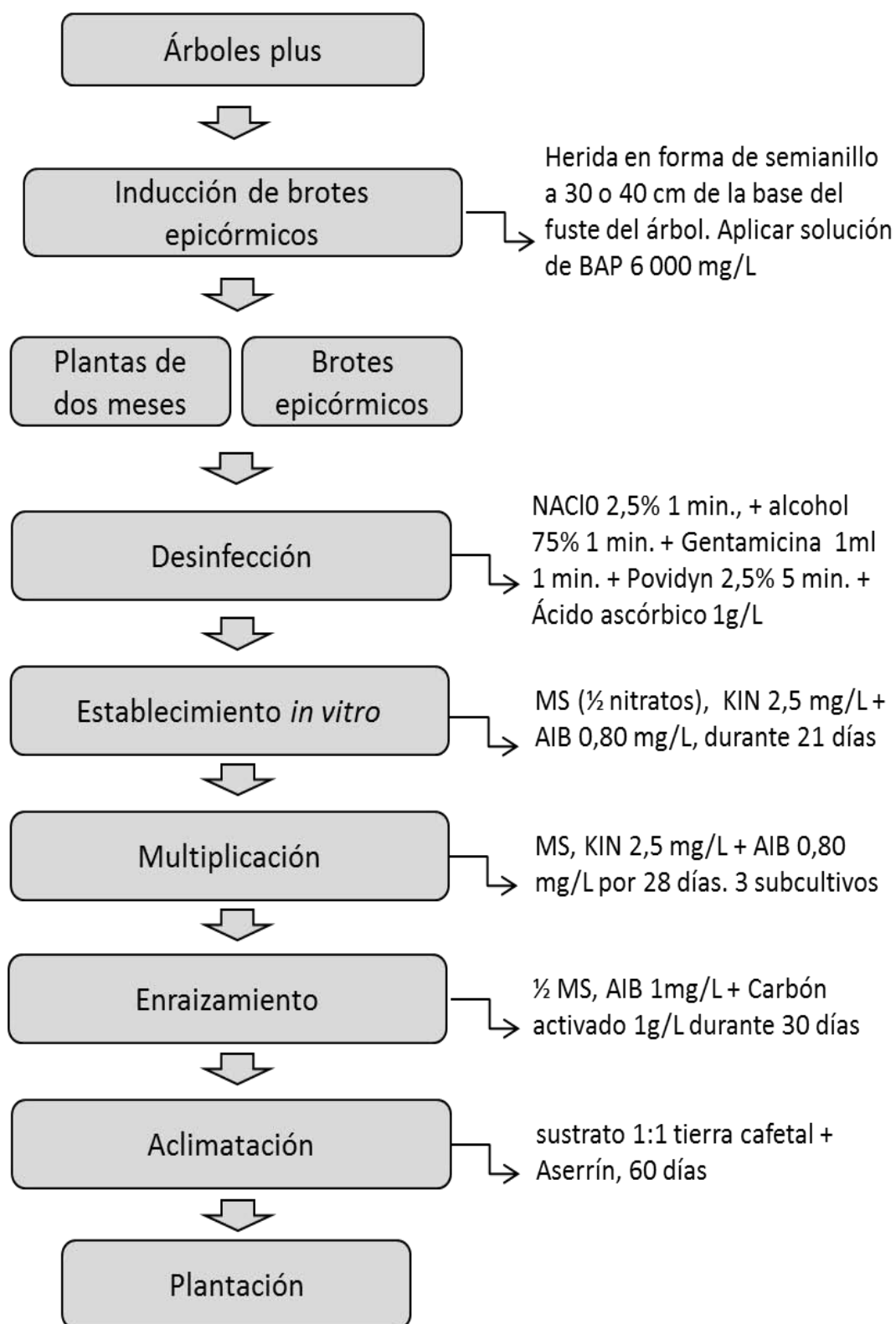


Figura 12. Metodología para la propagación *in vitro* de *Cordia alliodora*

CONCLUSIONES

1. La composición, la forma en la distribución diamétrica, así como la regeneración natural, dominancia y valor comercial de la especie *C. alliodora*, constituyen los principales indicadores que validan los efectos de la fragmentación y conversión sobre la especie en Micro región Sur de Manabí.
2. Los tipos de disturbios identificados son determinantes de la composición de la especie, la dominancia, la abundancia en la mayoría de las localidades. Excepto, en La Unión y El Anegado, que son localidades con mayor abundancia de la especie y riqueza como medida de diversidad y, además, están bien estructuradas desde las clases inferiores a las superiores.
3. Se identifica a *C. alliodora* como especie clave para realizar acciones de rehabilitación y conservación, diferenciando dos agrupaciones básicas; una, formada por los bosques húmedos y subhúmedos y la otra, por el bosque seco.
4. La propagación *ex vitro* de *C. alliodora*, se logra, a partir de miniestacas con la aplicación de AIB a 500 mg/L o ANA a 1 000 mg/L en condiciones de alta humedad durante 30 días.
5. La propagación *in vitro* de árboles plus superiores, se logra, a partir de segmentos nodales de brotes epicórmicos y plantas de dos meses de edad, en vivero en un medio MS con un balance hormonal (KIN 2,5 mg/L + AIB 0,8 mg/L) para su multiplicación, y para el enraizamiento emplear un medio

de cultivo $\frac{1}{2}$ MS, suplementado con AIB 1 mg/L + carbón activado 1 g/L durante 30 días.

6. Se establece una plantación de mejora donde las plantas micropropagadas presentaron una mayor vigorosidad, en comparación con las plantas macropropagadas.

RECOMENDACIONES

1. Proponer a los productores asociados a los sistemas agroforestales cafetaleros, la utilización de la especie *Cordia alliodora* en el fomento de sus áreas, tanto, para la rehabilitación del agroecosistema, como para la reconversión a bosques.
2. Emplear las metodologías de propagación vegetativa, propuesta como una guía para la restauración en el contexto de los sistemas agroforestales cafetaleros de la microrregión Sur de Manabí.
3. Utilizar la población de mejora, para el fomento forestal de la especie *Cordia alliodora*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelnour, A. y Muñoz, A. 2005. Micropropagación de teca (*Tectonagrandis* L.f). Kurú: Revista Forestal 2(5):1-11.
2. Abdelnour, A. y Muñoz, A. 2011. Micropropagación de teca (*Tectonagrandis*L.f). Kurú: Revista Forestal 2(5):1-11. 2011.
3. Abdelnour, E. y Muñoz, A. 1997. Micropropagación de especies forestales. X Congreso Forestal Nacional de Especies Forestales. San José de Costa Rica.
4. Acosta, M. 2006. Propagación de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) Mediante diferentes tipos de esquejes y sustratos Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín vol. 61 no. 1 Medellín Jan /June 2006.
5. Acosta, M.; Sánchez, J. y Bañon, M. 2008. Auxinas. En: J. Azcón-Bie-to y Talón M. (eds).Fundamentos de Fisiología Vegetal. Segunda edición. McGraw-Hill,S.A. Cartagena, Madrid, p.377.
6. Ahuja, M. 1997. Biotechnology in forestry: expectations and challenges. *In: Perspective of Forest Genetic Tree Breeding on a Changing World*, IUFRO World Series. Vienna, Austria. 6:45–55.
7. Álvarez, S. 2012. Influencia del balance hormonal en la multiplicación *in vitro* del plátano barraganete (*Musa Paradisiaca*) en el cantón Jipijapa.
8. Andersón, 1980. Propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae)

9. Arora, K.; Sharma, M.; Srivastava, J.; Ranade, S. A. y Sharma, A. K. (2010). Rapid *in vitro* cloning of a 40-year old tree of *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem) employing nodal stem segments. *Agroforestry Systems*, 78: 53-63.
10. Azofeifa, J.; Rojas, A. y Hine, A. 2009. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatación de vitroplantas de *Swieteniamacrophylla* King(Orden Meliaceae). *Tecnología en Marcha*.22(3):34-41.
11. Baldini, E. 1992. *Arboricultura General*. Edit. Mundi Prensa. España.
12. Baquero O.; Jaramillo E; Schuler G; 2005. Propagación in vitro de material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken (Nogal Cafetero) (en línea). *Revista colombiana de biotecnología*. Consultado el 18 de octubre de 2010. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/484/8>
13. Barrera, I. y Valdés, C. 2007. Herramientas para abordar la Restauración Ecológica de áreas disturbadas en Colombia. *Universitas Scientiarum*. Revista dela Facultad de Ciencias Edición especial II, 12:11-24.
14. Bastos, S.; Serrano, C. y Hodson de Jaramillo, E. 2012. Effects of donor plant age and explants on in vitro culture of *Cedrela montana* Moritz ex Turcz. *Universitas Scientiarum* 17(3):263-271.
15. Beals, E. W. 1984. Bray-Curtis ordination: an effective strategy for analysis of multivariate ecological data. *Advances in Ecological Research* 14: 1-55.

16. Bernal, J. A.; Rojas, R. y Hine, A. 2009. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden: Meliaceae)
17. Billard, C. E. y Lallana, V. H. 2005. Multiplicación in vitro de *Eucalyptus dunnii*. Ciencia, Docência y Tecnologia, n. 30, Ano XVI.
18. BIRF, Minambiente y Acofore. 1999. *Boletín SITEP*. Año 3 (5). Bogotá D. C.: Minambiente. 41 p.
19. Bonet, A. 1996. Biodiversidad y Biología de la Conservación en Espacios Naturales de los recursos naturales. (Ed.) Siglo Veintiuno de España Editores. Departamento de Ecología. Universidad de Alicante España. 33 p.
20. Bonfil, S. C.; P. Mendoza, y J. Ulloa. 2007. Enraizamiento y formación de callos en estacas de siete especies del género *Bursera*. *Agrociencia* 41: 103-109.
21. Boshier, D. H. 1995. Incompatibility in *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. *Canadian Journal of Botany*. 73:445-456
22. Boshier, D. H. 2010. *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken. En: Vozzo, J.A. (Ed.). Manual de Semillas de Árboles Tropicales. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Servicio Forestal. P. 405-408.
23. Botti, C. 1992. Producción de plantas in vitro, Memoria del Seminario realizado en agosto de 1992. Quito – Ecuador. 67 p.

24. Cain, M. D. y Shelton, M. G. 2000. Revisiting the relationship between common weather variables and loblolly-shortleaf pine seed crops in natural stands. *New Forests* 19: 187-204.
25. Camargo, J. T. y Pasqual, M. 1999. Efeito do escuro e do seccionamento de internódios do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido, na calogênese in vitro *Revista Brasileira de Agrociência*, 5:81-83
26. Cañal, M. J.; Rodríguez, R.; Fernández, B.; Sánchez, T. R. y Majada, J. P. 2001. Fisiología del cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal* 1: 3-9.
27. Carrizosa, M. S.; Serrano C. 1996. *Sistemas modelo para la micropropagación y conservación de especies forestales*. En: *Memorias de IV Congreso "La investigación en la Universidad Javeriana"*. Bogotá D. C.: Pontificia Universidad Javeriana, pp. 261-272.
28. Carvalho Da Silva, R.; Costacurta Antunes, M.; Roveda L. F.; Carvalho, T. C. y Biasi L. A. (2012). Enraizamento de estacas de *Melaleuca alternifolia* submetidas a diferentes reguladores vegetais [en línea]. *Semina: Ciências Agrárias* v. 33, n. 5 (2012). Disponible en: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/7630/11544> [Consulta: 5 de junio 2013].
29. Castillo, G. 2006. Propagacion *in vitro* de papa Ratona.
30. Castillo, R., Livera, M. y Márquez, G. 2004. Caracterización morfológica y compatibilidad sexual de cinco genotipos de pitahaya. *Agrociencia*. 39-42.

31. Castro R., D.; Sánchez R., G. A. 2010. Propagación Clonal *in vitro* de *Eucalyptus pellita* F. Muell a partir de árboles plus. Temas Agrarios - Vol. 15:(1) enero - junio, 34 – 43.
32. Castro, D.; y González, O. J. 2002. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis*)
33. Chanatásig, V. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Induction to somatic embryogenesis in superior clones of cacao (*Theobroma cacao* L.), presenting resistance to fungal diseases.
34. Chávez, W.; Rodríguez, V.; Boschi, C.; Molinari, J. y Vilella F. 2000. Respuestas a la aplicación de auxinas y citoquininas en el enraizamiento de estaquillas de *Fuchsia magellanica* Lam. Departamento de Producción Vegetal. Facultad de Agronomía – UBA, Buenos Aires- Argentina
35. CIAT. (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivos de tejidos en la agricultura Roca, W.M.,mroginski, L.(eds.) Cali – Colombia.979 p.
36. Clemente, M. 1999. *In Vitro Culture* (IVC) and Plant Conservation. En: A Colour atlas of Plant Propagation Conservation. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 77-86.
37. Collado, R.; Barbón, R.; Agramonte, D.; Jiménez, F.; Pérez, M.; Gutiérrez, O. y Ramírez, D. 2004. Biotecnología Vegetal Vol. 4, No. 3: 143-146.

38. Conabio.gob.mx. 2010. *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav.) Oken (en línea). Consultado el 4 de octubre de 2010, (Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/16-borag1m.pdf)
39. Condit R.; Pitman, N.; Leigh, E.; Chave, J.; Terborgh, J.; Foster B.; Nuñez, P.; Aguilar, S.; Valencia, R.; Villa, G.; Muller-Laundau, H.; Losos, E.; Hubbell, S. 2002. Beta-diversity in tropical forest trees. *Science*, 295: 666-668.
40. Costa, S. F. V.; Moura, C. A.; Alves, Ch. E. y Pessoni L. A. (2009). Propagação vegetativa de camu-camu por estaquia: efeito de fitorreguladores e substratos [en línea]. *Revista Agro@mbiente on-line* v. 3, n.2 Disponible en: <http://revista.ufrr.br/index.php/agroambiente/article/viewArticle/276> [Consulta: 23 de mayo 2013].
41. Cruz N.; Díaz, G.; Torres E. y Álava S. 2005. Avances en la encapsulación in Vitro de teca (*Tectona grandis* L.), con fines de conservación y mejoramiento genético
42. Cruz, D. R. y Quoirin, M. 2004. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados in vitro. Capa v. 14, n. 1 (2004). Rocha.
43. Cuculiza, P. 1956. Propagación de Plantas; P. L. Villanueva S.A; Lima, Perú. 289 p.
44. Cuevas, R.; López, L.; García, E. 2002. Primer registro de *Desmopsis trunciflora* (Schlecht. y cham.) G. E. Schatz (Annonaceae) para el

- occidente de México y análisis de su población en la sierra de Manantlán, Jalisco. Acta Botânica Mexicana, abril, número 058. Instituto de ecología A. C. Pátzcuaro, México. 58: 7 – 18.
45. Daquinta, M.; Ramos, L.; Capote I.; Lescano, Y.; Rodriguez, R.; Trina, D. y Escalona, M. 2001. Micropropagación de la teca (*tectonagrandis* L. F). Revista Forestal Centroamericana 35:23-28.
46. Davies, F. T., Jr. y Hartmann, H. T. 1988. The physiological basis of adventitious root formation. Acta Hort. 227:113-20
47. De Fossard, 1996. Tissue culture for plant propagators. univ. New England printery, armidale. 409 p.
48. Detwyler, 1971. Sumary and prospect. En: Detwyler, T.R. (Comp), Man's impact on environment. McGraw-Hill. Nueva York.
49. Domínguez, T. G.; Donayre G. M. L. (2006). Aclimatación de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. producida *in vitro*. Ecol. Apl. v.5 n.1-2 Lima. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-22162006000100009&script=sci_arttext
50. Driver, D., y D. Kuniyuki. 1997. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience 19:507-509.
51. Duivenvoorden, F. 1994. Vascular plant species counts in the rain forests of the middle Caquetá area. Colombian Amazonia. Biodiversity and Conservation 3: 685 – 715.

52. During, H. y Stoll, M. 1996. Stomatal patchiness of grapevines leaves I. Estimation of non uniform stomatal apertures by a new infiltration techniques. *Vitis*, 35(2): 65-68.
53. Ecuadorforestal.org. 2011. Laurel. Consultado el 27 de enero de 2012, Disponible en:
<http://www.ecuadorforestal.org/download/contenido/laurel.pdf>
54. Edwin, F. G. 1993. Components of culture media. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. F. G. Edwin (Ed.). Second Edition. Exegetics Limited. n. y. pp. 322- 326.
55. FAO-BID-INEFAN. (1998). Manual para la extensión forestal en el occidente de Pichincha. Quito: FAO-BID-INEFAN. Editorial J.
56. Fay M. F., Bunn E. y Ramsay M. M., 1999. *In Vitro* Propagation. En: A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 97-107.
57. Fermino, J.; Paulo C. P. & S. P. y Jonny E. (2011). Germinação e Propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith - FABACEAE)
58. Finegan, B; Palacios, W; Zamora, N; Delgado, D. 2001. Ecosystem-level Forest Biodiversity and Sustainability Assesments for Forest Management 32 p.
59. Flores, R.; Sánchez, F.; Rodríguez, J.; Mora, R.; Colinas, M. y Lozaya, H. 2009. Influencia de la radiación solar en la producción de semilla de

tubérculos de papa bajo cultivos sin suelo. Rev.Chapingo Serie Horticultura 15(1):25-30

60. Fonturbel, F. 2002. Micropropagación de un cultivo perenne. Portal de Biología y Ciencias de la Salud, No. 7. 9. 1-7.
61. Foster, D.R. 1993. Cambios en la estructura y composición del bosque bajo dos tratamientos silviculturales en la Comunidad de capulápan de Méndez, Ixtlán, Oaxaca, México.
62. Franck, T.; Kevers, C.; Gaspar, T.; Dommès, J.; Deby, C.; Greimers, S. y Deby D. G. 2004. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots culture on gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42:519-527.
63. Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge. Reino Unido.
64. Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2007. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. Cambridge, UK. P 617.
65. Galindo, R.; Betancur, J.; Cadena, J. 2003. Estructura y Composición Florística de Cuatro Bosques Andinos del Santuario de Flora y Fauna Guanentá-Alto Río Fonce, Cordillera Oriental Colombiana. 30 p
66. Gamboa, J. P. y Abdelnour, A. 2011. Micropropagación de melina (*Gmelina arborea* ROXB). *Agronomía Costarricense* 23:69-76.

67. Gárate, D. M. H. 2010. Técnicas de propagación por Estacas. 167 h. Trabajo de Diploma (en opción al título de Ingeniero Agrónomo). Universidad Nacional de Ucayali, Pucallpa, Perú.
68. García L. y Cazorla, J.M. 2000. Propagación masiva in vitro de *Eucalyptus saligna* Sm.
69. García, G. R.; Delgado, M.; González, Y.; González , A.; Garriga, M.; Caligari, P.D.; Quiroz, K. 2011. *In vitro* propagation of cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots Chilean Journal of Agricultural Research. 71(3):376-382.
70. García, R.; Vargas, J. J.; V. Cetinay A. Villegas. 2005. Efecto del ácido indolbutírico (AIB) y tipo de estaca en el enraizado de *Gmelina arborea* Roxb. Revista de Fitotecnia Mexicana, octubre-diciembre, año/vol. 28, número 004, Sociedad Mexicana de Citogenética, A.C. Chapingo, México, 319-326.
71. Garibaldi, C. 2008. Efectos de la extracción y uso tradicional de la tierra sobre la estructura y dinámica de bosques fragmentados en la Península de Azuero, Panamá. Panamá. 110 p. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Forestales. Universidad Hermanos Saíz Montes de Oca.
72. Gentry, H. 1985. Contrasting phytogeographic patterns of upland and lowland panamanian plants. En: Garibaldi (2008). Efectos de la extracción y uso tradicional de la tierra sobre la estructura y dinámica de bosques fragmentados en la Península de Azuero, Panamá. Panamá.

- 110 p. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Forestales. Universidad Hermanos Saíz Montes de Oca. Gentry, 1988. Changes in Plant Community Diversity and Floristic composition on Environmental and Geographical Gradients. Ann. Missouri Bot. Gard. 75(1): 2-34
73. George, E. F. 1996. Plant propagation by tis-sue culture. Part I. The Technology. 2nd. edition, UK, 3 pp.
74. Giraldo, L. A.; Fabio-Ríos, H.; Polanco, M.F. 2009. Efecto de dos enraizadores en tres especies forestales promisorias para la recuperación de suelos. RIIA 1: 41-47.
75. Glyn, L. 2005. Pests and diseases of sugarcane. SugarCaneInt. 23 (1): 3-14).
76. Gómez R, Bernard M.; Perla H. y Louis Ch. D. 2010. Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L.
77. Gonzáles, C. y Vilca, J. 1998. Micropropagación vegetativa “in vitro” de aliso (*Alnus acuminata*). Red Andina de Semillas Forestales (RADEFORCOSUDE). Cajamarca, Perú. 41 p.
78. González, R. J. A. y Peña Ramírez, Y. J. 2007. Establishment of efficient protocols formassive propagation of tropical treesfrom Mesoamerica through somatic embryogenesis.
79. Grijalva, J., X. Checa, R. Ramos, P. Barrera y R. Limongi. 2012. Situación de los Recursos Genéticos Forestales –Informe País Ecuador. Preparado por el Programa Nacional de Forestería del INIAP con aval del INIAP/FAO/MAE/MAGAP/MMRREE. Documento sometido a la Comisión

Forestal de la FAO-Roma, para preparación del Primer Informe sobre el Estado de los Recursos Genéticos Forestales en el Mundo.95 p

80. Gupta,PK,Nadgir A L,Mascarenhas AK and. Jaganathnn V. 1989. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Sciencie Letter*. 17:259-268.
81. Haines, D. M.; Kendall, J. C.; Remenda, B. W.; Breker-Klassen, M. M., y Clark, E. G. 1992. Monoclonal and polyclonal antibodies for immunohistochemical detection of bovine para influenza type 3 virus in frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest*. 4: 393-399
82. Harper, J. L. y D. L. Hawksworth. 1994 "Biodiversity: measurement and estimation (preface)".
83. Hartmann, H. T.; Kester, D. E. ; Dovies, J. T.; Geneve E, R. L. 1997. *Plant propagation principles and practices*. 6th ed. Upper Saddle River, New Jersey, USA: Prentice Hall Inc. 770 p.
84. Hartmann, H. y D. Kester. 1997. Propagación de plantas: Principios y prácticas. 760 p. Editorial Continental, Ciudad de México, México.
85. Hartmann, H; Kester, D. 1995. Propagación de plantas. Principios y prácticas. 4ª ed. Continental. México. 760p.
86. Hartmann, H; Kester, D. 1996. Propagación de plantas. Principios y prácticas. 4ª ed. Continental. México. 760p.
87. Hernández N,Pardo A, Luna F 2011 Regeneración in vitro de *Allium sativum* L. A partir de segmentos de hojas y raíces.

88. Herrera, C. M. 1993. La gestión de la diversidad biológica. En: Hacia una ciencia de los recursos naturales. (Ed.) Siglo Veintiuno de España Editores, S.A.
89. Heywood, V. H. & Dulloo, M. E. 2005. In situ conservation of wild plant species: a critical global review of good practices. En: IPGRI Technical Bulletinno. 11. Roma, Italia.
90. Hill. 1973. Método de ordenación por análisis de correspondencia.
91. Hodson D. J. E.; Ramírez, C. y Schuler, I. 2004. *Biotecnología y producción forestal sostenible*. En: Conferencia Internacional de Bosques, Colombia: País de Bosques y Vida, Santa Marta. Memorias. Bogotá D. C.: Saile, P. y M. Torres (eds), pp. 251-256.
92. Hu, C. Y. y P. J. Wang. 1983. Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures. En: Evans D. F., W. R. Sharp, P. V. Ammirato y Y. Yamada (eds.). Basic Techniques of Plant Cell Culture. Vol. 1. Techniques for Propagation and Breeding. 177-227.
93. Husain, M.K., M. Anis, and A. Shahzad. 2008. *In vitro* propagation of a multipurpose leguminous tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using nodal explants. Acta Physiologiae Plantarum 30:353-359.
94. Indacochea, G. B. 2011. Influencia de los impactos ambientales en los bosques del cantón Jipijapa, Microrregión del Sur de Manabí.
95. Jha Saurabh, Weidong Li, Ryan Chornock 2004. Citoquinina y Oganogenesis del tallo in vitro.
96. Jiménez V; Castillo J; Tavares E; Guevara E; Montiel M. 2006. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth,

through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*; 86:389–395.

97. Jiménez, F. 2000. Aclimatización de plantas "*in vitro*" y producción de minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en casas de cultivos. Tesis para optar por el grado académico de Maestro en Ciencias en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. 100 pp.
98. Jones, J. F. Swanson, Bc Wemple & Ku Snyder. (2004). Effects of roads on hydrology, geomorphology, and disturbance patches in stream networks. *Conservation Biology* 14: 76-85.
99. Keels, S., Gentry, A., y Spinzi, L. 1997. Using vegetation analysis to facilitate the selection of conservation sites in eastern Paraguay. (Biodiversity measuring and monitoring certification training, volume 2). Washington: SI/MAB. Kjaer, E.; Amaral, W.; Yanchuk, A. y L. Gaudal. 2004. Strategies for conservation of forest genetic resources. In: *Forest genetic resources conservation and management. Vol. 1: Overview, concepts and some systematic approaches.* International Plant Genetic Resources Institute, FAO, FLD, IPGRI. Rome, Italy. Pp. 5-24.
100. Kjaer, E., W. Amaral, A. Yanchuk and L. Gaudal. 2004. Strategies for conservation of forest genetic resources. In: *Forest genetic resources conservation and management. Vol. 1: Overview, concepts and some systematic approaches.* International Plant Genetic Resources Institute, FAO, FLD, IPGRI. Rome, Italy. Pp. 5-24.

101. Kléver, J. 2005. Diversidade genética, conservação in vitro de germoplasma e análise do conteúdo de DNA nuclear em palma de óleo {*Elaeis guineensis* Jacq. e *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés}
102. Koenig W. D.; Knops J. M. H. (2000). Scale of mast-seeding and tree-ring growth. *Nature* 396: 225-226.
103. Krikorian, A. D. 1995. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp 41-78.
104. Lameira, P. 2006. In vitro propagation of *Cordia verbenacea* L.(Boraginaceae). *Revista Brasileira Plantas*.
105. Lamprecht. H. 1990. *Silvicultura en los Trópicos; Los ecosistemas Forestales en los bosques Tropicales y sus especies arbóreas posibilidades y métodos para un aprovechamiento sostenido*. Traducción del alemán de Antonio Carrillo. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. Rep. Federal de Alemania. 335 p.
106. Latsague M., P. Sáez y E. Hauenstein. 2008. Inducción de enraizamiento en estacas de *Berberidopsis corallina* con ácido indolbutírico. *Bosque* 29 (3): 227-230.
107. Latsague, M.; P. Sáez & J. Yáñez. 2009. Efecto del ácido indolbutírico en la capacidad rizogénica de estacas de *Eucryphia glutinosa*. *Bosque* 30(2): 102-105.
108. Laurance W. F., Cochrane, S. 2001; Synergistic effects in fragmented landscape, Special section in *Conservation Biology*, 15, 1488-1535.

109. Laurance, 2006. Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented Communities, The University of Chicago Press, Chicago. 528 p.
110. Laurance, W. F. 2006. Reflections on the tropical deforestation crisis. *Biological Conservation* 91: 109-117.
111. Laurance, W. F. 2006. What are emerging threats?, en W. F., Laurance y C Perez (Eds). *Emerging threats to tropical forest* (pp 1-3). Chicago: The University of Chicago Press.
112. Laurance, W. F., M. A. Cochrane, S. Bergen, P. M. Fearnside, P. Delamonica, C. Barber, S. D'Angelo, T. Fernandes. 2001. The future of the Brazilian Amazon. *Science* 291:438 – 439. DOI: [10.1126/science.291.5503.438](https://doi.org/10.1126/science.291.5503.438).
113. Leakey, R. R. B., Mesén. F., Tehoundjeu, Z., Longman, K.A., Dick, J. McP., J. McP., Newton, A., Matin, A., Grace, J., Munro, R.C., Mutoka, P.N. 1990. Low-technology techniques for the vegetative propagation of tropical trees. *Commonwealth Forestry Review* 69 (3): 247-257
114. Leifert, C. y Cassells, A. 2001. Microbial hazards in plant tissues and cellculture. *In vitro Cell and Developmental Biology-Plant*. 367:133-138.
115. Leifert, C.; Morris, C.E.; Waites, W.M. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.13, p.139-183.

116. Lobato, P.E., V. Gianinazzi P, A. Trouvelot y S. Gianinazzi. 1998. The state of art of mycorrhizas and micropropagation. Adv. Hort. Sci. 10: 46-52.
117. López F., R.; Murcia R., C. I.; López M., P. A. y Valencia R., J. C. 2010. Estandarización del protocolo de desinfección de disco de hoja en la inducción de callogénesis de *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Okén (Lamiales: Boraginaceae) en condiciones *in vitro*. Rev. Invest. Univ. Quindío.; (20): 120 - 125. Armenia – Colombia
118. López, R. 2007. Micropropagación in vitro de *Guadua angustifolia* Kunth, en medio sólido y por inmersión temporal, y estudio de la aclimatación en campo. Tesis Mag. Sc. Biología Vegetal. Universidad del Quindío, Universidad Tecnológica de Pereira, Universidad de Caldas.
119. López, D; Carazo, N. 2005. La producción de esquejes. Horticultura Internacional, N° Extra 1 (ejemplar dedicado a viveros).
120. Louman, B; Quiroz, D; Nilsson, M. 2001. Silvicultura de bosques latifoliados húmedos con énfasis en América Central. Serie Técnica, Manual Técnico No. 46. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 265 p.
121. Luna, M.V.E. 2002. Inducción de respuestas morfogenéticas en *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl & Cham. Y *A. hickelii* Flous y Gausen de la región del Cofre de Perote Veracruz. Tesis. Maestría en Ecología Forestal. Instituto de Genética Forestal. Universidad Veracruzana. Xalapa, Ver. México, 64 p.

122. Lynch, P. T. 1999. Tissue Culture Techniques in Vitro Plant Conservation. En: Plant Conservation Biotechnology. Benson, E. (ed.). Taylor & Francis, London, pp. 41-62
123. MacRae, S. y P. Coterill. 1997. Macropropagation and micropropagation of *E. globulus*. Means of capturing genetic gain. Proceedings of the IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of *Eucalyptus* v2: Biotechnology applied to genetic improvement of tree species. Salvador, Brasil. pp: 102–110.
124. MAE (Ministerio del Ambiente del Ecuador). 2010. Cuarto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica. Quito, EC. Consultado 27 dic. 2011. Disponible en <http://www.ambiente.gob.ec/sites/default/files/users/jloartefls/CUARTO%20INFORME.pdf>
125. Magurran, A.E. 1989. *Diversidad ecológica y su medición*. Ed. Vedrá. Barcelona. 200 pp.
126. Maloso, M.G., Bertoni, B. W.; da Silva- Coppede, M.; de Castro-Franca, S.; Soares-Pereira, A. M. 2012. Micropropagation and in vitro conservation of *Jacaranda decurrens* Cham. Journal of Medicinal Plant Research 6(7):1147-1154.
127. Mantovani NC, Henz ET, Vestena FS. 2001. In vitro regeneration of Louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). For. Sci., 11: 93-101.

128. Martin, C. 2002. Application of 2002. Application of RAPD markers in the characterization of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation. *euphytica* .247-253.
129. Martinez P., C. 1990. Cultivo de tejidos vegetales multiplicación vegetativa "in vitro" del pino canario. Universidad de la Laguna,122
130. Maruyama, E. 2006. Tissue culture of *Swieteniamacrophylla* King(Big-Leaf Mahogany).(En)Suzuki,K.,K.Ishii,S.Sakurai,and S.Sasaki(Eds)Plantation technology in tropical forest sciencie.Springer-Verlag,Tokio,Japan.p.131-136.
131. Matos, J. 2006. Manual de Manejo de Flora Silvestre para especialistas y técnicos de áreas protegidas, Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna, Editorial Feijóo, Universidad Central —Marta Abreu de Las Villas, Villa Clara, CUBA. 229 p.
132. Matteucci, D.; Colma, A. 1982. Metodología para el estudio de la vegetación. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington D.C., USA.168 p.
133. Matthews P., 1999. Vegetative Propagation from Stem Cuttings, Leaves and Roots. En: A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 58-6
134. McCown, B. H. 2000. Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*.36(3):149-154.

135. McCune, B. & E. BEALS, 1993. History of the development of the Bray-Curtis ordination pp. 67-79. In: Fralish, R.P. McIntosh, O. L. Louckes(eds.) John T. Curtis: Fifty years of Wisconsin plant ecology. Wisconsin Academy of Sciences Art and Letters, Madison Wisconsin
136. Merkle, S. y Nairn, J. 2005. Hardwood tree biotechnology. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*.41:602-619.
137. Mesén F, Leakey RRB, Newton Ac. 1990. Propagadores de subirrigación: un sistema simple y económico para la propagación vegetativa de especies forestales. In *Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina*. Memorias, Salazar R (ed.), Managua, Nicaragua, 16-20 de octubre 1995. pp. 101.
138. Mesén, F. 1993. *Avances en la Producción de semillas Forestales en America Latina*. Managua, Nicaragua 1993.
139. Mesén, F., Trejos, E. 1998. Propagacion Vegetativa de San Juan (*Vochysia Guatemalensis* Donn, Smith), mediante enraizamiento de estacas juveniles. *Revista Forestal Centroamericana*.
140. Mesén, F.; Leakey, R.R.B; Newton, A.C. 1992. Hacia el desarrollo de técnicas de silvicultura clonal para el pequeño finquero. *El Chasqui*, 28:6-18.
141. Mesén, F.; Leakey, R.R.B; Newton, A.C. 1996. Propagadores de subirrigación: un sistema simple y económico para la propagación vegetativa de especies forestales. *In Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina*. Memorias. (Ed. Salazar. R.). Managua, Nicaragua, 1995. pp. 101-110.

142. Millán O. L.; Corredoira, E. y San José, M. E. 2011. In vitro rhizogenesis: histology of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings. *International Journal of Tropical Biology*. 59(1):447-453.
143. Millán, L. y Ballester A. 2007. Micropropagación de *Chlorofora tictoria* (L.) Gaudichaud y *Quercus Humboldtii* Bonpl. *Revista Real Academia Galega de Ciencias*. Volumen XXVL. Pags. 17-28.
144. Monteuis, O, Bon, M-C y Goh, DKS. 1998. Teak propagation By in vitro culture. *Bois et Forests des Tropiques*. 256:1-11.
145. Moreno, E. 2001. Métodos para Medir la Biodiversidad. M y T – Manuales y Tesis SEA, Zaragoza. vol.1, 83 p.
146. Mosquera, L. J.; Robledo, D.; Asprilla, A. 2007. Diversidad Florística de dos zonas de Bosque Tropical Húmedo en el Municipio de Alto Baudó, Chocó Colombia. *Acta biol. Colomb.* 12(1) Bogotá. (consulta mayo 4 de 2010).
147. Mostacedo, B., T. Fredericksen. 2000. Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal. Proyecto de Manejo Forestal Sostenible (BOLFOR). Santa Cruz de la Sierra. Bolivia. 92 p.
148. Murashige, T. 1977. Reproduction of seedless orange cultivars from undeveloped ovules raised 'in vitro'.
149. Murashige, T. y Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *En: Physiology Plantarum*. Vol. 15 (1962); p.473-497.

150. Murillo O.; Obando G.; Badilla Y. y Araya E. 2001. Estrategia de mejoramiento genético para el Programa de Conservación y Mejoramiento Genético de especies forestales del ITCR/FUNDECOR, Costa Rica. Revista Forestal Latinoamericana
151. Murillo, O.; Rojas, J.L.; Barrantes, G.; Badilla, Y.; Jiménez, M & Mesén, F. (2010). Mejoramiento genético de la teca en Costa Rica. Boletín Kurú. Instituto Tecnológico de Costa Rica. pp. 7-9.
152. Nagori, R. y Purohit, S. D. 2004. *In vitro* plant regeneration in *Annonasquamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. *Science Horticulture*. 99:89-98
153. Nichols, G.; y Nichols, M. 2003. Long- term trends in faunal recolonization after auxite mining in the Jarrah forest of South-Western Australia, *Restor. Ecology*, 11, p 261-272.
154. Nuñez S. N.; Mora S. A. y Santacruz R. F. 2008. Aplicación de técnicas de micropropagación en las especies *Cordia alliodora* A. DC (Boraginaceae).
155. Nuñez S., N. 1997. Propagación Vegetativa del Cristobal (*Platymiscium pinnatum* Benth): pilon (*Hieronyma alchorneoides* Allemo) y sura (*Terminalia oblonga* Ruiz & Pavon) mediante el enraizamiento de estacas juveniles. Tesis M. Sc., CATIE. Turrialba. Costa Rica. 150 p.
156. OIMT (Organización Internacional de Maderas Tropicales). 2002. Directrices de la OIMT para la restauración, ordenación y rehabilitación de bosques tropicales secundarios y degradados, Serie de políticas forestales No. 13.

157. Onaindia, M. 2002. Ponencia la Biodiversidad en la Gestión Forestal Sustentable. Libro Blanco de la agricultura y Desarrollo Rural del País Vasco-España. pp 27-29.
158. Orellana, M. 1998. Desarrollo de un sistema de cultivo In vitro para los explantes nodales de Caoba (*Swietenia macrophylla*. King). Tesis Mag.Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE:85 p.
159. Orozco, L. y Brumer, C. 2002. Inventarios forestales para bosques latifoliados en América Central. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica: CATIE.
160. Ortiz T. Paúl S. 2012. Evaluación de medios de cultivo para la inducción de callo embriogénico en hojas de clone de laurel blanco (*c. alliadora*), Universidad Técnica de Ambato.
161. Osorio, D. D. Jackson, P. Ugalde, C. Latorre, R. de Pol-Holz y C.M. Santoro 2009. The Hakenasa cave and its relevance for the peopling of the southern Andean Altiplano. *Antiquity* 85, en prensa.
162. Paladinez. 2011. Propagación in vitro de *Stylosanthes Capitata* Vogel : una especie de gran potencial forrajero.
163. Pardos y Gil 1986. Los huertos semilleros. ICONA 121.
164. Pederson, N.; Kush, J.S.; Meldahl, R.S. Andboyer, W.D. 1999. Longleaf pine cone cropsand climate: a possible link. Proceedings of theTenth biennial Southern Silvicultural Research Conference, Shreveport, LA. February 16-18. pp.

165. Pelacho, A.A.; Glosas, L. M.; Cueva, R. B.; Sanfeliu, J. L.; Badia, J. S.; Alins G. V. 2003. Aplicaciones del cultivo in vitro. www.etsea2.udl.es/invitro.
166. Pérez A. N. P; Alvarado C. Y.; Gómez K. R.; Jiménez G. E.; Orellana, P. P. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Vol. 1 Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. Cuba. 400 pp.
167. Pérez C, M.E. Borja L, J.C. Linares.2006. Predicciones del crecimiento en poblaciones de Pino Laricio (*Pinus Nigra* Arn. ssp. *Salzmannii*) bajo diferentes escenarios futuros de cambio climático.
168. Pérez M, B.E; Ramírez, M.R.; Núñez, P.H.G. y Ochoa, A.N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 179 pp.
169. Pérez P; Jiménez, GE. 1995. Micropropagación y fundamentos teóricos prácticos del cultivo in vitro". Conferencias en Biotecnología Agrícola. 1-10.
170. Pérez, J., Mesén, F.; Aguilar, M.; Hilje; L. 2002. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. optimización de la fase de multiplicación. Revista Forestal Centroamericana 38:67-71.
171. Pezoa, L. S. 2001 Recopilación y análisis de la variación de las temperaturas período 1965-2001 y las precipitaciones período 1931-2001 a partir de la información de estaciones meteorológicas de Chile entre los 33° y 53° de latitud sur. Tesis de grado Escuela de Ingeniería Forestal. Universidad Austral de Chile.

172. Pijut, P. M.; Beasley, R. R.; Lawson, S. S. ; Palla, K. J.; Stevens, M. E., and Wang, Y. 2012. In vitro Propagation of Tropical Hardwood Tree Species – a review (2001-2011). Propagation of Ornamental Plants Vol. 12, № 1: 25-51.
173. Pinto Sobrinho, F. de A.; Christo, G.; Guedes-Bruni, R. y Silva, F. 2009. Composição Florística e Estrutura de um Fragmento de Floresta Estacional Semidecidual Aluvial em Viçosa (Mg), Floresta, Curitiba, Pr, 39(4):793-805, Out. /Dez. 2009.
174. Prehn, D.; Serrano, C.; Berrios, CG. y Arce, P. 2003. Micropropagación de *Quillaja saponaria* Mol. a partir de semillas. Bosque. 24 (2): 3-12.
175. Quevedo, 1993. Análisis de la Producción de Viveros y de la Comercialización de Plántulas En El Área de Influencia del Cantón Quevedo, Provincia De Los Ríos Para El Establecimiento De Plantaciones De Teca (*Tectona Grandis* L.F.).
176. Quintanilla, K, M. 2007. establecimiento in vitro de loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson). Agronomía meso-americana 18: 75-84.
177. Ramírez Marcial, N., González Espinoza, M., y Williams-Linera, G. 2001. Anthropogenic disturbance and tree diversity in montane rain forests in Chiapas, México. Forest Ecology and Management, 154:11- 326.
178. Ramírez, C.; Vega, E.; Salazar, A.; Baquero, I. S.; Nieto, V.; Rodríguez, J.; Hodson de Jaramillo, E. 2004. Evaluación del proceso productivo y estandarización de protocolos para la propagación *in vitro* de *Tabebuia rosea* Bertol. D.C. (ocobo) y *Cordia alliodora* (R. & P) Oken (nogal cafetero). *Memorias Segundo Congreso Colombiano de Biotecnología*.

Bogotá D. C.: Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, pp. 419-420.

179. Ramírez, E. y Calvo, J. 2003. Caracterización de los sistemas agroforestales con café en el área de amortiguamiento de la Reserva de Biosfera La Amistad, Pejibaye de Jiménez, CR. In. Agroforestería en las Américas. 10(37-38): 69-73
180. Ramos L .G.; Cruz N.R. ; Morante C .J; Oscar Villacis Luis et.al,. 2000. Algunos avances en la morfogénesis de la teca. (*Tectona grandis*) Tesis para obtener la Maestría en Ciencias. Universidad Ciego de Ávila. Ciego de Ávila. Cuba.
181. Rebolledo C, V.; Aparicio Rentería, A.; Cruz Jiménez, H. 2006. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. Foresta Veracruzana, año/Vol. 8, No. 002. Universidad Veracruzana, Xalapa, México pp. 27-32.
182. Rios, D.; Avilés, F.; Sánchez – Olante, M.; Escobar, R.; Pereira, G. 2005. Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de microtallos de castaño (*Castanea sativa* Mill). Agricultura Técnica 65(3):258-264.
183. Ritcher H. G.; Dallwitz, M. J. 2000. Commercial tim-bers: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. In English, French, German, and Spanish. Version: 18th October 2002.
184. Roarke Donnelly · John M. Marzluff. 2004. Relative importance of habitat quantity, structure, Relative importance of habitat quantity, structure, and spatial pattern to birds in urbanizing environments

185. Roca W.M., 1991 Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*.
186. Rodríguez González, H.; Hechevarría Sosa, I.; Rodríguez Ferradá, C. A.; Rivera Amitas, M. M. 2003. Propagación *in vitro* de *Artemisia absinthium* L. en Cuba. Rev. Cubana Plant. Med. v.2003 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2003. Versión On-line ISSN 1028-4796. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962003000100003&script=sci_arttext.
187. Rodríguez, J.; Nieto, V.M. 2002. Aplicación de los métodos de estacas e injertos para la propagación vegetativa de *Cordia alliodora* (Ruíz y Pavón) Oken y *Tabebuia rosea* (Bertol.), DC. CONIF. Bogotá, Colombia. 61pp.
188. Rodriguez, R. 2005. Aclimatización de plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp, híbrido) propagadas en biorreactores de inmersión temporal (Tesis Doctoral) Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila.
189. Rogalski M; Guerra M.P; Lima da Silva A. 2003 Multiplicação *in vitro* da Ameixeira 'Santa Rosa': Efeito da citocinina BAP.
190. Rojas, S.; García, J.; Alarcón, M. 2004. Propagación asexual de plantas. Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. Ed. Produmedios. Colombia. 56 p.
191. Romano, A; Barros, S.; Martins, M. A. 2000. Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68:35-41.

192. Ruíz- Jaén, M., y Aide, M. 2005. Vegetation structure, species diversity, and ecosystem processes as measures of restoration success. *Forest Ecology and Management*, 218:159 -173.
193. Ruiz, J. y Fandiño, M. C. 2009. Estado del bosque seco tropical e importancia relativa de su flora leñosa, islas de la Vieja Providencia y Santa Catalina, Colombia, Caribe suroccidental. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 33(126): 5 -15.
194. Sabja, A. M.; Ortiz, O. y Triviño C. 2008. Avances de clonación *in vitro* de árboles adultos de raulí (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl.) Oerst.) para propagación comercial. *Agrociencia* v.42 n.5 México. *versión impresa* ISSN 1405-3195. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S140531952008000500011&script=sci_arttext.
195. Sakai.udl.es. 2010. Medios de Cultivo in vitro (en línea). Consultado el 8 de octubre de 2010. Disponible en: <http://sakai.udl.es/cursos/76304/lab/p1Medis.pdf>.
196. Salazar. 2009. Multiplicación in vitro de Agave cocui Trelease a través de yemas axilares in vitro multiplication of agave cocui trelease through axillary buds.
197. Salisbury, F. B. 1992. Fisiología vegetal. 4 ed. Mexico DF., MX. Iberoamérica. 759 p.
198. Sánchez N., Grau M., Manzanera J.M., Bueno M.A., 1999. RAPD markers for the identification of *Populus* species and *P. Tremula* clones. En: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor

99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 125-128.
199. Sánchez, A. y López, L. 2003. Clasificación y ordenación de la vegetación del norte de la Sierra Nevada, a lo largo de un gradiente altitudinal. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica 74(1): 47-71.
200. Sánchez, C.N.G. 2002. Inducción de respuestas morfogénicas en *Diospyros riojae* Gómez-Pompa en la población de Cruz Blanca. Municipio de Alto Lucero, Veracruz. Tesis. Maestría en Ecología Forestal. Instituto de Genética Forestal. Universidad Veracruzana. Xalapa. Ver. México, 67 p.
201. Sánchez, E. 2000. Propagation of Mexican cacti threatened with extinction. Cactus and Succulent Journal. 74 (1): 17-21
202. Sanchez. 2011. Selection and *in vitro* regeneration of somaclones of tree tomato (*Solanum betacea* cav. Sendt) using culture filtrates of *Colletotrichum acutatum* WITH pectinase activity. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* [online]. 2007, vol.60, n.2, pp. 3923-3937. ISSN 0304-2847.
203. Santana, I.; Nodarse, O. y Fernández Z. 1992. Estudio comparativo de la propagación *in vitro* y por estacas en cuatro variedades de caña de azúcar. Caña de Azúcar, Vol. 10(2): 51-59.) Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/canadeazucar/cana1002/texto/estudio.htm.

204. Santelices, R. 2007. Efecto del ácido indolbutírico (AIB) y la presencia de hojas en el arraigamiento de estacas de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser cosechadas en dos épocas diferentes. *Revista Ecología Austral* 17: 151-158. 2007.
205. Santelices, R. y A. Cabello. 2006. Efecto del ácido indolbutírico, del tipo de la cama de arraigamiento, del sustrato, y del árbol madre en la capacidad de arraigamiento de estacas de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Revista Chilena de Historia Natural*.
206. Sardinero, S. 2000. Classification and ordination of plant communities along an altitudinal gradient on the Presidential Range, New Hampshire, USA. *Plant Ecology* 148: 81-103
207. Saucedo S., R. L. 2008. Efecto de los reguladores de crecimiento para la propagación in vitro de la Malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). *Ciencia y tecnología*(1), 38 - 42.
208. Saucedo, S.; Ramos, L. y Reyes. T. 2007. Efecto de reguladores de crecimiento para la propagación in vitro de la Malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). *Ciencia y Tecnología* 1:17-21.
209. Scherr, S. 2003. Hambre, Pobreza y Biodiversidad en Países en Vías de Desarrollo. Documento presentado en la Cumbre de Acción de México, México. D.F., 2-3 de junio de 2003.
210. Schmülling T. 2004. Cytokinin. En Schmülling T., In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (pág. 7). Berlin: Eds. Lennarz, W., Lane, M.D.
211. Schuler, I.; Baquero, S.; Gaona, D.; Vega, E.; Ramirez, R.; Nieto, V.; Hodson, E. 2005. Propagación in vitro del material seleccionado de

- Tabebuia rosea (Bertol.) DC. (Ocobo) y Cordia alliodora (Ruiz & Pav)
Oken (Nogal cafetero). Revista Colombiana de Biotecnología 7(1): 39-50.
212. Shannon y Weaver. 1949. The mathematical theory of communication.
En: The Mathematical Theory of Communication. Shannon C.E., Weaver,
W., eds. University of Illinois Press. Urbana pp.29-125
213. Silva, D.M., R.P. Freckleton & A.R. Watkinson. 2010. The role of density
dependence in the population dynamics of a tropical palm. Ecology 80:
2635-2650.
214. Simpson EH. 1949. Measurement of diversity. Nature 163, 688.
215. Smith, D. 1997. The role of *in vitro* methods in pine plantation
establishment: the lesson from New Zealand. Plant Tissue Culture and
Biotechnol. 3(2): 63 –73.
216. Sotolongo S. 2003. Micropropagación de Psidium salutare (Myrtaceae)
Revista del Jardín Botánico Nacional 24(1-2).
217. Sotolongo S. R. 2000. Micropropagación de Psidium salutare (HBK)
Berg. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Forestales.
Universidad del Pinar del Río. Cuba.
218. Sotolongo S. R.; Geada L. G.; Cobas L. M. 2011. Fomento Forestal. (Ed)
Félix Varela. Ciudad de la Habana. Cuba. P 287.
219. Soudre, M; Mesen, F; Del Castillo, D; Guerra, H. 2008. Memoria del curso
internacional “Bases técnicas para la propagación vegetativa de árboles
tropicales mediante enraizamiento de estaquillas” IIAP, Pucallpa. Perú.

220. Suárez I; Jarma A; Ávila M. 2006. Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* De Roble (*Tabebuia rosea* Bertol Dc). Rev. Temas Agrarios. 11(2): 52 – 62.
221. Suárez, A; Compagnone R; Salazar M; Tillett S; Monache F; Di Giulio C; Bruges G. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. Journal of Ethnopharmacology. 88 (1): 11-14.
222. Tadeo, F. 2000 .Fisiología de las plantas y el estrés. En J. Azcón-Bieto y M. Talón Fundamento de Fisiología Vegetal. Ed. McGraw-Hill. Interamericana.
223. Tiwari. S. K., Tiwari, K. P. y Siril, E. A. 2002. An improved micropropagation protocol for teak. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 71:1-6. 2002.
224. Toribio, M. y Celestino, C. 2000. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. Investigaciones agrarias. (España) Fuera de Serie. No. 2.
225. Torres y, J. G. 1976. Root hormones and plant growth. Ann. Rev. Plant Physiol. 27: 435-459.
226. Torres, G. 1995. *Determinación de área con aptitud para el desarrollo de bosques productivos en la costa*. Guayaquil: INEFAN ITTO PD/25. 122p
227. Torres, J. G. 1999. Micropropagation and acclimatization of *Hedimamultiflorum*. PlantCellTiss. Org. Cult. 48:213–217.
228. Uam.es. 2010. Macronutrientes (en línea). Consultado el 04 de noviembre de 2010, Disponible en:

<http://www.uam.es/docencia/museovir/web/Museovirtual/fundamentos/nutricion%20mineral/macronutrientes.htm>

229. Urrego B, Marin A. 1997. Avances en la propagación del nogal cafetero *Cordia alliodora* (Ruiz y Pavón) a través de estacas enraizadas. En: Investigación Forestal. SMURFIT Cartón de Colombia. Informe de investigación No. 180.
230. Valarezo, R. 1984. Rooting hard to root conifers. Vol 35. página 178
231. Vargas G; García F; Castillo G; Martínez M 2008. Composición Florística de un Bosque Mesófilo del Centro de Veracruz, México.
232. Vasil, I.K. 1980. Perspectives in plant cell and tissue culture. International Review of Cytology Academic Press.
233. Vásquez Restrepo, C.; Gutiérrez-Urbe, A.M.; Alvarez-González, J. 2006. Propagación por estacas juveniles de balso blanco (*Heliocarpus americanus* L. Sin. H. Popayanensis) utilizando propagadores de subirrigación. Revista Facultad Nacional Agricultura. 59 (2).
234. Vieira De Souza, J.C. 2007. Propagação vegetativa de cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roem) por miniestaquia. Tesis Magister en Producción Vegetal. Universidad del estado del Norte de Fluminense. 54 p. En: <http://www.rapve.org>.
235. Vilanova, C. 2006. Identidad y estructura genética de la población invernante del Playerito Occidental (*Calidris mauri*) en Bahía Santa María, México.

236. Viloria, Z. 1993. Cultivo *in vitro* de nudos de guayabo (*Psidium guajava* L.). Fase I. La Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Trabajo de Ascenso 34 pp. Maracaibo, Venezuela.
237. Volis, S. and M. Blecher. 2010. *Quasi in situ*: a bridge between ex situ and in situ conservation of plants. Biodiversity and conservation 19(9):2441-2454.
238. Wainwright, H. y J. Scrace. 1989. Influence of in vitro preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on in vivo establishment. Sci. Hort. 38:261-267.
239. Watt, M.P.; Berjak, P.; Makhathini, A.; Blakeway, P. 2003. In vitro field collection techniques for eucalyptus micropropagation. Plant cell, Tissue and Organ Culture 75:233-240.
240. Wolcox, B.A. 1990. Necesidades para el establecimiento de una red mundial de áreas de conservación in situ para vegetales y animales. Dirección de Recursos Forestales, Departamento de Montes, FAO (Italia). (Sin publicar. 41 pp. Disponible en FAO, Roma)
241. Yasodha, R., Sumathi, R. y Gurumurthi, K. 2005. Improved micropropagation methods for teak. Journal of Tropical Forest Science. 17:63-75.
242. Zorrilla. 2012 Inducción y enraizamiento de brotes epicórmicos de árboles seleccionados de *Cordia alliodora* (Ruiz et Pavón), Oken (Laurel), utilizando reguladores de crecimiento.

ANEXO A

FASE MICROPROPAGACION

1. Inducción de brotes epicórmicos a partir de clones seleccionados (Aplica solución de BAP 6000 mg/L pasados 90 días)



Figura 1. A y B) Plantas o clones Seleccionadas. C) Herida en forma de semianillo 30-40cm de la base. D) Brotes epicórmicos un clon seleccionados. E) Brotes epicórmicos de clones seleccionados. F) Brotes epicórmicos de clones seleccionados G) Brotes epicórmicos de clones seleccionados. H) Brotes epicórmicos de clones seleccionados.

2.- Micropropagación (Plantas de dos meses de edad *C. alliodora*).

a.- Proceso para llevar el material de brotes epicórmicos y plantas de dos meses al laboratorio de Biotecnología Vegetal.



Figura 2. A) Plantas seleccionadas de dos meses de edad. B y C) plantas dos meses lista para cortar la yemas apicales y axilares llevar al laboratorio D) Brotes epicormicos de clon seleccionados para llevar al laboratorio. E) Brotes epicormicos identificando el clon F) Brotes epicormicos colocados en una hielera para el laboratorio.

b.- Proceso para llevar el material de brotes epicórmicos y yemas apicales y axilares de plantas de dos meses para su respectivo protocolo en el flujo laminar



Figura 3. A) Desinfección de explantes en la zaranda orbital. B) Flujo laminar desinfectado C)Explantes aplicando protocolo D) identificando los tubos de ensayo con su medio de cultivo E)Tubos de ensayo con medio de cultivo y con su tratamientos. F)Explantes listo para la siembra en su medio de cultivo. G y H)Siembra de explantes en los tubos de ensayo.

c.- Proceso para llevar el material de brotes epicórmicos y yemas apicales y axilares de plantas de dos meses para sus respectivos protocolos al área de crecimiento.



Figura 4. A Y B) Explantes listos para ser llevado a la area de crecimiento. C) Explantes en incubacion . D) Explantes con diferentes tratamiento en el area de crecimientos. E Y F) Evaluando los explantes. G y H) Explantes en multiplicacion.

d.- brotes epicórmicos de clones seleccionados y yemas apicales y axilares de plantas de dos meses en la fase de multiplicación.

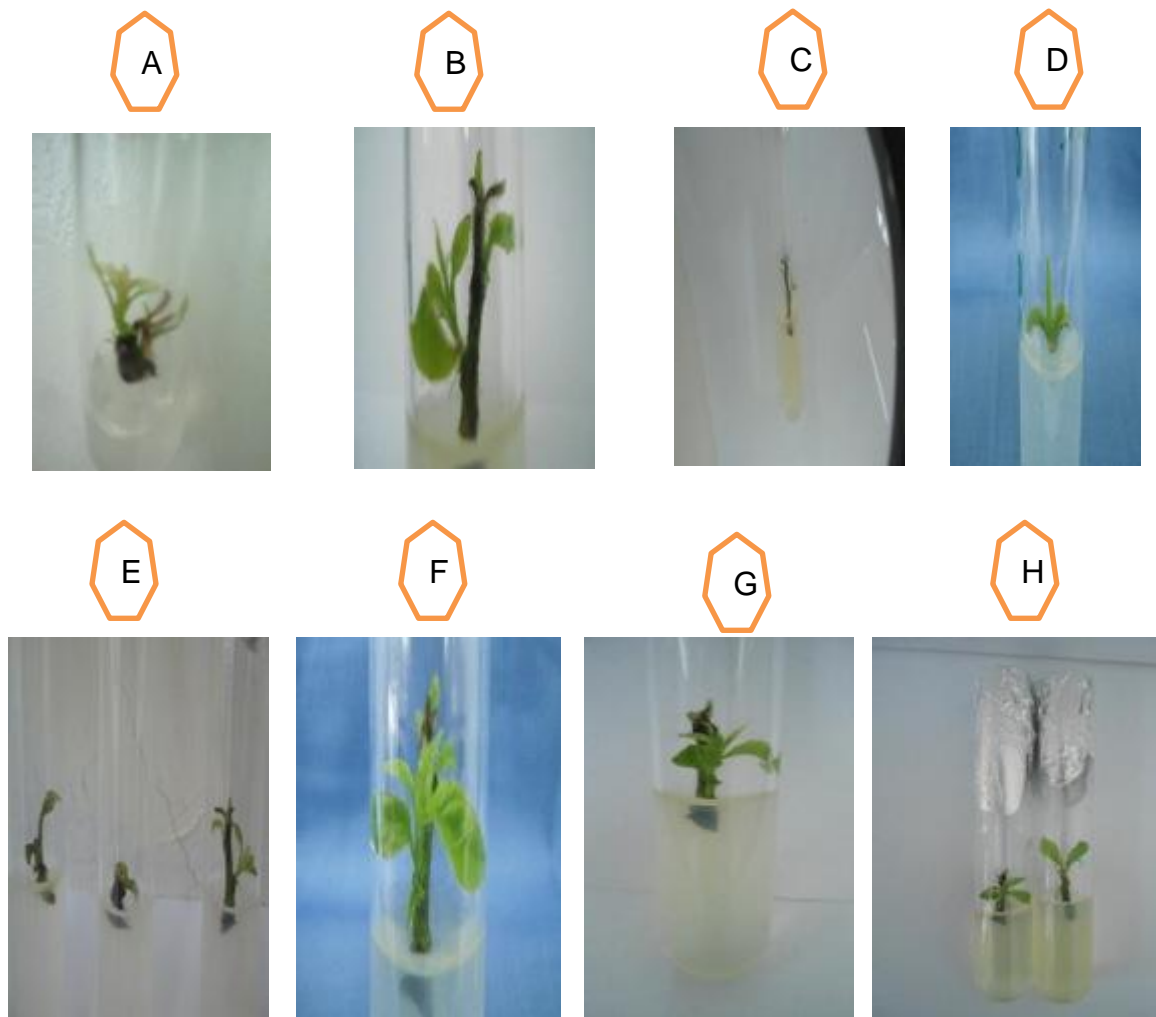


Figura 4. A Y B) Explantes en multiplicacion. C) explantes en Multiplicacion . D) Explante en multiplicacion. E Y F) . G y H) Explantes en multiplicacion.G Yh) explantes en multiplicacion.

f.- brotes epicórmicos de clones seleccionados y yemas apicales y axilares de plantas de dos meses en la fase de enraizamientos.

A



B



C



D



E



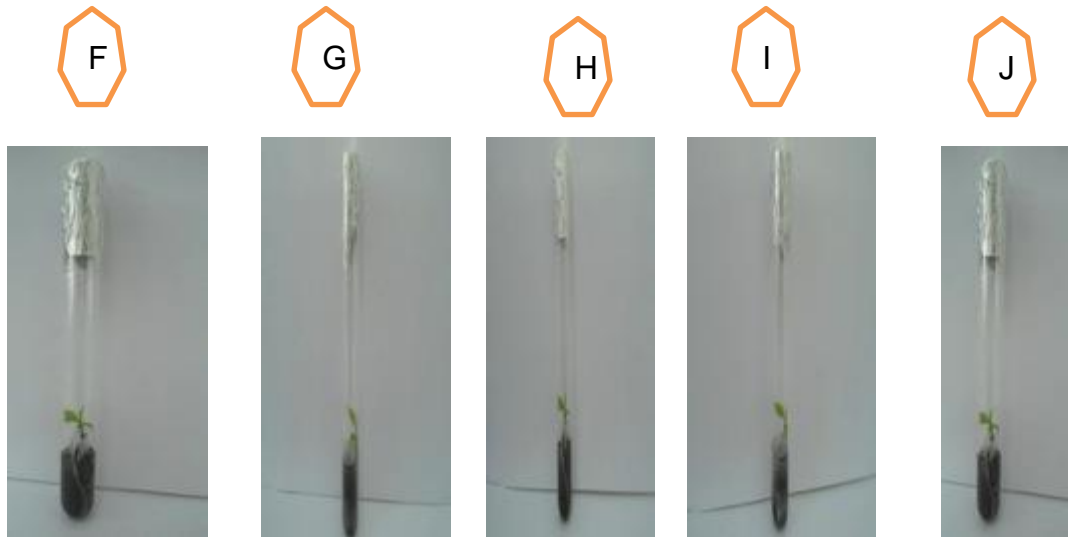
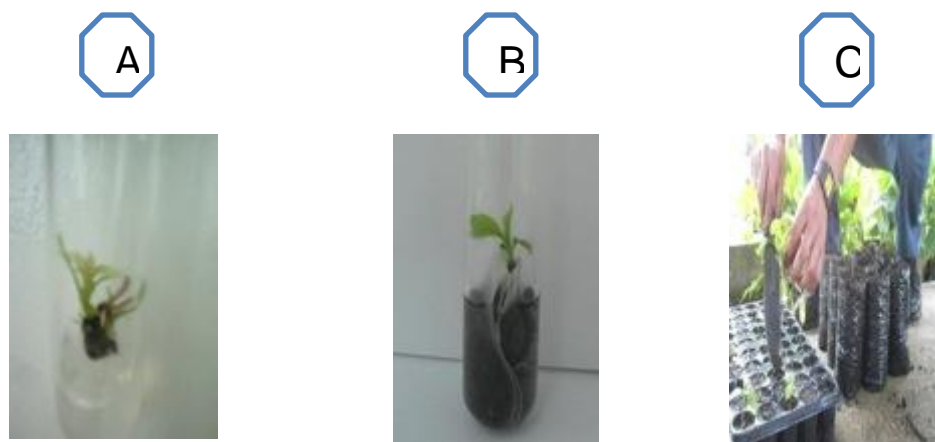


Figura 5. A Y B) Separacion de explante para enraizamientos. C y D) explante en carbon activado para enraizamiento. E) Explantes con enraizamiento. E , F,H,I yJ) Explantes con raices listo para la aclimatacion.

ANEXO B

ACLIMATACION VITROPLANTAS



D



E



F



G



H



I



Figura 6. A Y B) Plantas antes de ser aclimatadas. C y D) Siembra en bandejas. D) Bandejas colocadas en microtúnel. F) Desarrollo de las plantas de un mes después del trasplante. G) Trasplante a bolsa de plantas producidas en bandejas. H) Desarrollo de las plantas después de dos meses de aclimatación. I) Plantas lista para llevar al campo definitivo.

ANEXO C

FASE MACROPROPAGACION

MACROPROPAGACION: a) Plantas de dos años en viveros tomadas de clones selectos.



Figura 7. A) Hormonas para induccion de enraizamiento. B) Dr. Maurilio Garcia, explicando sobre la seleccion de plantas y procedimientos. C) Selección de plantas. D) Plantas seleccionadas. E Y G) Colocando nombres a los recipiente donde van ubicadas las miniestacas . H) Calibrador tomando medidas de diametro de la plantas . I) Las miniestacas se encuentran en el recipiente con fungicida vitavax.

MACROPROPAGACION: b). Plantas de dos años en viveros tomadas de clones selectos.



Figura 8. A) Mezcla de sustratos tierra de cafetal y arena. B) bandejas llena de sustratos. C) Siembra de miniestacas en sustratos. D y E) Bandeja con miniestacas sembradas. F y G) Miniestacas de un mes con aparecimiento de brotes.

MACROPROPAGACION: c). Plantas de dos años en viveros tomadas de clones selectos

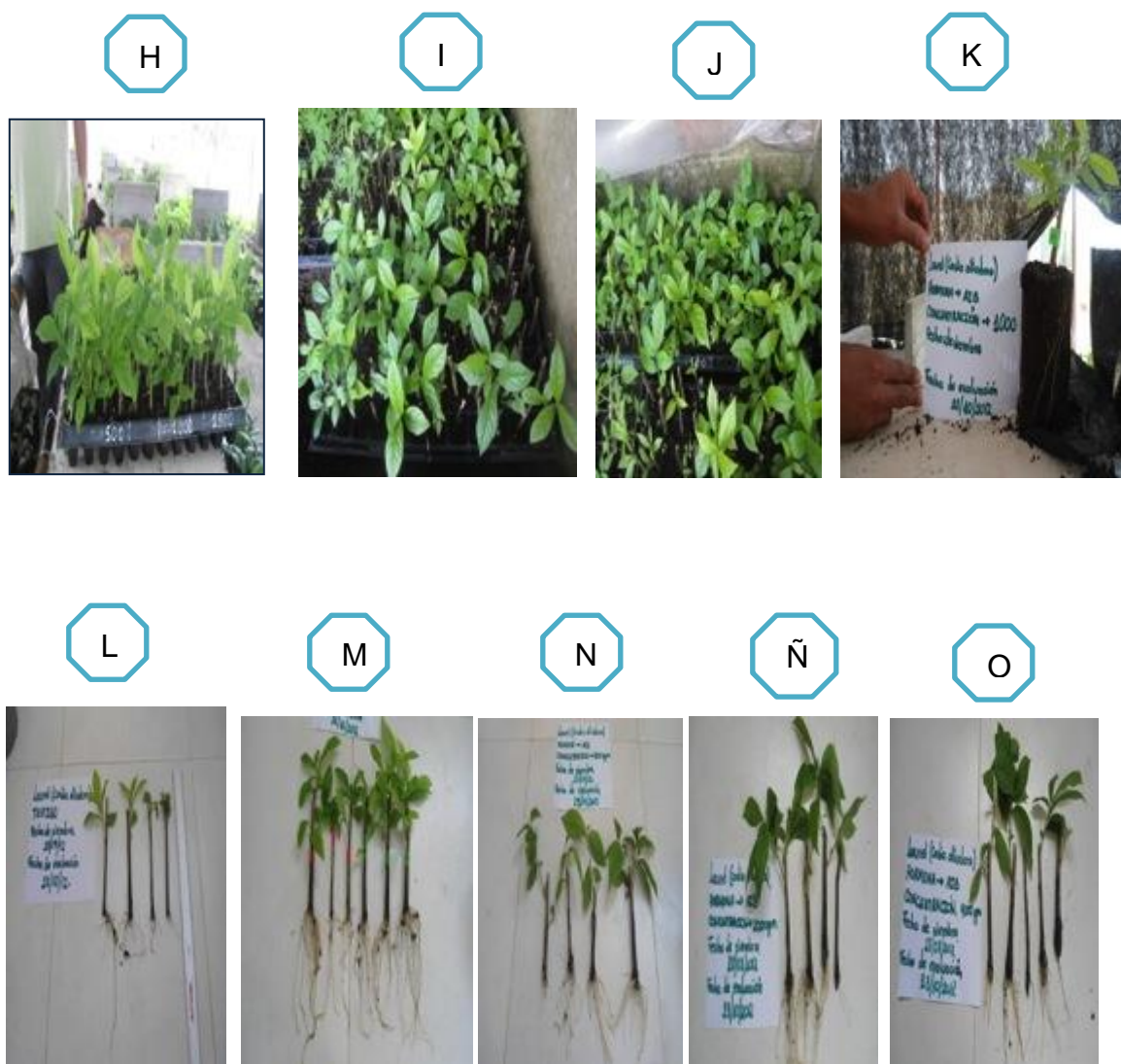


Figura 9. H Y I) Miniestacas de dos meses con aparecimiento de brotes. J) Miniestacas con diferentes dosis de hormonas de enraizamientos. K) Plantas con dosis de hormonas L) Plantas testigo con raíces. M) Plantas con AIB de 500,ppm. N) Plantas AIB de 1000 ppm. Ñ) Plantas con AIB 2000 Y O) Plantas con AIB 4000ppm.

MACRORPOPAGACION (Plantas lista en vivero para el campo definitivo.)

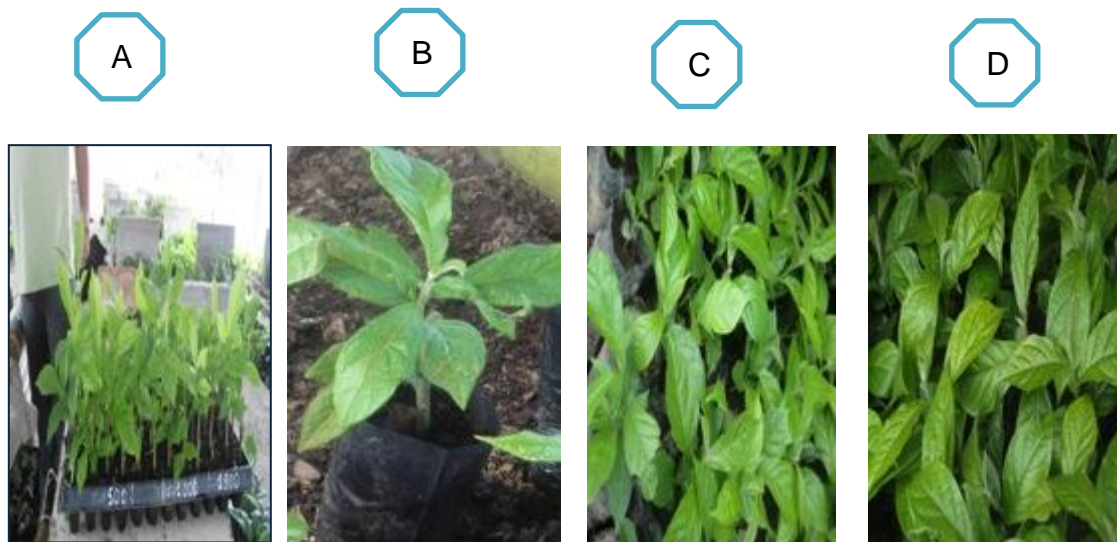


Figura 11. A) Plantas en bandeja para transplante a bolsa. B) Plantas en bolsa. C y D) Planta en bolsa lista para el campo definitivo.

ANEXO D

1.- Plantación de plantas: macropropagación y micropropagación en el campo definitivo etapa inicial.



Figura 12. A) Transporte de planta a las parcelas. B) Planta en la parcela para se plantadas. C) Plantacion en sitio definitivo. D) Plantas en sitio definitivos. E y F) Planta a los 15 dias. GY H) Plantas a los dos meses en sitio definitivos.

2.- Plantación de plantas: macropropagación y micropropagación en el campo definitivo a los tres meses



Figura 13 a. A) Plantas a traves de estacas. B y C) Plantacion en parcela . D) Plantas a los tres meses en sitio definitivos.

Figura 13 b. A) Vitroplantas. B y C) Plantación en parcela . D) Plantas a los tres meses en sitio definitivos.