

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROLIFERACIÓN Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE HUALTACO *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., PROVENIENTE DEL BOSQUE SECO DE LA PROVINCIA DE LOJA

TESIS DE GRADO PREVIO A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA FORESTAL

AUTORA:

Verónica Maribel Conde Solano

DIRECTOR:

Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

Loja - Ecuador

2015

CERTIFICACIÓN

Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

En calidad de Director de la tesis titulada “**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROLIFERACIÓN Y ENRAIZAMIENTO IN VITRO DE HUALTACO *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., PROVENIENTE DEL BOSQUE SECO DE LA PROVINCIA DE LOJA**”, de autoría de la señorita egresada de la Carrera de Ingeniería Forestal **Verónica Maribel Conde Solano**, ha sido revisada y aprobada en su integridad; por lo que autorizo su presentación y publicación.

Loja, Julio del 2015

Atentamente:



Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

CERTIFICACIÓN

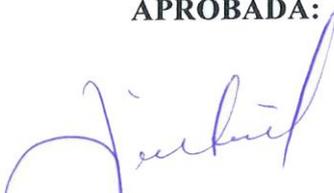
“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROLIFERACIÓN Y ENRAIZAMIENTO IN VITRO DE HUALTACO *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., PROVENIENTE DEL BOSQUE SECO DE LA PROVINCIA DE LOJA”

TESIS DE GRADO

Presentada al Tribunal Calificador como requisito parcial para la obtención del título de:

INGENIERA FORESTAL

APROBADA:


Ing. Luis Sinche Fernández, Mg. Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL CALIFICADOR


Ing. Marjorie Díaz López, Mg. Sc.
VOCAL

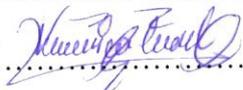

Ing. Darlin González Zaruma, Mg. Sc.
VOCAL

AUTORÍA

Yo, Verónica Maribel Conde Solano, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autora: Verónica Maribel Conde Solano

Firma: 

Cédula: 1105136863

Fecha: 21 de Julio de 2015

**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA
CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Yo, Verónica Maribel Conde Solano, declaro ser el autora, de la tesis titulada **“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROLIFERACIÓN Y ENRAIZAMIENTO IN VITRO DE HUALTACO *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., PROVENIENTE DEL BOSQUE SECO DE LA PROVINCIA DE LOJA”**, como requisito para obtener el grado de: Ingeniera Forestal, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja, para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con los cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero. Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 23 días del mes de Julio del 2015.

Firma:.....

Autor: Verónica Maribel Conde Solano

Número de cédula: 1105136863

Dirección: Loja, Ciudadela “Ciudad Victoria”, calles Tiradentes y Oswaldo Guayasamín

Correo electrónico: veris.1991@hotmail.com

Teléfono celular: 0993345369

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis: Ing. Víctor Hugo Eras Guamán Mg. Sc.

Tribunal de grado: Ing. Luis Sinche Fernández, Mg. Sc.

Ing. Marjorie Díaz López, Mg. Sc.

Ing. Darlin González Zaruma, Mg. Sc.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a todos quienes hicieron posible la culminación de la presente investigación:

A la Universidad Nacional de Loja, al Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, a través de la Carrera de Ingeniería Forestal y a sus docentes por haber contribuido con los conocimientos teóricos-técnicos para mi formación profesional.

Al Laboratorio de Micropropagación Vegetal, por el financiamiento otorgado para la realización de este estudio; especialmente al Ing. Víctor Hugo Eras Guamán e Ing. Julia Minchala Patiño, quienes me apoyaron en todo momento, con sugerencias y recomendaciones para el desarrollo de la fase de laboratorio, análisis de datos, dirección y revisión de este trabajo.

De igual forma al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal: Ing. Ruth Poma, Ing. Magaly Yaguana, Ing. Luis Muñoz, Ing. José Moreno e Ing. Cristian Valarezo, por sus orientaciones y apoyo desinteresado en todo momento, por la confianza y la dedicación de su tiempo, por haber compartido sus conocimientos y principalmente su amistad, les expreso mi agradecimiento infinito.

Al Ing. Edwin Pacheco Pineda, por su asesoría y colaboración brindada en el desarrollo de la parte estadística de la investigación.

Así mismo, a los miembros del Tribunal Calificador: Ing. Luis Sinche Fernández, la Ing. Marjorie Díaz López, e Ing. Darlin González Zaruma, por las valiosas sugerencias realizadas a la presente investigación.

Finalmente, a mis queridos familiares, amigos, y compañeros de aula, con quienes compartí muchas alegrías y gratos momentos, gracias por toda su ayuda y amistad sincera.

A todos Gracias infinitas...

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más, por estar conmigo en todo momento y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante este período.

A mi querida madre María, por ser el pilar fundamental de mi vida, quien me ha acompañado en cada paso que doy, enseñándome a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos.

A mi padre Absalón, quien con su amistad y cariño me supo apoyar para llegar a ser lo que hoy en día soy.

A mis amigas Diana y Denis, que siempre estuvieron brindándome su cariño, motivación y apoyo en las buenas y en las malas.

¡Gracias de todo corazón!

Verónica Maribel

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
CERTIFICACIÓN.....	II
CERTIFICACIÓN.....	III
AUTORÍA	IV
CARTA DE AUTORIZACIÓN	V
AGRADECIMIENTO	VI
DEDICATORIA.....	VII
RESUMEN.....	XVIII
SUMMARY	XX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Biotecnología.....	4
2.1.1. Biotecnología vegetal.....	4
2.2. Micropropagación	5
2.2.1. Ventajas de la micropropagación	5
2.2.2. Desventajas de la micropropagación.....	5
2.2.3. Fases de la micropropagación	6
2.2.3.1. Fase de elección de la planta madre y explante.....	6
2.2.3.2. Fase de establecimiento o implantación <i>in vitro</i>	6
2.2.3.3. Fase de multiplicación o proliferación <i>in vitro</i>	7
2.2.3.4. Fase de enraizamiento <i>in vitro</i>	8
2.2.3.5. Fase de adaptación al suelo o aclimatación.....	8
2.2.4. Factores que intervienen en la micropropagación.....	8
2.2.4.1. Factores físicos	9
2.2.4.2. Factores químicos.....	10
2.2.5. Reguladores de crecimiento vegetal.....	12
2.2.5.1. Auxinas.....	12
2.2.5.2. Citocininas.....	13
2.2.5.3. Giberelinas.....	13
2.3. Micropropagación de especies forestales	14
2.4. Descripción de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	15
2.4.1. Clasificación taxonómica	15
2.4.2. Descripción botánica	15
2.4.3. Ecología y usos.....	16
2.5. Estudios similares.....	16

3.	METODOLOGÍA	19
3.1.	Ubicación del área de estudio.....	19
3.1.1.	Fase de campo	19
3.1.2.	Fase de laboratorio	19
3.2.	Metodología para evaluar la desinfección de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	19
3.2.1.	Desinfección de semillas	19
3.2.2.	Medio de cultivo.....	20
3.2.3.	Siembra <i>in vitro</i> de semillas y condiciones de incubación.....	21
3.2.4.	Diseño experimental.....	21
3.2.4.1.	Especificaciones del diseño experimental	22
3.2.4.2.	Unidad experimental y evaluación	22
3.2.4.3.	Hipótesis del modelo	23
3.3.	Metodología para evaluar la desinfección e implantación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl., provenientes de campo.....	23
3.3.1.	Recolección del material vegetal.....	23
3.3.2.	Tratamiento de las estacas en el invernadero	23
3.3.3.	Preparación del material vegetal	24
3.3.4.	Soluciones antioxidantes	25
3.3.5.	Medio de cultivo.....	25
3.3.6.	Desinfección y siembra de explantes	25
3.3.7.	Diseño experimental.....	26
3.3.7.1.	Especificaciones del diseño experimental	26
3.3.7.2.	Unidad experimental y evaluación	27
3.3.7.3.	Hipótesis del modelo	27
3.4.	Metodología para evaluar la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	27
3.4.1.	Selección, escarificación de semillas y desinfección	27
3.4.2.	Medio de cultivo.....	28
3.4.3.	Siembra <i>in vitro</i> de semillas y condiciones de incubación.....	28
3.4.4.	Diseño experimental.....	29
3.4.4.1.	Especificaciones del diseño experimental	29
3.4.4.2.	Unidad experimental y evaluación	30
3.4.4.3.	Hipótesis del modelo	30
3.5.	Metodología para evaluar la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl. ..	30
3.5.1.	Medio de Cultivo.....	30
3.5.2.	Siembra <i>in vitro</i> de explantes y condiciones de incubación.....	31

3.5.3.	Diseño experimental.....	31
3.5.3.1.	Especificaciones del diseño experimental.....	32
3.5.3.2.	Unidad experimental y evaluación.....	32
3.5.3.3.	Hipótesis del modelo.....	33
3.6.	Metodología para evaluar las fases de brotamiento y enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	33
3.6.1.	Fase de brotamiento <i>in vitro</i> de explantes.....	33
3.6.1.1.	Diseño experimental.....	34
3.6.1.2.	Especificaciones del diseño experimental.....	34
3.6.1.3.	Unidad experimental y evaluación.....	34
3.6.1.4.	Hipótesis del modelo.....	35
3.6.2.	Fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes.....	35
3.6.2.1.	Diseño experimental.....	36
3.6.2.2.	Especificaciones del diseño experimental.....	36
3.6.2.3.	Unidad experimental y evaluación.....	36
3.6.2.4.	Hipótesis del modelo.....	37
3.7.	Análisis estadístico de los datos.....	37
3.8.	Metodología para la difusión de los resultados obtenidos en la presente investigación.....	38
4.	RESULTADOS.....	39
4.1.	Desinfección de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	39
4.1.1.	Porcentaje de contaminación.....	39
4.1.2.	Número de días a la contaminación.....	39
4.2.	Desinfección de explantes de campo de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl. 40	
4.2.1.	Porcentaje de contaminación.....	40
4.2.2.	Porcentaje de oxidación fenólica.....	41
4.2.3.	Porcentaje de sobrevivencia.....	42
4.3.	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl... 42	
4.3.1.	Porcentaje de germinación.....	42
4.3.2.	Número de días a la germinación.....	42
4.3.3.	Porcentaje de contaminación.....	43
4.3.4.	Porcentaje de Mortalidad.....	45
4.4.	Multiplicación <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	45
4.4.1.	Porcentaje de contaminación.....	45
4.4.2.	Porcentaje de mortalidad.....	46

4.4.3.	Número de brotes/explante, tamaño del brote (mm), altura de la planta (cm), número de hojas/explante y número de nudos/explante.....	47
4.5.	Brotamiento <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	47
4.5.1.	Porcentaje de contaminación.....	47
4.5.2.	Porcentaje de mortalidad	48
4.5.3.	Número de brotes/explante, tamaño del brote (mm), altura de la planta (cm), número de hojas/explante y número de nudos/explante.....	48
4.6.	Enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	50
4.6.1.	Porcentaje de contaminación.....	50
4.6.2.	Porcentaje de mortalidad	50
4.6.3.	Altura de la planta (cm), número de hojas/explante, número de nudos/explante, número de raíces/explante y longitud de raíces (cm)	51
5.	DISCUSIÓN.....	53
5.1.	Desinfección de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	53
5.2.	Desinfección de explantes de campo.....	54
5.3.	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl...	56
5.4.	Multiplicación <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	57
5.5.	Brotamiento <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	58
5.6.	Enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	59
6.	CONCLUSIONES.....	61
7.	RECOMENDACIONES	62
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
9.	ANEXOS.....	72

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962)...	10
Cuadro 2. Tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de <i>L. huasango</i>	22
Cuadro 3. Hoja de registro para evaluar la desinfección de semillas de <i>L. huasango</i>	22
Cuadro 4. Tratamientos aplicados en la desinfección de explantes de campo de <i>L. huasango</i>	26
Cuadro 5. Hoja de registro para evaluar la desinfección de explantes de campo de <i>L. huasango</i>	27
Cuadro 6. Tratamientos aplicados para evaluar la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. huasango</i>	29
Cuadro 7. Hoja de registro para evaluar la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. huasango</i>	30
Cuadro 8. Tratamientos aplicados para evaluar la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	32
Cuadro 9. Hoja de registro para evaluar las variables: % contaminación y % de mortalidad en fase de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	32
Cuadro 10. Hoja de registro utilizada en la evaluación a los 30, 60 y 90 días en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	33
Cuadro 11. Tratamientos aplicados para evaluar la fase de brotamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	34
Cuadro 12. Hoja de registro para evaluar las variables: % contaminación y % de mortalidad en fase de brotamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	35
Cuadro 13. Hoja de registro utilizada en la evaluación a los 30, 60 y 90 días en la fase de brotamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	35
Cuadro 14. Tratamientos aplicados para evaluar la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	36
Cuadro 15. Hoja de registro para evaluar las variables: % contaminación y % de mortalidad en fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	37
Cuadro 16. Hoja de registro utilizada en la evaluación a los 30, 60 y 90 días en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	37
Cuadro 17. Matriz de medidas resumen para el análisis de la información.	37

Cuadro 18. Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas a los tres meses en el ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	47
Cuadro 19. Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas a los tres meses en el ensayo de brotamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	49
Cuadro 20. Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas en el ensayo de enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	52

Índice de Figuras

Figura 1. Atributos botánicos de la especie <i>Loxopterygium huasango</i> a) Árbol con follaje, b) Hojas y c) Flores	15
Figura 2. Proceso de selección y limpieza de semillas de <i>L. huasango</i>	20
Figura 3. Desinfección de semillas de <i>L. huasango</i> en la cámara de flujo laminar.	20
Figura 4. Preparación del medio de cultivo para la siembra de semillas de <i>L. huasango</i> ..	21
Figura 5. Siembra <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. huasango</i> para la evaluación de los tratamientos de desinfección aplicados.	21
Figura 6. Colecta de estacas de <i>L. huasango</i> para la obtención de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales.	23
Figura 7. Manejo de estacas de <i>L. huasango</i> en el invernadero.	24
Figura 8. Preparación de los explantes de campo de <i>L. huasango</i> para la desinfección y siembra <i>in vitro</i>	24
Figura 9. Desinfección de explantes de campo de <i>L. huasango</i> en la cámara de flujo laminar.	25
Figura 10. Inoculación <i>in vitro</i> de explantes de campo de <i>L. huasango</i> para la evaluación de los tratamientos de desinfección aplicados.	26
Figura 11. Métodos de escarificación aplicados para evaluar la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. huasango</i>	28
Figura 12. Inoculación de semillas para la evaluar la germinación <i>in vitro</i> de <i>L. huasango</i>	29
Figura 13. Distribución del medio de cultivo en frascos de vidrio.....	31
Figura 14. Inoculación <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>	31
Figura 15. Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	39
Figura 16. Representación gráfica del número de días a la contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.....	41
Figura 17. Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la desinfección de explantes de campo de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	41

Figura 18. Porcentaje promedio de oxidación fenólica de los diferentes tratamientos aplicados en la desinfección de explantes de campo de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	41
Figura 19. Porcentaje promedio de germinación de los diferentes tratamientos aplicados en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	42
Figura 20. Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	43
Figura 21. Curva de germinación acumulativa de los distintos tratamientos aplicados para la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	44
Figura 22. Porcentaje promedio de mortalidad de los diferentes tratamientos aplicados en la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	45
Figura 23. Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	46
Figura 24. Porcentaje promedio de mortalidad de los diferentes tratamientos aplicados en la multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	46
Figura 25. Porcentaje promedio de mortalidad de los diferentes tratamientos aplicados en el brotamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	48
Figura 26. Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en el enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	50
Figura 27. Porcentaje promedio de mortalidad de los diferentes tratamientos aplicados en el enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	51

Índice de Anexos

Anexo 1. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de desinfección de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	72
Anexo 2. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de desinfección de explantes de campo de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	74
Anexo 3. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de germinación <i>in vitro</i> de semillas <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	76
Anexo 4. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	79
Anexo 5. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de brotamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	83
Anexo 6. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	92
Anexo 7. Imágenes de la contaminación y fenolización en el ensayo de desinfección de explantes de campo de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	97
Anexo 8. Imágenes del ensayo de germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	98
Anexo 9. Imágenes del ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	99
Anexo 10. Imágenes del ensayo de brotamiento <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	100
Anexo 11. Imágenes del ensayo de enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de <i>Loxopterygium huasango</i> Spruce ex Engl.	101
Anexo 12. Imágenes de la toma de datos de los diferentes ensayos durante la investigación	101
Anexo 13. Imágenes de la socialización de la tesis al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.	102
Anexo 14. Imágenes de la socialización de los resultados de la tesis a los estudiantes de Quinto año de la Carrera de Ingeniería Forestal	102
Anexo 15. Tríptico para la difusión de los resultados de la tesis	103

**“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA PROLIFERACIÓN Y
ENRAIZAMIENTO IN VITRO DE HUALTACO *Loxopterygium huasango* Spruce ex
Engl., PROVENIENTE DEL BOSQUE SECO DE LA PROVINCIA DE LOJA”**

RESUMEN

La micropropagación vegetal es una herramienta útil para la conservación de especies amenazadas, pues mediante las técnicas de cultivo *in vitro* se puede incrementar el número de individuos por unidad de superficie de cualquier especie objeto de conservación. En este contexto la micropropagación de la especie *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., se plantea como una alternativa de propagación vegetal, ya que esta técnica permite tener un mayor conocimiento de los factores fisiológicos y ambientales involucrados en la formación de órganos adventicios, mediante la propagación *in vitro*.

Bajo esta perspectiva se realizó la presente investigación **“Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento *in vitro* de Hualtaco *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., proveniente del bosque seco de la provincia de Loja”**, la misma que consistió en desarrollar ensayos de laboratorio para la desinfección de semillas y explantes de campo, germinación *in vitro* de semillas, multiplicación, brotamiento y enraizamiento de explantes provenientes de plántulas obtenidas *in vitro*, contribuyendo de esta manera a generar información para el establecimiento de protocolos de propagación *in vitro* de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

La presente investigación se desarrolló en el marco del proyecto **“Generación de protocolos para la propagación *in vivo* e *in vitro* de genotipos élites de especies forestales nativas y promisorias para la reforestación en la región sur del Ecuador”** en dos fases: fase de campo y fase de laboratorio; durante el periodo comprendido entre noviembre 2013 hasta diciembre del 2014, la fase de campo correspondió a la recolección de material vegetal en los sectores: Lucarqui – Bramaderos (cantón Paltas), Puente Internacional – Vizin (cantón Macará) y Limones (Zapotillo); y la segunda fase se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

En todos los experimentos se utilizó el medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con diversos reguladores de crecimiento. En el ensayo de desinfección de semillas se empleó hipoclorito de sodio (cloro comercial) en tres concentraciones (25, 50 y 75%), con tres tiempos de inmersión (5, 10 y 15 min) respectivamente, donde el 50% hipoclorito de sodio durante 5 minutos fue el mejor tratamiento para controlar la contaminación. Para la desinfección e implantación *in vitro* de explantes de campo, se realizó la colecta del material vegetal en los cantones Zapotillo, Macará y Paltas, la desinfección se realizó empleando hipoclorito de sodio (cloro

comercial) en tres concentraciones (15, 20 y 25%) con dos tiempos de inmersión (5 y 10 min) respectivamente, pero ninguno de los tratamientos ensayados permitió controlar la contaminación de los explantes de campo. Para la germinación *in vitro* se aplicó tres métodos de escarificación (sin escarificación, física y mecánica) con tres concentraciones de AG₃ (0; 0,5 y 1 mg/L), alcanzándose el mayor porcentaje de germinación 77,78% en el tratamiento sin escarificación y la adición de 1 mg/L de AG₃.

Para los ensayos de multiplicación, brotamiento y enraizamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales), se utilizó plántulas germinadas *in vitro* de 4 a 5 cm de altura y de 1 a 2 nudos para la obtención de los explantes. En el ensayo de multiplicación *in vitro* se utilizó tres citocininas: benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN) e isopentiladenina (2ip), en dos concentraciones 1 y 2 mg/L respectivamente, resultando la citocinina 2ip en concentración de 1 mg/L el mejor tratamiento. Para el brotamiento *in vitro* se utilizaron las citocininas BAP, KIN y 2ip en concentración de 1 mg/L, suplementadas con sulfato de adenina 5 y 25 mg/L y agua de coco 0 y 20%, lográndose los mejores resultados con 1 mg/L 2ip + 5 mg/L sulfato de adenina y 0% de agua de coco. Para el enraizamiento *in vitro* se probó tres auxinas: ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB) en tres concentraciones (0,5; 1 y 1,5 mg/L) respectivamente, alcanzándose los mejores resultados con 1,5 mg/L AIA, pues se logró inducir el mayor número de raíces formadas por explante.

SUMMARY

The plant micropropagation a useful tool for the conservation of threatened species, then through the techniques of in vitro culture can increase the number of individuals per unit area of any species subject to conservation. In this context micropropagation *Loxopterygium huasango* species Spruce ex Engl., It is proposed as an alternative plant propagation, since this technique allows a better understanding of physiological and environmental factors involved in the formation of adventitious organs, by in vitro propagation.

From this perspective the present research was conducted "Biotechnological processes for in vitro proliferation and rooting Hualtaco *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., from the dry forest in the province of Loja", the same that was to develop laboratory tests to disinfect seeds and explants field, seed germination in vitro, multiplication, sprouting and rooting of explants from plantlets in vitro, thus contributing to generate information for the establishment of protocols in vitro propagation of *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

This research was conducted under the project: "Generation of protocols for in vivo and in vitro propagation of elite genotypes of native forest species and promising for reforestation in the southern region of Ecuador" into two phases: phase field and laboratory; the period from November 2013 to December 2014, the field phase corresponded to the collection of plant material in the sectors: Lucarqui - Bramaderos (Paltas county), International Bridge - Vizin (Macará county) and Limones (Zapotillo county); and the second phase was conducted in the Laboratory of Plant Micropropagation of the National University of Loja.

The basal culture medium MS (Murashige and Skoog 1962) was used in all experiments, supplemented with various growth regulators. In the test seed disinfections sodium hypochlorite (commercial chlorine) was used in three concentrations (25, 50 and 75%), with three immersion times (5, 10 and 15 min), respectively, where 50% sodium hypochlorite for 5 minutes was the best treatment to control pollution. For disinfection and in vitro explant field implantation, the collection of plant material was performed in Zapotillo, Macara and cantons Paltas, Disinfection is performed using sodium hypochlorite (commercial chlorine) in three concentrations (15, 20 and 25%) with two immersion times (5 and 10 min), respectively; but none of the treatments tested allowed pollution control explants field. For germination in vitro three methods applied scarification (without scarification,

physical and mechanical) with three concentrations of AG_3 (0; 0,5 y 1 mg/L), reaching the highest percentage of 77.78% germination in the treatment without scarification and adding 1 mg/L of AG_3 .

For multiplication tests, sprouting and rooting in vitro explants (shoot tip and nodal segments), in vitro germinated seedlings was used 4 to 5 cm height with 1 to 2 knots, to obtain explants. In their in vitro multiplication tests three cytokinins are used: benzylaminopurine (BAP), kinetin (KIN) and isopentiladenina (2ip), into two concentrations 1 and 2 mg/L respectively, cytokinin 2ip resulting in concentration of 1 mg/L the best treatment. For in vitro sprouting cytokinin BAP were used. KIN and 2ip in concentration of 1 mg/L, supplemented with adenine sulfate 5 y 25 mg/L and coconut water 0 to 20%, achieving the best results with 1 mg/L 2ip + 5 mg/L adenine sulfate and 0% of coconut water. For in vitro rooting three tested auxins: naphthaleneacetic acid (ANA), indole acetic acid (AIA) and indolebutyric acid (AIB) at three concentrations (0,5; 1 and 1,5 mg/L) respectively, the best results being achieved with 1.5 mg/L AIA, as it was able to induce the highest number of roots formed per explant.

1. INTRODUCCIÓN

Los bosques secos tropicales son ecosistemas que se encuentran distribuidos en las tres regiones tropicales, con aproximadamente 1 048 700 km², de estos se estima que el 54,2 % se encuentra en América del Sur, el área restante se divide casi por igual entre América del Norte y Central, África y Eurasia (Miles *et al.* 2006).

En Ecuador los bosques secos se encuentran en el centro y sur de la Región Occidental de los Andes, en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Guayas, El Oro y Loja. Originalmente cerca del 35 % (28 000 km²) del Ecuador occidental estaba cubierto por bosque seco, se estima que el 50 % habría desaparecido (Aguirre y Kvist 2005).

Los bosques secos del suroccidente del Ecuador están caracterizados por poseer una alta diversidad y una extraordinaria cantidad de especies endémicas de diferentes grupos taxonómicos (Linares-Palomino *et al.* 2010), junto a los bosques del noroccidente del Perú constituyen “El Centro de Endemismo Tumbesino”, considerada una de las regiones más importantes del planeta por su riqueza biológica y endemismo, y uno de los puntos calientes de biodiversidad del planeta, esta región es considerada como un EBA (Área Endémica de Aves) (Paladines 2003).

En el Ecuador el estado de conservación de los bosques secos es crítico, debido a la explotación forestal a la que han sido sometidos, así como por su conversión en áreas agrícolas y ganaderas, especialmente en la última mitad del siglo XX (Vázquez *et al.* 2005).

Los bosques secos del suroccidente de la provincia de Loja, se ubican en áreas con una alta presencia humana, la cual representa el 60 % de la población rural de la provincia de Loja (Aguirre y Kvist 2005). Esta presencia se debe a que estas formaciones se encuentran sobre suelos aptos para la producción agrícola por lo que han sido intervenidos desde siglos pasados (Hocquenghem 1998 citado por Aguirre 2006), sin embargo, Aguirre y Kvist (2005) y Paladines (2003) mencionan que la mayor intervención se ha venido dando en las últimas décadas, sufriendo una constante degradación causada por la explotación selectiva de especies maderables de alto valor económico como: *Tabebuia crisantha*, *Loxopterygium huasango*, *Bursera graveolens*, entre otras, las mismas que son representativas de la Región Sur del Ecuador, según Aguirre y Delgado (2005) y por otra parte el sobrepastoreo de ganado caprino y bovino, lo cual afecta la regeneración natural, alterando de esta manera la dinámica del bosque.

Actualmente el Ministerio del Ambiente viene trabajando en la restauración forestal a nivel nacional, con la finalidad de mantener, recuperar la conectividad y funcionalidad de los ecosistemas, especialmente los más frágiles y degradados, mediante El Plan Nacional de Restauración Forestal, cuyo objetivo es aportar de manera efectiva a la conservación, recuperación de los servicios ecosistémicos y al manejo sustentable de los recursos forestales, así como, al mejoramiento de la calidad de vida de la gente, el fortalecimiento del desarrollo humano y económico.

Este programa, en conjunto con esfuerzos complementarios de otras instituciones gubernamentales como los GAD's (provinciales y parroquiales) son la base para fortalecer los procesos de restauración y recuperación del recurso forestal, la protección del recurso hídrico y del suelo en el Ecuador. La meta principal del Plan Nacional de Restauración Forestal es reforestar 500 000 ha durante el periodo 2014 – 2017, utilizando especies nativas de interés para la biodiversidad y de uso no maderable (MAE 2014).

La reforestación con especies nativas constituye una herramienta promisoría para la restauración de ecosistemas degradados en la Región Sur del Ecuador; sin embargo, es necesario tener un mejor conocimiento de la ecología, silvicultura y la biología reproductiva de las especies forestales nativas del bosque seco; por ello, el mejoramiento de los conocimientos en técnicas de propagación constituye un aspecto fundamental en el proceso de restauración (Aguirre *et al.* 2006).

La micropropagación vegetal se plantea como una alternativa de propagación vegetal, ya que esta técnica permite tener un mayor conocimiento de los factores fisiológicos y ambientales involucrados en la formación de órganos adventicios, mediante la propagación *in vitro*. De esta manera la obtención de protocolos de micropropagación se convierte en una herramienta útil para la conservación de especies amenazadas, ayudando así a mantener la biodiversidad, pues mediante las técnicas de cultivo *in vitro* se puede incrementar el número de individuos por unidad de superficie de cualquier especie objeto de conservación.

Bajo esta perspectiva, se realizó la presente investigación **“Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento *in vitro* de Hualtaco *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., proveniente del bosque seco de la provincia de Loja”**, la misma que consistió en desarrollar ensayos de laboratorio para la desinfección de semillas y explantes de campo, germinación *in vitro* de semillas, multiplicación, brotamiento y enraizamiento de

explantes provenientes de plántulas obtenidas *in vitro*, contribuyendo de esta manera a generar de información para el establecimiento de protocolos de propagación *in vitro* de la especie forestal en estudio.

La investigación se desarrolló en el marco del proyecto **“Generación de protocolos para la propagación in vivo e in vitro de genotipos élites de especies forestales nativas y promisorias para la reforestación en la región sur del Ecuador”** en dos fases: fase de campo y fase de laboratorio; durante el periodo comprendido entre noviembre 2013 hasta diciembre del 2014, la fase de campo correspondió a la recolección de material vegetal en los sectores: Lucarqui – Bramaderos (cantón Paltas), Puente Internacional – Vizin (cantón Macará) y Limones (Zapotillo); y la segunda fase se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

Los objetivos que orientaron la presente investigación fueron los siguientes:

Objetivo General

Contribuir a la generación de procesos biotecnológicos, que permitan la proliferación y enraizamiento *in vitro* de la especie forestal *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl, proveniente del Bosque Seco de la provincia de Loja, a partir de semillas, ápices caulinares y segmentos nodales.

Objetivos Específicos

- Evaluar la desinfección de semillas y explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., aplicando distintas concentraciones y tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio, durante la fase de implantación de los explantes.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones hormonales, para la fase demultiplicación de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.,provenientes de plántulas obtenidas *in vitro* o del invernadero.
- Ensayar diferentes concentraciones hormonales para la fase de brotamiento y enraizamiento de ápices caulinares y segmentos nodales de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, docentes y estudiantes de la Carrera de Ingeniería Forestal

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Biotecnología

La biotecnología se refiere a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (Convention on Biological Diversity 1992).

La biotecnología comprende un conjunto de técnicas aplicables a diversas actividades de la sociedad, cuya base fundamental es multidisciplinaria, con disciplinas básicas como la biología celular, la biología molecular, la bioquímica, la genética, la microbiología, la inmunología, la ingeniería química y la ingeniería de procesos (Roca y Ramírez 2000).

2.1.1. Biotecnología vegetal

La biotecnología vegetal es una extensión de la tradición de modificar las plantas, con una diferencia muy importante, esta permite la transferencia de una mayor variedad de información genética de una manera más precisa y controlada (Suárez *et al.* 2006).

Según Roca y Ramírez (2000) la biotecnología vegetal comprende una serie de técnicas que incluyen:

- Las técnicas de cultivo de células y tejidos *in vitro*, muy utilizadas para la clonación de plantas y la transformación genética
- Las técnicas de ADN recombinante, que permiten hacer las construcciones genéticas para la transformación de plantas
- Los marcadores moleculares que permiten "marcar" los genes de interés; para la construcción de mapas genéticos y para estudios de caracterización y filogenéticos.

La biotecnología es una herramienta nueva que se está desarrollando en distintos campos, en forma creciente y a escala global. En el sector forestal, cumple con dos objetivos básicos: el uso de los recursos genéticos y su mejoramiento en las plantaciones forestales, y el mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales para la conservación (Soto *et al.* 2010).

2.2.Micropropagación

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones (Castillo 2008).

La micropropagación constituye la principal aplicación comercial del cultivo de tejidos vegetales, esta técnica posibilita la obtención y cultivo de plantas a gran escala. Se realiza bajo estrictas condiciones de esterilidad en un medio sintético nutritivo y con control de temperatura, luz y fotoperíodo (Rivero 2011).

Frid (2009) y Segretín (2010) manifiestan que la micropropagación clonal se constituye en uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se la usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales.

2.2.1. Ventajas de la micropropagación

Rivero (2011) señala algunas de las ventajas que ofrece de la micropropagación vegetal son:

- Propagación vegetativa rápida y a gran escala
- Uniformidad seleccionada del material clonado
- Multiplicación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales
- Reducción en el tiempo de multiplicación y en el espacio requerido para tal fin
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado
- Introducción rápida de nuevos cultivares
- Conservación de germoplasma
- Facilidades para el intercambio internacional de material vegetal

2.2.2. Desventajas de la micropropagación

Se requiere de personal especializado, infraestructura y equipos especiales, la adquisición de productos químicos es costosa y difícil especialmente en países con pocos recursos económicos. Por otra parte existe poca literatura relacionada al cultivo "*in vitro*" de especies forestales, pues generalmente la respuesta inicial de algunas especies o genotipos

es complicada, ya que el tiempo que se quiere es de 12 a 18 meses para adecuar las condiciones a cada especie o genotipo (Mejía 1994, Gonzáles y Vilca 1998).

Según Watadet *al.* (1992) citado por Tapia (2004), esta técnica presenta varias dificultades, las más frecuentes al introducir los explantes en cultivo *in vitro* son:

- Contaminación endógena y superficial de los explantes cultivados *in vitro*.
- Pardeamiento y ennegrecimiento del medio de cultivo y de los explantes (oxidación), lo que usualmente les causa la muerte. Este fenómeno es conocido en el caso de especies que naturalmente contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles, se produce por liberación de fenoles al medio de cultivo al producirse heridas en el tejido.
- Ausencia de brotación de yemas axilares bajo cultivo *in vitro*.
- Hiperhidricidad de los tejidos.

2.2.3. Fases de la micropropagación

Remache (2011), menciona que dentro del proceso de micropropagación se pueden diferenciar varias fases, tales como: 1) Elección de la planta madre (donante) y explante, 2) Establecimiento o implantación *in vitro*, 3) Multiplicación o proliferación *in vitro*, 4) Enraizamiento *in vitro* y 5) Adaptación al suelo o aclimatación

2.2.3.1. Fase de elección de la planta madre y explante

Durante esta etapa se elige la planta madre a partir de la cual se obtiene el explante, el cultivo prácticamente puede iniciarse a partir de cualquier parte de la planta. Sin embargo Jiménez (1998) menciona que la fuente inicial de material vegetal es determinante para el éxito en el establecimiento de los mismos y se aconseja utilizar plantas sanas y vigorosas.

2.2.3.2. Fase de establecimiento o implantación *in vitro*

Una vez seleccionado el mejor explante, es necesario desinfectarlo superficialmente, para evitar la contaminación por microorganismos como bacterias y hongos, que pueden crecer en el medio de cultivo y competir con el explante. Para la desinfección se pueden emplear diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes, entre otros.

La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan, en gran medida, por las características del explante; pero en la práctica,

generalmente se establecen experimentalmente por ensayo y error (Villalobos y Thorpe 1991).

Marín (1997), menciona que el inicio del cultivo es una fase muy delicada en la que la porción de tejido vegetal que sirve de inoculo (explante) debe sobre sobrevivir al aislamiento del resto de la planta original y comenzar el crecimiento *in vitro*.

El medio de cultivo debe proporcionar al explante todo lo que necesita para vivir y desarrollarse: nutrientes (sales minerales y compuestos orgánicos como azúcares y vitaminas) y reguladores de crecimiento que estimulen su desarrollo. Existen dos factores que son particularmente importantes en el establecimiento del cultivo: el explante y la esterilización.

Los ingredientes del medio en el que se cultivará el explante dependen de la respuesta que se busque obtener. Si se desea proliferación de brotes axilares se añadirán citocininas y si se desea obtener callos se utilizarán auxinas. Generalmente se usa sacarosa como fuente de carbono y minerales dependiendo del tipo de planta. El medio basal más usado para esta etapa es el medio MS (Medio Murashige-Skoog) (Castillo 2008). La fase del establecimiento *in vitro* termina cuando se logra tener cultivos en crecimiento.

2.2.3.3.Fase de multiplicación o proliferación *in vitro*

Durante la fase de multiplicación se espera observar que los explantes que sobrevivieron la fase anterior originen nuevos brotes con varias hojas. Periódicamente estos brotes se tienen que subcultivar en un nuevo medio para aumentar el número de plantas, esta actividad se debe realizar en una cámara de flujo laminar o en un lugar que permita mantener condiciones asépticas.

En esta etapa los medios de cultivo, los reguladores del crecimiento como auxinas, giberelinas y citocininas y las condiciones de crecimiento juegan un papel muy importante sobre la multiplicación clonal de los explantes, ya que se pretende lograr la mayor tasa de multiplicación vegetativa (Remache 2011).

Jácome (2012) menciona que la fase de multiplicación o proliferación comprende dos etapas:

1) Etapa de inducción: implica el empleo de altas concentraciones de reguladores del crecimiento (generalmente de auxinas más que de citocininas), para favorecer la desdiferenciación.

2) Etapa de multiplicación: requiere un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular, durante esta fase el sistema es más dependiente de citocininas.

2.2.3.4. Fase de enraizamiento *in vitro*

Villalobos y Thorpe (1991), manifiestan que el proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del transplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. El medio de Murashige-Skoog (MS), por ejemplo, diluido al 50 % ha dado resultados positivos en diferentes especies. De igual manera, se requiere cambiar el balance hormonal, lo cual consiste en disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical.

Durante esta etapa se busca la formación de raíces adventicias, con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas. El tipo de enraizamiento depende de cada especie y la facilidad con la que esta etapa se logre, por ejemplo para las especies herbáceas es mucho más fácil formar raíces que para las especies leñosas. Es importante tomar en cuenta que para cada especie es necesario formular un método de enraizamiento ya que no todas actúan de igual forma con los diferentes reguladores de crecimiento existentes.

2.2.3.5. Fase de adaptación al suelo o aclimatación

Finalmente, se lleva a cabo la última etapa de la micropropagación, que consiste en la adaptación al suelo. Los explantes enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o fracaso de todo el proceso depende de la aclimatación, es por esto que la adaptación al suelo se considera como crítica, pues hay muchas probabilidades de que la planta muera por no estar bien acondicionada (Segretín 2010).

2.2.4. Factores que intervienen en la micropropagación

Abdelnour y Escalant (1994) mencionan que existen diferentes factores externos, físicos y químicos que determinan el éxito en los sistemas de propagación.

La micropropagación depende para su buen desarrollo de factores externos como: *la planta donante* y *el explante*. Villalobos y Thorpe (1991) mencionan que la edad fisiológica del

explante, así como el estado fisiológico y sanitario de la planta que dona el explante influyen significativamente en su capacidad morfogénica, es decir mientras más joven y menos diferenciado este el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro*. Roca y Mroginski (1991) manifiestan que la elección del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, este varía de acuerdo al objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. En general factores como el genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico son importantes de considerar.

Aun cuando muchos factores pueden influir en la micropropagación, los principales factores físicos son: *la luz, la temperatura, el pH y la concentración de O₂ y CO₂*, pues ejercen un papel importante en el desarrollo y diferenciación celular y han sido ampliamente estudiados (Roca y Ramírez 2000, Roca y Mroginski 1991).

Entre los factores químicos que influyen en el cultivo *in vitro* están: los nutrientes (macro y microelementos y fuentes de carbohidratos) y algunos compuestos orgánicos (vitaminas) y los reguladores de crecimiento (Roca y Ramírez 2000).

2.2.4.1. Factores físicos

Cárdenas (2006) manifiesta que los efectos de la luz proporcionada a los explantes se pueden dividir en términos de intensidad, largo del día y calidad. Las plantas necesitan luz para regular ciertos procesos morfogénicos como formación del tallo, inducción radicular o embriogénesis somática.

El fotoperiodo es otro aspecto importante en incubación, debe ser regulado con exactitud, evitando influencias del fotoperiodo natural, usualmente el fotoperiodo se regula a 12-16 horas (Seemann 1993).

Abdelnour y Escalant (1994) y Cárdenas (2006) mencionan que bajo condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es casi 100 %, es por esto que la planta *in vitro* en general no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica tales como cera, estomas, cutícula, entre otros; de ahí que dificulta la aclimatación de las plantas micropropagadas.

La temperatura es uno de los factores que se debe considerar en el establecimiento de cultivos, Roca y Mroginski (1991) señalan que en general temperaturas entre 25 y 28 °C son adecuadas; por su parte Pierik (1990) indica que a temperatura se mantiene constante de 24 a 26 °C dependiendo de la especie experimental, se elige una temperatura más baja de 18 °C para especies bulbosas, o una temperatura más alta de 28 – 29 °C para especies tropicales.

El grado de acidez o alcalinidad (pH) del medio de cultivo que es importante y específico para cada tipo de planta, al igual que ocurre en el suelo, por lo que es necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio. Sin embargo, el pH adecuado está en un rango de 4,5 a 7 para las plantas, es el pH 5,7 el más generalizado (Abdelnour y Escalant 1994).

2.2.4.2. Factores químicos

Los medios de cultivo pueden ser definidos como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos (Mroginski *et al.* 2010).

Castillo (2008), señala que el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación.

Un medio de cultivo básicamente está compuesto por carbono, nutrimentos minerales y vitaminas; sin embargo, en la mayoría de los casos los tres tipos de sustancias que anotamos antes, no son suficientes para el buen desarrollo del cultivo, por lo que se hace necesario, completar los medios con regulaciones de crecimiento (auxinas y citocininas) y otros compuestos como aminoácidos, precursores de aminoácidos, antioxidantes, carbón activado, etc. (Roca y Mroginski 1991).

La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular (Llorente 2002). Una de las mezclas de sales más usadas es la descrita por Murashige y Skoog (1962), conocida normalmente como fórmula MS (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962)

Solución Madre	Componentes	mg/L
NITRATOS	Nitratos de amonio	1 650
	Nitratos de potasio	1 900
SULFATOS	Sulfato de magnesio	370,00
	Sulfato de manganeso	16,90
	Sulfato de zinc	8,60
	Sulfato cúprico	0,025

... Continuación Cuadro 1

HALOIDES	Cloruro de calcio	440,00
	Yoduro de potasio	0,83
	Cloruro de cobalto	0,25
P,B,Mo	Fosfato de potasio	170,00
	Ácido bórico	6,20
	Molibdato de sodio	0,25
Na Fe EDTA	Sulfato ferroso	27,80
	Ácido etilendiaminocético	37,30

Si bien las plantas son autótrofas, puede ser necesario añadir al medio de cultivo algunas vitaminas hasta que los cultivos prosperen. Las vitaminas favorecedoras del desarrollo de cultivos in vitro y que se añaden rutinariamente en la mayoría de los medios de cultivo son: tiamina (B1), piridoxina (B6) y ácido nicotínico (Krikorian 1991).

Debido a que las células cultivadas in vitro son generalmente heterotróficas respecto de la fuente de carbono, se deben agregar azúcares al medio de cultivo. Estos actúan como fuente energética y de carbono e incrementan el potencial osmótico del medio. La sacarosa en concentraciones de 2 a 5 %, constituye la fuente más utilizada, pero se puede remplazar por la glucosa y en menor medida por fructosa (Roca y Mroginski 1991).

Los reguladores de crecimiento se refieren al conjunto de productos sintéticos que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, como también a las hormonas que son compuestos orgánicos sintetizados por las mismas plantas. Las sustancias hormonales críticas en el cultivo de tejidos son las auxinas y citoquininas, estas intervienen en la elongación y división celular, formación de brotes y raíces, y en la germinación de las semillas (Pierik 1990).

Existe una gran variedad de sustancias de composición indefinida que han sido utilizadas para enriquecer los medios de cultivo. Entre ellas se encuentran: extracto de malta, agua de coco, extracto de levadura, pulpa de banano, caseína hidrolizada y jugo de naranja y tomate (Abdelnour y Escalant 1994).

Roca y Mroginski (1991), mencionan otros componentes que se adicionan a los medios de cultivos, tales como: agente gelificante y carbón activado. El primero actúa como agente de soporte, en los medios semisólidos comúnmente se adiciona agar en concentraciones de 0,6 a 1 %, el agar disuelto forma un gel capaz de retener el agua y absorbe compuestos; y el carbón activado es un antioxidante, se utiliza en concentraciones de 0,1 a 3 %, puesto que

contribuye en la absorción de compuestos fenólicos que dificultan el crecimiento y desarrollo del cultivo *in vitro*.

2.2.5. Reguladores de crecimiento vegetal

Son compuestos orgánicos diferentes de los nutrimentos, que en pequeñas cantidades, fomentan, inhiben o modifican de alguna forma cualquier proceso fisiológico vegetal (Weaver 1990). Las hormonas vegetales se sintetizan en alguna parte de la planta y se translocan a otra, en donde concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica, que promueve diferente tipos de crecimiento; en la actualidad, las auxinas, citocininas, giberelinas, inhibidores y retardadores del crecimiento, son consideradas dentro del grupo de hormonas y reguladores de crecimiento (Salisbury y Ross 1994).

Las hormonas reguladoras del crecimiento son compuestos orgánicos importantes que se incluyen en el medio de cultivo, el tipo y concentración empleada de estos en el medio de cultivo depende del objetivo del cultivo *in vitro* (Jordán y Casaretto 2006).

A medida que se han identificado un mayor número de reguladores de crecimiento y estudiado los efectos y concentraciones endógenas, se ha hecho evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. Por lo tanto es riesgoso generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury y Ross 1994).

2.2.5.1. Auxinas

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular y la diferenciación de raíces en el cultivo de tejidos (Roca y Mroginski 1991, Llorente 2002). En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares (Davies 1995).

El ácido indolacético (AIA) fue la primera auxina natural identificada, y hoy es considerada la principal auxina en plantas, entre otras auxinas que han sido identificadas se incluye al ácido 4-cloroindolacético (4-Cl AIA) y ácido indolbutírico (AIB). Existen

auxinas sintéticas, tales como el ácido 2,4-diclorofexiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético (ANA), las cuales en bioensayos inducen efectos similares a las auxinas naturales, al usar diversas concentraciones de auxinas se ha demostrado que existen diferencias en la sensibilidad a estas hormonas (Sitbon y Perrot-Rechenman 1997).

2.2.5.2.Citocininas

Las citocininas son hormonas esenciales en el accionar de varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas y relacionados a la acción de varios genes (Jordán y Casaretto 2006), son derivados de la adenina que promueven la división celular (Llorente 2002). Se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, inducen la formación de vástagos adventicios; sin embargo, inhibe la formación de raíces, promueven la formación de vástagos axilares, además, promueve procesos de morfogénesis, la expansión foliar, y el desarrollo de los cloroplastos, mejorando el desarrollo vegetativo (Davies 1995).

Entre las citocininas más usadas se encuentran la benzilaminopurina (BAP), isopentiladenina (2iP), kinetina (KIN) y zeatina (ZEA) en concentraciones comprendidas entre 0,01- 3 mg/L, según el tipo de desarrollo que se desee inducir (Cárdenas 2006). Estas actúan sinérgicamente con las auxinas para promover una mayor división celular y por ende mejor crecimiento y desarrollo de la planta (Lozada 2010).

La inclusión de citocininas en el medio de cultivo permite formar callos en varias especies vegetales, aunque principalmente induce que regiones meristemáticas multicelulares se diferencien en estructuras organizadas (Llorente 2002).

2.2.5.3.Giberelinas

Las giberelinas son esencialmente hormonas estimulantes del crecimiento al igual que las auxinas, coincidiendo con éstas en algunos de sus efectos biológicos, ya que estimulan la elongación de tallos y estimulan germinación de semillas en numerosas especies (Soberón *et al.* 2005), la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray y Estelle 1998).

Las giberelinas inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos o yemas *in vitro*. También pueden romper la dormancia de embriones aislados o yemas, generalmente inhiben la formación de raíces adventicias y también la formación de vástagos adventicios, (Pierik 1990). Las giberelinas especialmente el AG₃, han demostrado

ser necesarias para el cultivo de ápices o meristemas caulinares de varias especies vegetales (Roca y Mroginski 1991).

2.3. Micropropagación de especies forestales

Dentro de las especies leñosas, las que han sido objeto de estudio durante algunos años son las forestales, especialmente las maderables por su gran valor comercial (Villalobos y Thorpe 1991, Muñoz 2003, Pérez *et al.* 2004).

La técnica del cultivo *in vitro* para la obtención de especies forestales, ha sido lenta. Se han publicado diversos trabajos de micropropagación de especies maderables, entre las especies para fines industriales han sido Álamos (*Populus* sp.), Eucaliptos (*Eucalyptus* sp.), Arces (*Arce* sp.), Abedules (*Betula* sp.), Castaños (*Castanea sativa*), Robles (*Quercus humboldtii*), Pinos (*Pinus patula*) (Ramos 2012).

Para realizar micropropagación, se requiere que el material a cultivar esté aséptico (esterilizado), debido a que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán con el explante. Se utiliza para la desinfección soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes (Villalobos y Thorpe 1991).

La regeneración de plantas a partir de cultivo *in vitro* de ciertas especies leñosas, exige la búsqueda de técnicas complejas (Perugorría 2005). Estas deben permitir a las plantas sobrevivir a los problemas de oxidación, heterogeneidad de respuesta y sobre todo a la ambientación cuando son trasplantadas a un sustrato y expuestas a las condiciones naturales (López 1996).

La micropropagación de especies arbóreas ofrece una vía rápida de producir a nivel industrial o semiindustrial plantas clonales para reforestación, producción de biomasa leñosa y conservación de germoplasma elite y raro (Rout y Das 1993).

Una de las principales ventajas de la micropropagación es la capacidad potencial de desarrollar protocolos de multiplicación optimizados para multiplicar árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores (Olmos *et al.* 2004). Sin embargo los estudios de propagación en especies leñosas aún son escasos.

2.4.Descripción de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

2.4.1. Clasificación taxonómica

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Rosidae
Familia:	Anacardiaceae
Género:	<i>Loxopterygium</i>
Especie:	<i>huasango</i> Spruce ex Engl.

2.4.2. Descripción botánica

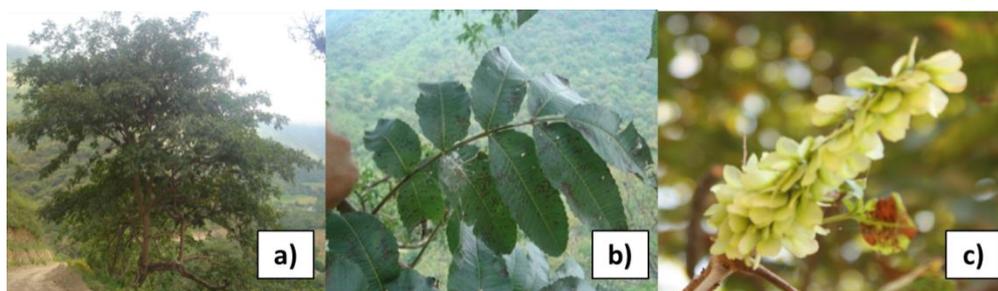


Figura 1. Atributos botánicos de la especie *Loxopterygium huasango* a) Árbol con follaje, b) Hojas y c) Flores

Árbol caducifolio, de 15-20 m altura, 40 cm de DAP. Fuste irregular, muy ramificado. Copa globosa, frondosa, con follaje casi siempre amarillento. Corteza lisa, color café cuando joven, cuando es adulto la corteza es marrón, se desprende en placas rectangulares. Exuda un látex cremoso que fluye en gotas gruesas. Hojas compuestas, alternas, imparipinadas de 30-40 cm de longitud; caducas, foliolos alargados, grandes de base obtusa, ápice agudo, las nervaduras con presencia de pelos blanquecinos hirsutos, borde aserrado, con olor astringente que causa alergia. Flores muy pequeñas, de 3 mm de longitud, verde-blanquecino, formando espigas compuestas, axilares. Fruto una sámara, con semillas aladas de 1,5 cm de color verde (tierno) y café-verdoso (maduro) (Figura 1). Florece de febrero-abril y nuevamente en agosto. Se propaga por semilla y estacas. Es de lento crecimiento (Aguirre 2002, Velásquez 1998, González *et al.* 2005).

2.4.3. Ecología y usos

Esta especie se encuentra distribuida en la región tumbesina de la costa peruana y ecuatoriana, y el hábitat que prefiere son temperaturas que están alrededor de los 24 °C, precipitaciones medias anuales de 250 a 800 mm y altitudes de 0 a 800 m snm.

Habita en planicies y zonas de montaña del bosque seco, en las provincias de Guayas, El Oro y Loja, crece entre 0 – 2 000 msnm (Jorgensen y León-Yáñez 1999).

Su madera es muy resistente al contacto con el suelo y es usado en la construcción de cercos que pueden resistir varias décadas. Para la construcción de viviendas su madera se la usa como postes, vigas, astillas para las paredes y también se usan como leña. En la medicina su resina es usada para frotaciones reumáticas, como repelente y anestésico para extraer dientes en mal estado (Aguirre 2012).

2.5. Estudios similares

En cuanto a los estudios realizados en *Loxopterygium huasango* existe mayor información bibliográfica sobre cultivo de tejidos *in vitro*, con excepción del trabajo de tesis realizado por Millones (1993) donde reporta la propagación clonal a partir de ápices caulinares procedentes de plántulas obtenidas por germinación de semillas *in vitro*; en este proceso se obtuvo elongación del brote, brotamiento múltiple y enraizamiento de brotes, así como la inducción de callos en explantes de cotiledones en altas concentraciones de 2,4-D.

Por otra parte, existen algunos estudios sobre micropropagación *in vitro* de algunas especies forestales tanto en Ecuador como en otros países. A continuación, se mencionan algunos de estos estudios.

Díaz (2012), en su estudio sobre Procesos morfogénicos *in vitro* de *Cedrela montana*, inducidos, a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma, obtuvo un 72% de semillas germinadas mediante la aplicación de 2 mg/L de ácido giberélico (AG₃). En cuanto a la fase de proliferación o multiplicación de explantes de ápices caulinares y segmentos nodales obtuvo los mejores resultados aplicando 2mg/L de BAP, ya que se obtuvo 3 brotes/explante; mientras que para la fase de enraizamiento se obtuvieron 2,4 raíces con una longitud de 30,58 mm por explante aplicando al medio de cultivo una concentración de 1 mg/l de AIB.

Jácome (2012), en su estudio denominado “Establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis *in vitro* de meristemas apicales de árboles jóvenes de romerillo (*Podocarpusoleifolius*) como futura estrategia de conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito” determinó que el mejor tratamiento de desinfección para el establecimiento *in vitro* meristemas apicales de árboles jóvenes de *Podocarpusoleifolius* es la aplicación de hipoclorito de sodio a una concentración de 1% durante 10 minutos con un lavado previo de las yemas apicales en una solución detergente durante 40 minutos. Por otro lado menciona que la mejor formulación nutritiva evaluada para el establecimiento e inducción de callogénesis *in vitro* de meristemas apicales es el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) a una concentración completa.

El estudio realizado por Soto *et al.*(2010) denominado “Establecimiento *in vitro* de *Cedrelasalvadorensis* Standl” menciona que el método de desinfección con hipoclorito de sodio aplicado en los frutos, presentó un buen resultado ya que se logró obtener un elevado porcentaje de embriones cigóticos libres de microorganismos, El porcentaje de germinación de los embriones varió del 80 al 100 %, mientras que las estaquillas respondieran mejor al medio de cultivo con 0,5 mg/L de BA, teniendo un número máximo de dos yemas por nudo.

En la investigación de Suárez *et al.*(2006) denominada “Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de Roble, *Tabebuia rosea* Bertol DC” obtuvo menores niveles de contaminación de explantes de roble, al aplicar una solución de 3% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos y luego enjuagados con agua destilada estéril. En cuanto a las tasas de multiplicación de brotes se tuvo resultados favorables con la aplicación de concentraciones altas de BAP, por lo que recomienda evaluar dosis mayores de este regulador. Por otro lado, menciona que la presencia de ANA en el medio de cultivo es necesaria para aumentar el porcentaje de enraizamiento mientras que el mayor número de raíces.

Camacho *et al.* (2006) en la investigación denominada “Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de Pino” se ensayó tres métodos de desinfección en brotes de *Pinuspseudostrobus* y *P. jaliscana*, conjuntamente con dos tratamientos con citocininas (benciladenina y cinetina) en la elongación de yemas axilares que permitan la multiplicación de brotes bajo condiciones *in vitro*. Los resultados mostraron que la aplicación de alcohol etílico al 50% durante 30 segundos e hipoclorito de sodio al 10% durante quince minutos favorecen el establecimiento aséptico de los explantes y la obtención de brotes adventicios sin presentarse un grado importante de oxidación. Además

se obtuvo elongación de brotes axilares en *P. pseudostrobus* con la aplicación de 5 mg/L de BA y 2mg/L de Cinetina.

Uribe *et al.* (2012), en su estudio denominado “Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser”, evaluó el efecto independiente de dos auxinas, ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB), en el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *N. glauca* provenientes de subcultivos sucesivos en medio MS como sustrato. Se obtuvo supervivencia de hasta 100 % con la adición de 3 mg/L de AIB al medio, se presentaron diferencias significativas entre el control y microtallos sometidos a inmersión en hormonas. Se alcanzó un 87,5% de enraizamiento adventicio con 1 mg/L de AIB y un 75 % con 3 mg/L de ANA. Con base en los resultados obtenidos manifiesta que la presencia de auxinas en el medio de cultivo es indispensable para la formación de raíces *in vitro* y establece la posibilidad de mantener el potencial rizogénico de la especie en condiciones *ex vitro*.

3. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación del área de estudio

La investigación se desarrolló en dos fases: campo y laboratorio

3.1.1. Fase de campo

La recolección del material vegetal necesario para establecer los diferentes ensayos planteados en los objetivos de estudio, se realizó en árboles identificados en los sectores: Lucarqui – Bramaderos (cantón Paltas), Puente Internacional – Vizin (cantón Macará) y Limones (Zapotillo).

3.1.2. Fase de laboratorio

Se realizó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal del Área Agropecuaria de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, el mismo que se encuentra ubicado a 3 km de la ciudad, en las siguientes coordenadas geográficas: 04° 00' 00" Latitud Sur y 79° 12' 00" Longitud Oeste (Díaz 2012).

3.2. Metodología para evaluar la desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

3.2.1. Desinfección de Semillas

Se emplearon semillas de *Loxopterygium huasango* recolectadas de árboles seleccionados¹ con características fenotípicas sobresalientes², se seleccionó las semillas con base a los siguientes criterios: fisiológicamente maduras, tamaño adecuado y buen estado fitosanitario.

Seguidamente se preparó las semillas para la desinfección, para lo cual se eliminó la parte alada que cubre la semilla, con la ayuda de un bisturí, para luego ser observadas en el estéreo microscopio y eliminar todas las impurezas (Figura 2).

La desinfección se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, probando distintos tratamientos, los cuales variaron en cuanto a los tiempos de inmersión

¹ Árboles seleccionados por el proyecto “Generación de protocolos para la propagación in vivo *e in vitro* de genotipos élitos de especies forestales nativas y promisorias para la reforestación en la región sur del Ecuador”.

² Las características para seleccionar los arboles fueron: 1) Fuste recto sano y grueso 2) Capacidad y edad para producir semillas, 3) Facilidad de recolección de frutos y 4) Buen estado fitosanitario

(5, 10 y 15 minutos) y concentración de hipoclorito de sodio (25, 50 y 75 % de cloro comercial) respectivamente.



Figura 2. Proceso de selección y limpieza de semillas de *L. huasango*.

Para la desinfección se emplearon frascos de vidrio, en los cuales se colocaron las semillas, a razón de 50 semillas/frasco (envueltas en tul para facilitar su manipulación durante la desinfección, estodebido a su tamaño pequeño), se agregó alcohol etílico al 70% durante 1 min y se enjuagó con agua destilada estéril, seguidamente se colocaron en hipoclorito de sodio en distintas concentraciones y tiempos de acuerdo al Cuadro 2, luego se procedió a remover la solución de hipoclorito de sodio (cloro comercial) con tres enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas permanecieron sumergidas en agua destilada estéril durante 24 horas para luego realizar la siembra *in vitro* en el medio de cultivo (Figura 3).



Figura 3. Desinfección de semillas de *L. huasango* en la cámara de flujo laminar.

3.2.2. Medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo MS propuesto por Murashige y Skoog (1962), suplementado con vitaminas 1 mg/L de tiamina y 100 mg/L de m-inositol, 20 gr/L de sacarosa y 6 gr/L de bacto agar como agente gelificante. El pH se ajustó a $5,8 \pm 0,2$ con ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH) 1N.

Seguidamente se calentó el medio de cultivo para incorporar el agar y una vez diluido, se distribuyó en tubos de ensayo a razón de 5 ml por tubo. Finalmente, se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120°C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión (Figura 4).



Figura 4. Preparación del medio de cultivo para la siembra de semillas de *L. huasango*.

3.2.3. Siembra *in vitro* de semillas y condiciones de incubación

La inoculación *in vitro* de semillas se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, a razón de una semilla por cada tubo de ensayo, una vez sembradas e identificado cada uno de los tratamientos, fueron colocados en el cuarto de incubación, donde se mantuvieron a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Figura 5).



Figura 5. Siembra *in vitro* de semillas de *L. huasango* para la evaluación de los tratamientos de desinfección aplicados.

3.2.4. Diseño experimental

Para analizar las condiciones del ensayo se utilizó un diseño completo al azar (DCA), con arreglo factorial 3x3, con 9 tratamientos y 3 repeticiones. En el Cuadro 2 se muestran los tratamientos aplicados.

Cuadro 2. Tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de *L. huasango*.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	25 % de hipoclorito de sodio + 5 min de inmersión
2	25 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión
3	25 % de hipoclorito de sodio + 15 min de inmersión
4	50 % de hipoclorito de sodio + 5 min de inmersión
5	50 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión
6	50 % de hipoclorito de sodio + 15 min de inmersión
7	75 % de hipoclorito de sodio + 5 min de inmersión
8	75 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión
9	75 % de hipoclorito de sodio + 15 min de inmersión

3.2.4.1. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de tubos de ensayo)	15
Número de tratamientos	9
Numero de repeticiones	3
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Número de total de tubos de ensayo por tratamiento	45
Número total de unidades experimentales del ensayo	27
Número total de tubos para el ensayo	405
Numero de semillas por unidad experimental	15
Número total de semillas	405

3.2.4.2. Unidad experimental y evaluación

Cada unidad experimental estuvo conformada por 15 tubos de ensayo, para la evaluación de la desinfección de semillas se tomaron registros diariamente durante un periodo de 30 días, las variables que se evaluó fueron: porcentaje de contaminación y número de días a la contaminación (Cuadro 3).

Cuadro 3. Hoja de registro para evaluar la desinfección de semillas de *L. huasango*.

Fecha de siembra:								
TRATAMIENTO...								
N° días	Fecha	N° total de semillas	N° sem contami nadas	% de Cont	N° sem contami nadas	% de Cont	N° sem contami nadas	% de Cont
			r1		r2		r3	

r=repeticón

3.2.4.3. Hipótesis del modelo

Hi: Existen diferencias entre tratamientos para la desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango*

Ho: No existen diferencias entre tratamientos para la desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango*.

3.3. Metodología para evaluar la desinfección e implantación *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl., provenientes de campo

3.3.1. Recolección del material vegetal

La colecta del material vegetal para la obtención de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) se realizó en los sectores: Lucarqui – Bramaderos (cantón Paltas), Puente Internacional – Vizin (cantón Macará) y Limones (Zapotillo) de árboles seleccionados, donde se colectó estacas de 50 a 60 cm de longitud y diámetro de 1 a 2 cm, procurando cortar ramas terminales y de esta forma obtener brotes tiernos. Seguidamente con la ayuda de una podadora manual se cortó las hojas para mantener únicamente los brotes. El material colectado fue envuelto en papel periódico húmedo y colocado en fundas plásticas para mantener la humedad y evitar la deshidratación y daños en el traslado al invernadero en la ciudad de Loja (Figura 6).



Figura 6. Colecta de estacas de *L. huasango* para la obtención de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales).

3.3.2. Tratamiento de las estacas en el invernadero

Las estacas recolectadas fueron tratadas en el invernadero durante ocho días, donde se procedió a cortar de 3 a 5 cm la base de las estacas para sumergirlas en un recipiente con una solución de 50 mg/L de (ácido giberélico) AG₃ y 100 mg/L de (benzilaminopurina) BAP, con la finalidad de promover la formación de nuevos brotes.

Para controlar la contaminación se roció las estacas cada dos días, con una solución fungicida – bactericida (2 ml/L de Kasumin, 2 gr/L de Benomyl y 2,5 ml/L de Neem-X como insecticida) (Figura 7).



Figura 7. Manejo de estacas de *L. huasango* en el invernadero.

3.3.3. Preparación del material vegetal

La preparación del material vegetal consistió en la obtención de los explantes mediante el corte de las yemas terminales y axilares, seguidamente se procedió a sumergirlas en una solución fungicida (2 ml/L Kasumin) durante 20 minutos, luego se enjuagó tres veces con agua potable

Los explantes fueron lavados con detergente comercial y agua potable, para lo cual se los cepilló con el propósito eliminar la contaminación adherida a la superficie y se enjuagó tres veces con agua destilada. Posteriormente, se los colocó en vasos de precipitación cubiertos con papel aluminio, para posteriormente realizar la desinfección según como se indica en el Cuadro 4 y luego la siembra *in vitro* en la cámara de flujo laminar (Figura 8).



Figura 8. Preparación de los explantes de campo de *L. huasango* para la desinfección y siembra *in vitro*.

3.3.4. Soluciones antioxidantes

Para el enjuague de los explantes en la cámara de flujo laminar, se preparó previamente una solución de agua destilada con antioxidantes (ácido cítrico 150 mg/L y ácido ascórbico 100 mg/L), la cual se esterilizó en autoclave durante 40 minutos.

3.3.5. Medio de cultivo

El medio de cultivo para la implantación de los explantes de campo fue similar al medio de cultivo empleado en el ensayo para evaluar la desinfección *in vitro* de semillas, con la diferencia que a este medio de cultivo se adicionó otras vitaminas: 1 mg/L de piridoxina, 1 mg/L de ácido nicotínico y 2 mg/L de glicina; además, como agentes antioxidantes, se agregó 1,5 gr/L de carbón activado, ácido cítrico 150 mg/L y ácido ascórbico 100 mg/L. Se distribuyó en tubos de ensayo a razón de 5 ml por tubo. El pH y las condiciones de esterilización del medio de cultivo fueron las mismas descritas anteriormente.

3.3.6. Desinfección y siembra de explantes

La desinfección e inoculación *in vitro* se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, se probó distintos tratamientos de desinfección, los cuales variaron en dos tiempos de inmersión (5 y 10 min) y tres concentraciones de hipoclorito de sodio (15, 20 y 25 % de cloro comercial) respectivamente.

Para la desinfección de los explantes se utilizó vasos de precipitación con capacidad para 1000 ml, donde se colocó 30 explantes de 2 a 3 cm en cada vaso de precipitación y se procedió a realizar la desinfección, mediante los tratamientos planteados (Cuadro 4), finalmente se removió la solución de hipoclorito de sodio mediante tres enjuagues con la solución antioxidante estéril (con la finalidad de evitar la fenolización), los explantes permanecieron sumergidos en la solución antioxidante hasta el momento de la siembra (Figura 9).

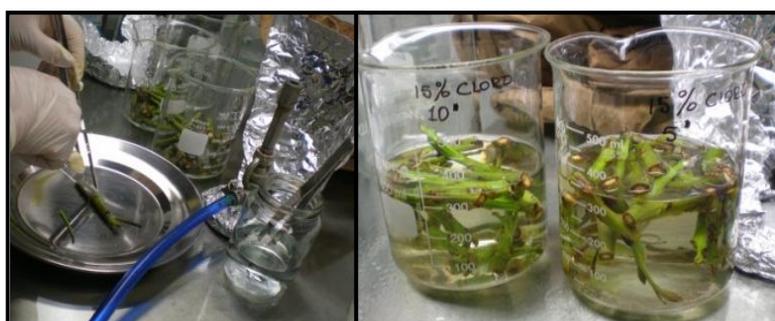


Figura 9. Desinfección de explantes de campo de *L. huasango* en la cámara de flujo laminar.

Para la siembra *in vitro* se cortó los explantes de 1 a 1,5 cm de longitud con la ayuda de un bisturí y pinzas previamente esterilizadas, y se colocó a razón de un explante por cada tubo de ensayo, una vez sembrados e identificados cada uno de los tratamientos se los ubicó en el cuarto de incubación, en donde se mantuvieron a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Figura 10).



Figura 10. Inoculación *in vitro* de explantes de campo de *L. huasango* para la evaluación de los tratamientos de desinfección aplicados.

3.3.7. Diseño experimental

Para analizar las condiciones del ensayo se utilizó un diseño completo al azar (DCA), con arreglo factorial 3 x 2, con 6 tratamientos y 3 repeticiones. En el Cuadro 4 se presentan los tratamientos aplicados.

Cuadro 4. Tratamientos aplicados en la desinfección de explantes de campo de *L. huasango*

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	15 % de hipoclorito de sodio + 5 min de inmersión
2	15 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión
3	20 % de hipoclorito de sodio + 5 min de inmersión
4	20 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión
5	25 % de hipoclorito de sodio + 5 min de inmersión
6	25 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión

3.3.7.1. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de tubos de ensayo)	10
Número de tratamientos	6
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Número de repeticiones	3
Número de total de tubos de ensayo por tratamiento	30
Número total de unidades experimentales del ensayo	18
Número total de tubos para el ensayo	180

Número de explantes por unidad experimental	10
Número total de explantes	180

3.3.7.2. Unidad experimental y evaluación

Cada unidad experimental estuvo conformada por 10 tubos de ensayo, para la evaluación de la desinfección de explantes de campo se tomaron registros diariamente durante un periodo de 30 días, las variables que se evaluó fueron: porcentaje de contaminación, porcentaje de oxidación fenólica y porcentaje de sobrevivencia (Cuadro 5).

Cuadro 5. Hoja de registro para evaluar la desinfección de explantes de campo de *L. huasango*.

Fecha de siembra:								
TRATAMIENTO...								
N° días	Fecha	N° total de explantes	N° ExpCont	% de Cont	N° ExpFen	% de Fen	N° Exp Vivos	% de Sobrevivencia
			Repetición...					

3.3.7.3. Hipótesis del modelo

Hi: Existen diferencias entre tratamientos para la desinfección de explantes de campo de *Loxopterygium huasango*

Ho: No existen diferencias entre tratamientos para la desinfección de explantes de campo de *Loxopterygium huasango*.

3.4. Metodología para evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

La germinación *in vitro* de semillas se ensayó aplicando diferentes métodos de escarificación con varias concentraciones de AG₃, a continuación se describen las actividades realizadas en el presente ensayo.

3.4.1. Selección, escarificación de semillas y desinfección

Se preparó las semillas para la desinfección, para lo cual se eliminó la parte alada que cubre la semilla, con la ayuda de un bisturí, para luego ser observadas en el estéreo microscopio y eliminar todas las impurezas. Para la escarificación de semillas se empleó tres métodos: a) Testigo (semillas sin escarificar), b) Método mecánico (ligero corte con

bisturí en la testa) y c) Método físico (inmersión de las semillas en agua hirviendo) (Figura 11).

La desinfección de semillas se realizó con el mejor tratamiento del ensayo de desinfección de semillas (T4 = 50% hipoclorito de sodio + 5 min), en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas con el mismo procedimiento descrito anteriormente.



Figura 11. Métodos de escarificación aplicados para evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *L. huasango*.

3.4.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado para la germinación *in vitro* de semillas fue similar al medio de cultivo utilizado en el ensayo para evaluar desinfección *in vitro* de semillas y se adicionó AG₃ en tres concentraciones 0; 0,5 y 1 mg/L respectivamente.

Se distribuyó en tubos de ensayo a razón de 5 ml por tubo. El pH y las condiciones de esterilización del medio de cultivo fueron las mismas descritas anteriormente.

3.4.3. Siembra *in vitro* de semillas y condiciones de incubación

La inoculación *in vitro* de semillas se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, a razón de una semilla por cada tubo de ensayo, considerando el método de escarificación y la concentración de AG₃. Se probó nueve tratamientos con tres repeticiones cada uno (Cuadro 6).

Seguidamente se identificó cada uno de los tratamientos para su traslado al cuarto de incubación, en donde se mantuvieron a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Figura 12).



Figura 12. Inoculación de semillas para la evaluar la germinación *in vitro* de *L. huasango*.

3.4.4. Diseño experimental

Para analizar las condiciones del ensayo se utilizó un diseño completo al azar (DCA), con arreglo factorial 3x3, con 9 tratamientos y 3 repeticiones. En el Cuadro 6 se muestran los tratamientos aplicados.

Cuadro 6. Tratamientos aplicados para evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *L. huasango*.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	Sin escarificación + 0 mg/l de AG ₃
2	Escarificación físico + 0 mg/l de AG ₃
3	Escarificación mecánica + 0 mg/l de AG ₃
4	Sin escarificación + 0,5 mg/l de AG ₃
5	Escarificación física + 0,5 mg/l de AG ₃
6	Escarificación mecánica + 0,5 mg/l de AG ₃
7	Sin escarificación + 1 mg/l de AG ₃
8	Escarificación física+ 1 mg/l de AG ₃
9	Escarificación mecánica + 1 mg/l de AG ₃

3.4.4.1. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de tubos de ensayo)	15
Número de tratamientos	9
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Numero de repeticiones	3
Número de total de tubos de ensayo por tratamiento	45
Número total de unidades experimentales del ensayo	27
Número total de tubos para el ensayo	405
Numero de semillas por unidad experimental	15
Número total de semillas	405

3.4.4.2. Unidad experimental y evaluación

Cada unidad experimental estuvo conformada por 15 tubos de ensayo, para la evaluación de la germinación *in vitro* de semillas se tomaron registros diariamente durante un periodo de 30 días, las variables que se evaluó fueron: número de días a la germinación, porcentaje de germinación, porcentaje de contaminación y porcentaje de mortalidad (Cuadro 7).

Cuadro 7. Hoja de registro para evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *L. huasango*.

Fecha de siembra:								
TRATAMIENTO...								
N° días	Fecha	N° total de semillas	N° semillas Germ	% de Germ	N° semillas Cont	% de Cont	N° plantas muertas	% de Mortalidad
			Repetición...					

3.4.4.3. Hipótesis del modelo

Hi: Existen diferencias en la germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* entre tratamientos.

Ho: No existen diferencias en la germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* entre tratamientos.

3.5. Metodología para evaluar la fase de multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

El objetivo de esta fase consistió en evaluar el efecto de tres citocininas: benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN) e isopentiladenina (2ip), en dos concentraciones 1 y 2 mg/L respectivamente, con la finalidad de inducir la elongación de los explantes. Para lo cual se utilizó plantas obtenidas mediante germinación *in vitro*, con un promedio de 4 a 5 cm de altura y de 1 a 2 nudos, durante esta etapa no fue necesario la desinfección del material vegetal por tratarse de material aséptico.

3.5.1. Medio de Cultivo

El medio de cultivo para fase de multiplicación de explantes estuvo constituido por las sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con vitaminas: 5 mg/L de tiamina y 100 mg/L de m-inositol, 20 gr/L de sacarosa y 6 gr/L de bacto agar como agente gelificante, en este medio de cultivo se ensayaron seis tratamientos probando tres citocininas (BAP, KIN y 2ip) en dos concentraciones (1 y 2 mg/L) (Cuadro 8) con tres

repeticiones cada uno. El pH y las condiciones esterilización del medio de cultivo fueron las mismas descritas anteriormente.

Se distribuyó 25 ml de medio de cultivo en frascos de vidrio con 250 ml de capacidad, después se selló con tapas metálicas para realizar la esterilización (Figura 13).



Figura 13. Distribución del medio de cultivo en frascos de vidrio.

3.5.2. Siembra *in vitro* de explantes y condiciones de incubación

La inoculación *in vitro* de los explantes, se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, se utilizó cajas petri, bisturí y pinzas previamente esterilizadas para realizar el corte de los explantes de un tamaño promedio de 2 a 3 cm, una vez obtenidos los explantes se procedió a sembrarlos, a razón de dos explantes por cada frasco.

Finalmente se identificó cada uno de los tratamientos para su traslado al cuarto de incubación, en donde se mantuvieron a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Figura 14).

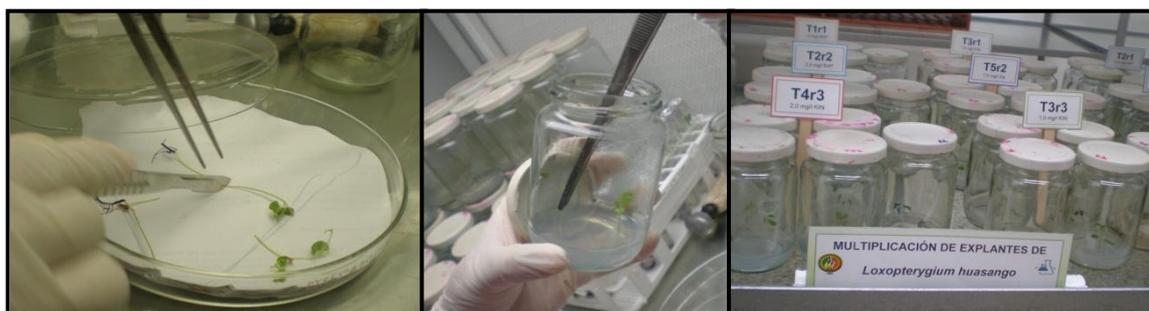


Figura 14. Inoculación *in vitro* de explantes de *L. huasango*.

3.5.3. Diseño experimental

Para analizar las condiciones del ensayo se utilizó un diseño completo al azar (DCA), con arreglo factorial 3x2, con 6 tratamientos y 3 repeticiones. En el Cuadro 8 se muestran los tratamientos aplicados.

Cuadro 8. Tratamientos aplicados para evaluar la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *L. huasango*.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	1,0 mg/l de BAP
2	2,0 mg/l de BAP
3	1,0 mg/l de KIN
4	2,0 mg/l de KIN
5	1,0 mg/l de 2ip
6	2,0 mg/l de 2ip

3.5.3.1. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de frascos)	5
Número de tratamientos	6
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Numero de repeticiones	3
Número total de frascos por tratamiento	15
Número total de unidades experimentales del ensayo	18
Número de explantes por frasco	2
Numero de explantes por unidad experimental	10
Número total de explantes	180

3.5.3.2. Unidad experimental y evaluación

Cada unidad experimental estuvo conformada por 5 frascos de vidrio, a razón de 2 explantes/frasco; para la evaluación de las variables: porcentaje de contaminación y porcentaje de mortalidad, se tomaron registros cada 5 días a partir del tercer día (Cuadro 9). Posteriormente se evaluó cada 30 días durante un periodo de 3 meses, las variables: número de brotes/explante, tamaño del brote (mm), altura de la planta (cm) número de hojas/explante y número de nudos/explante (Cuadro 10).

Cuadro 9. Hoja de registro para evaluar las variables: % contaminación y % de mortalidad en fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *L. huasango*.

Ensayo:						
Fecha de siembra:						
TRATAMIENTO...						
N° días	Fecha	N° total explantes	N° ExpCont	% de Cont	N° exp Muertos	% de Mort
			Repetición...			

Cuadro 10. Hoja de registro utilizada en la evaluación a los 30, 60 y 90 días en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *L. huasango*.

Ensayo:						
Fecha de siembra:				Fecha de evaluación		
Tratamiento...				Repetición...		
N°	N° brotes/ explante	Tamaño del brote (mm)	Altura de la planta (cm)	N° hojas	N° nudos	Observaciones

3.5.3.3. Hipótesis del modelo

Hi: Existen diferencias en la fase de multiplicación de explantes, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Loxopterygium huasango* entre tratamientos.

Ho: No existen diferencias en la fase de multiplicación de explantes, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Loxopterygium huasango* entre tratamientos.

3.6. Metodología para evaluar las fases de brotamiento y enraizamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Durante el proceso de establecimiento de los ensayos de brotamiento y enraizamiento *in vitro* de explantes se realizó el mismo procedimiento descrito en la fase de multiplicación en cuanto a la selección y siembra de explantes, puesto que se utilizó plantas obtenidas mediante germinación *in vitro*.

El medio de cultivo base estuvo constituido por las sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con vitaminas: 5 mg/L de tiamina, 100 mg/L de m-inositol, 2 mg/L de piridoxina, 1 mg/L de ácido nicotínico y 2 mg/L de glicina 20 gr/L de sacarosa y 6 gr/L de bacto agar como agente gelificante; además, se adicionó 1 ml/L de Ergostin como bioestimulante vegetal. En cada una de las fases de brotamiento y enraizamiento *in vitro* de explantes se enriqueció el medio de cultivo base, con citocininas más sustancias complejas y auxinas respectivamente. La cantidad del medio de cultivo, el pH, y las condiciones de esterilización del medio de cultivo fueron las mismas descritas anteriormente.

3.6.1. Fase de brotamiento *in vitro* de explantes

Durante esta fase se probó 12 tratamientos con tres repeticiones cada uno, el objetivo fue evaluar el efecto de la interacción de tres citocininas: benzilaminopurina (BAP),

kinetina(KIN) y isopentiladenina (2ip) en concentración de 1 mg/L, con dos sustancias complejas: sulfato de adenina en dos concentraciones 5 y 25 mg/L y agua de coco en dos concentraciones 0 y 20 % respectivamente, con la finalidad de inducir el brotamiento múltiple de los explantes.

3.6.1.1.Diseño experimental

Para analizar las condiciones del ensayo se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), en arreglo factorial 3x2x2, con 12 tratamientos y 3 repeticiones. En el Cuadro 11 se muestran los tratamientos aplicados.

Cuadro 11. Tratamientos aplicados para evaluar la fase de brotamiento *in vitro* de explantes de *L. huasango*.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	1 mg/l de BAP + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco
2	1 mg/l de BAP + 5 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco
3	1 mg/l de BAP + 25 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco
4	1 mg/l de BAP + 25 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco
5	1 mg/l de KIN + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco
6	1 mg/l de KIN + 5 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco
7	1 mg/l de KIN + 25 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco
8	1 mg/l de KIN + 25 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco
9	1 mg/l de 2ip + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco
10	1 mg/l de 2ip + 5 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco
11	1 mg/l de 2ip + 25 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco
12	1 mg/l de 2ip + 25 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco

3.6.1.2.Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de frascos)	5
Número de tratamientos	12
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Numero de repeticiones	3
Número total de frascos por tratamiento	15
Número total de unidades experimentales del ensayo	36
Número de explantes por frasco	2
Numero de explantespor unidad experimental	10
Número total de explantes	360

3.6.1.3.Unidad experimental y evaluación

Cada unidad experimental estuvo conformada por 5 frascos de vidrio, a razón de 2 explantes/frasco; para la evaluación de las variables: porcentaje de contaminación y

porcentaje de mortalidad, se tomaron registros cada 5 días a partir del tercer día (Cuadro 12). Posteriormente, se evaluó cada 30 días durante un periodo de 3 meses las variables: número de brotes/explante, tamaño del brote (mm), altura de la planta (cm) número de hojas/explante y número de nudos/explante (Cuadro 13).

Cuadro 12. Hoja de registro para evaluar las variables: % contaminación y % de mortalidad en fase de brotamiento *in vitro* de explantes de *L. huasango*.

Ensayo:						
Fecha de siembra:						
TRATAMIENTO...						
N° días	Fecha	N° total explantes	N° ExpCont	% de Cont	N° exp Muertos	% de Mort
			Repetición...			

Cuadro 13. Hoja de registro utilizada en la evaluación a los 30, 60 y 90 días en la fase de brotamiento *in vitro* de explantes de *L. huasango*.

Ensayo:						
Fecha de siembra:				Fecha de evaluación		
Tratamiento...				Repetición...		
N°	N° brotes/ explante	Tamaño del brote (mm)	Altura de la planta (cm)	N° hojas	N° nudos	Observaciones

3.6.1.4. Hipótesis del modelo

Hi: Existen diferencias en la fase de brotamiento *in vitro* de explantes, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Loxopterygium huasango* entre tratamientos.

Ho: No existen diferencias en la fase de brotamiento *in vitro* de explantes, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Loxopterygium huasango* entre tratamientos.

3.6.2. Fase de enraizamiento *in vitro* de explantes

Durante esta fase se probó nueve tratamientos con tres repeticiones cada uno, el objetivo fue evaluar el efecto de tres auxinas: ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB) en tres concentraciones 0,5: 1 y 1,5 mg/L respectivamente, con la finalidad de promover el enraizamiento de los explantes.

3.6.2.1. Diseño experimental

Para analizar las condiciones del ensayo se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), en arreglo factorial 3x3, con 9 tratamientos y 3 repeticiones. En el Cuadro 14 se muestran los tratamientos aplicados.

Cuadro 14. Tratamientos aplicados para evaluar la fase de enraizamiento *in vitro* de explantes de *L. huasango*.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	0,5 mg/l de ANA
2	1,0 mg/l de ANA
3	1,5 mg/l de ANA
4	0,5 mg/l de AIA
5	1,0 mg/l de AIA
6	1,5 mg/l de AIA
7	0,5 mg/l de AIB
8	1,0 mg/l de AIB
9	1,5 mg/l de AIB

3.6.2.2. Especificaciones del diseño experimental

Unidad experimental (conjunto de frasco)	5
Número de tratamientos	9
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Numero de repeticiones	3
Número total de frascos por tratamiento	15
Número total de unidades experimentales del ensayo	27
Número de explantes por frasco	2
Numero de explantespor unidad experimental	10
Número total de explantes	270

3.6.2.3. Unidad experimental y evaluación

Cada unidad experimental estuvo conformada por 5 frascos de vidrio, a razón de 2 explantes/frasco; para la evaluación de las variables: porcentaje de contaminación y porcentaje de mortalidad, se tomaron registros cada 5 días a partir del tercer día (Cuadro 15). Posteriormente, se evaluó cada 30 días, durante un periodo de 3 meses las variables: altura de la planta (cm), número de hojas/explante, número de nudos/explante, número de raíces formadas y longitud de raíces (cm) (Cuadro 16).

Cuadro 15. Hoja de registro para evaluar las variables: % contaminación y % de mortalidad en fase de enraizamiento *in vitro* de explantes de *L. huasango*

Ensayo:						
Fecha de siembra:						
TRATAMIENTO...						
N° días	Fecha	N° total explantes	N° ExpCont	% de Cont	N° exp Muertos	% de Mort

Cuadro 16. Hoja de registro utilizada en la evaluación a los 30, 60 y 90 días en la fase de enraizamiento *in vitro* de explantes de *L. huasango*

Ensayo:								
Fecha de siembra:					Fecha de evaluación			
Tratamiento...					Repetición...			
N°	Altura de la planta (cm)	N° Raíces	Longitud de raíces (cm)	N° hojas	N° nudos	N° brotes/exp lante	Tamaño del brote (mm)	Observaciones

3.6.2.4. Hipótesis del modelo

Hi: Existen diferencias en la fase de enraizamiento *in vitro* de explantes, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Loxopterygium huasango* entre tratamientos.

Ho: No existen diferencias en la fase de enraizamiento *in vitro* de explantes, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales de *Loxopterygium huasango* entre tratamientos.

3.7. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en cada uno de los ensayos se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2009), en cual se realizó un análisis de varianza (ANAVA), estableciendo diferencias significativas con el test de LSD Fisher a un nivel de significancia de 0,05. Se probaron supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad para cada una de las variables en los distintos ensayos. En el Cuadro 17 se presenta la matriz con las medidas resumen empleada para el análisis de la información.

Cuadro 17. Matriz de medidas resumen para el análisis de la información.

Tratamiento	Repetición	Variable	n	Media	D.E.	E.E
-------------	------------	----------	---	-------	------	-----

D.E.= Desviación estándar; E.E.= error estándar.

3.8. Metodología para la difusión de los resultados obtenidos en la presente investigación

Para la difusión de los resultados de la presente investigación y para dar cumplimiento a este objetivo se realizó lo siguiente:

- Se socializó los resultados de la investigación, a través de una exposición a los técnicos del Laboratorio de Micropropagación Vegetal y a los estudiantes de quinto año de la Carrera de Ingeniería Forestal.
- Se elaboró un tríptico y un folleto informativo con la finalidad de dar a conocer los resultados obtenidos de la presente investigación.
- Finalmente, se redactó un artículo científico para difundir los resultados de la investigación, a nivel de la Universidad Nacional de Loja y Carrera de Ingeniería Forestal.

4. RESULTADOS

4.1.Desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.1.1. Porcentaje de contaminación

En los resultados obtenidos de la desinfección de semillas, aplicando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (cloro comercial) en distintos tiempos de inmersión, si se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,0059$) para el porcentaje de contaminación (Anexo 1), el T1 (25 % de hipoclorito de sodio durante 5 min de inmersión) y T4 (50 % de hipoclorito de sodio durante 5 min de inmersión) presentaron los valores más bajos ($0 \pm 5,54$), frente al T6 (50 % de hipoclorito de sodio durante 15 min de inmersión) que tuvo los mayores valores ($35,56 \pm 5,54$) de contaminación causada por hongos y bacterias (Figura 15).

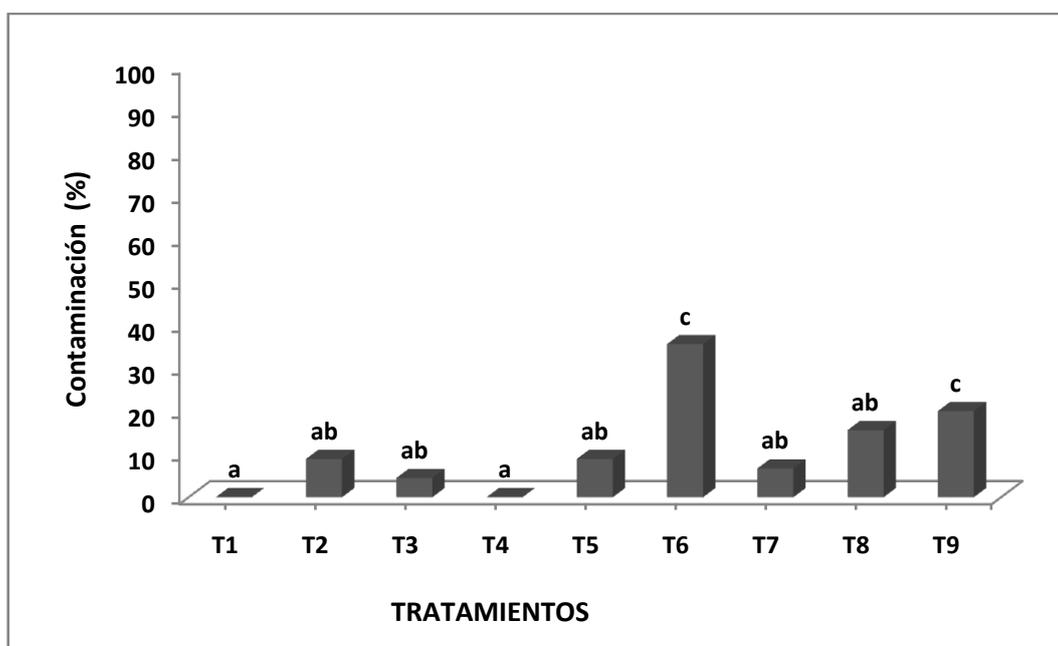


Figura 15. Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.1.2. Número de días a la contaminación

La aparición de contaminación, se evidenció al cuarto día de evaluación a partir de la siembra en el T3 (25 % de hipoclorito de sodio durante 15 min de inmersión), T6 (50 % de hipoclorito de sodio durante 15 min de inmersión), T8 (75 % de hipoclorito de sodio durante 10 min de inmersión) y T9 (75 % de hipoclorito de sodio durante 15 min de inmersión) y se estabilizó al octavo día en el T6, que fue el tratamiento que presentó el

mayor porcentaje de contaminación (Figura 16). Los resultados del T1 y T4 no se muestran en el gráfico ya que la contaminación en estos tratamientos fue nula (Anexo 1).

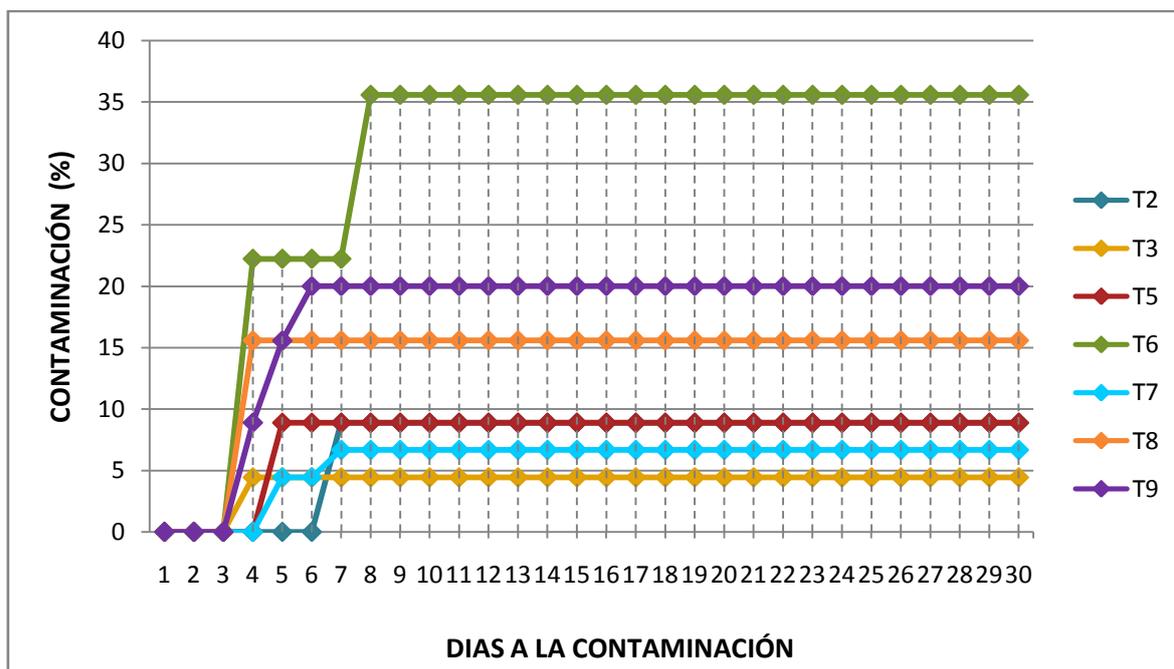


Figura 16. Representación gráfica del número de días a la contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.2.Desinfección de explantes de campo de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.2.1. Porcentaje de contaminación

En los resultados obtenidos de la desinfección de explantes de campo, aplicando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (cloro comercial), en distintos tiempos de inmersión, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,1452$) en el porcentaje de contaminación (Anexo 2).

Los tratamientos de desinfección aplicados no mostraron resultados favorables, puesto que se obtuvieron altos porcentajes de contaminación causada por hongos y bacterias en todos los tratamientos (Figura 17).

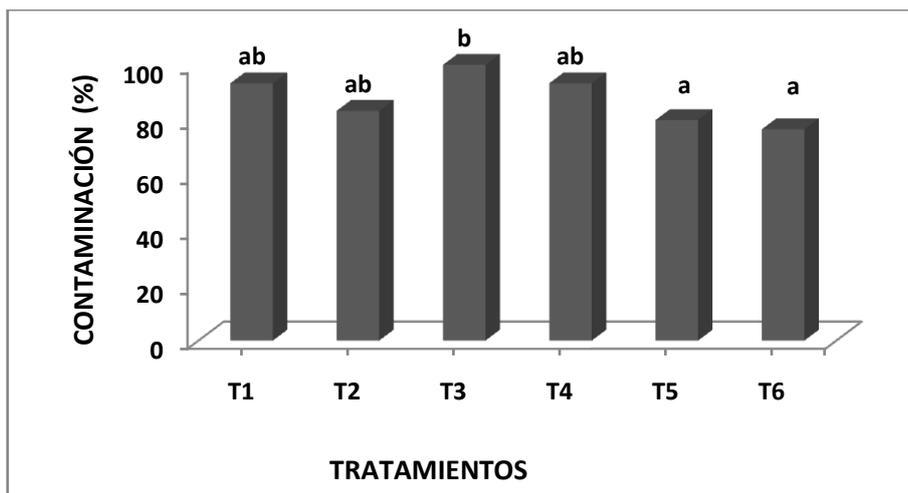


Figura 17. Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la desinfección de explantes de campo de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.2.2. Porcentaje de oxidación fenólica

En los resultados referentes a la variable porcentaje de oxidación fenólica si se encontraron diferencias significativas ($p=0,0010$) (Anexo 2), en donde el T3 (20 % de hipoclorito de sodio durante 5 min de inmersión) mostró el valor promedio más bajo ($70 \pm 4,91$) frente al valor obtenido en los T1 (15 % de hipoclorito de sodio durante 5 min de inmersión), T2 (15 % de hipoclorito de sodio durante 10 min de inmersión), T5 (25 % de hipoclorito de sodio durante 5 min de inmersión) y T6 (25 % de hipoclorito de sodio durante 10 min de inmersión), el cual corresponde al mayor porcentaje de fenolización ($100 \pm 4,91$) (Figura 18).

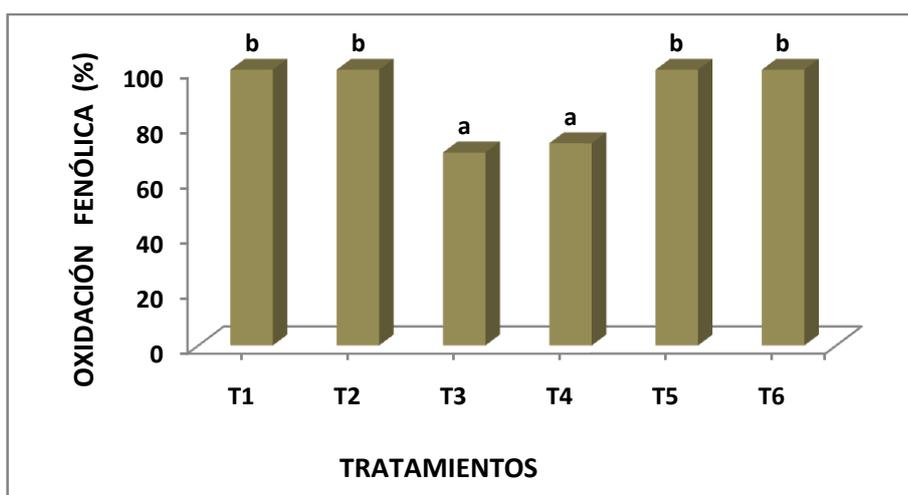


Figura 18. Porcentaje promedio de oxidación fenólica de los diferentes tratamientos aplicados en la desinfección de explantes de campo de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.2.3. Porcentaje de sobrevivencia

En los resultados referentes al porcentaje de sobrevivencia no se registró sobrevivencia de los explantes de campo, pues no se logró combatir la contaminación, así como también la oxidación fenólica; por lo tanto, se tuvo pérdida del 100 % de los explantes durante la fase de implantación *in vitro*.

4.3. Germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.3.1. Porcentaje de germinación

En los resultados obtenidos en la germinación *in vitro* de semillas, aplicando diferentes métodos de escarificación y distintas concentraciones de ácido giberélico (AG₃), no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,2728$) para el porcentaje de germinación (Anexo 3). Sin embargo, el T1 (Sin escarificación + 0 mg/l AG₃) y el T7 (Sin escarificación + 1 mg/l AG₃) presentaron los valores promedio de germinación más altos con 71,11 y 77,78 % respectivamente (Figura 19).

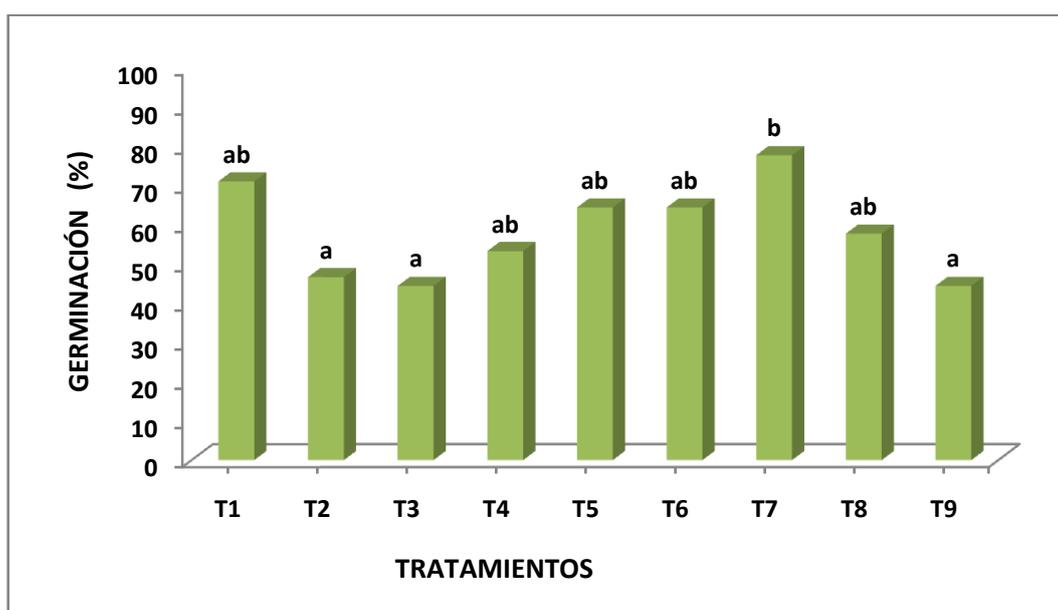


Figura 19. Porcentaje promedio de germinación de los diferentes tratamientos aplicados en la germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.3.2. Número de días a la germinación

En general las velocidades de germinación fueron similares para cada uno de los tratamientos evaluados (Anexo 3), en los T1 (Sin escarificación + 0 mg/l AG₃), T3 (Escarificación mecánica + 0 mg/l AG₃), T6 (Escarificación mecánica + 0,5 mg/l de AG₃) y T7 (Sin escarificación + 1 mg/l AG₃), se inició la germinación al cuarto día, en el T4 (Sin

escarificación + 0,5 mg/l AG₃), T8 (Escarificación física+ 1 mg/l AG₃)y T9 (Escarificación mecánica + 1 mg/l AG₃)al séptimo día; mientras que, en el T2 (Escarificación física + 0 mg/l AG₃) y T5 (Escarificación física + 0,5 mg/l AG₃)se inició al octavo día. En los T1 y T7 que son los tratamientos en los que se alcanzó los mayores porcentajes de germinación con 71,11 y 77,78 % respectivamente, se estabilizó la germinación al día 14 en el T1 y al día 16 en el T7. En la Figura 21 se muestran las curvas de germinación de los distintos tratamientos, en las cuales se puede observar el comportamiento de cada uno de estos.

4.3.3. Porcentaje de contaminación

En los resultados de porcentaje de contaminación si se encontraron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre tratamientos (Anexo 3), en donde los T2 (Escarificación física + 0 mg/l AG₃), T5 (Escarificación física + 0,5 mg/l AG₃) y T6 (Escarificación mecánica + 0,5 mg/l de AG₃) presentaron el valor promedio más bajo ($0 \pm 2,96$), frente al T9 (Escarificación mecánica + 1 mg/l AG₃) que mostró el valor promedio más alto ($26,67 \pm 2,96$) de contaminación causada por hongos y bacterias (Figura 20).

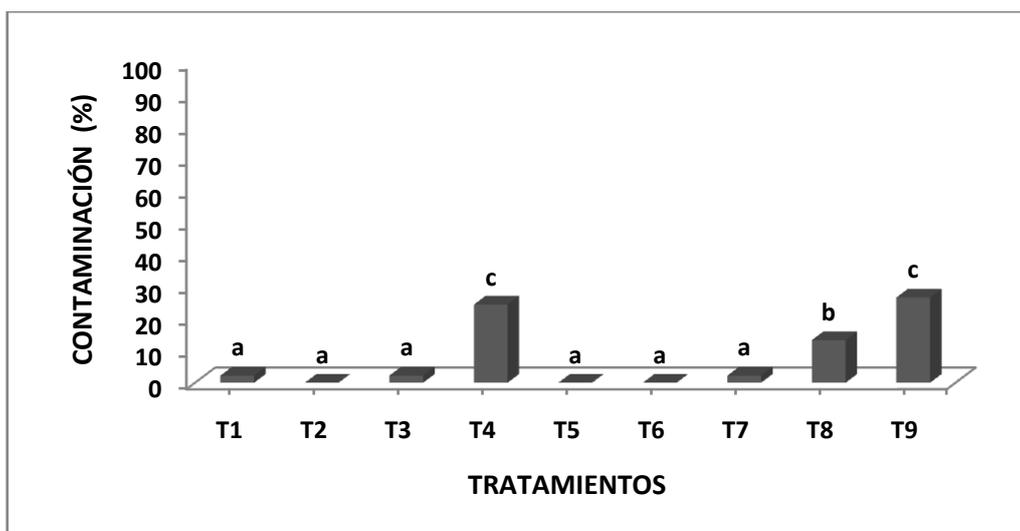


Figura 20. Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

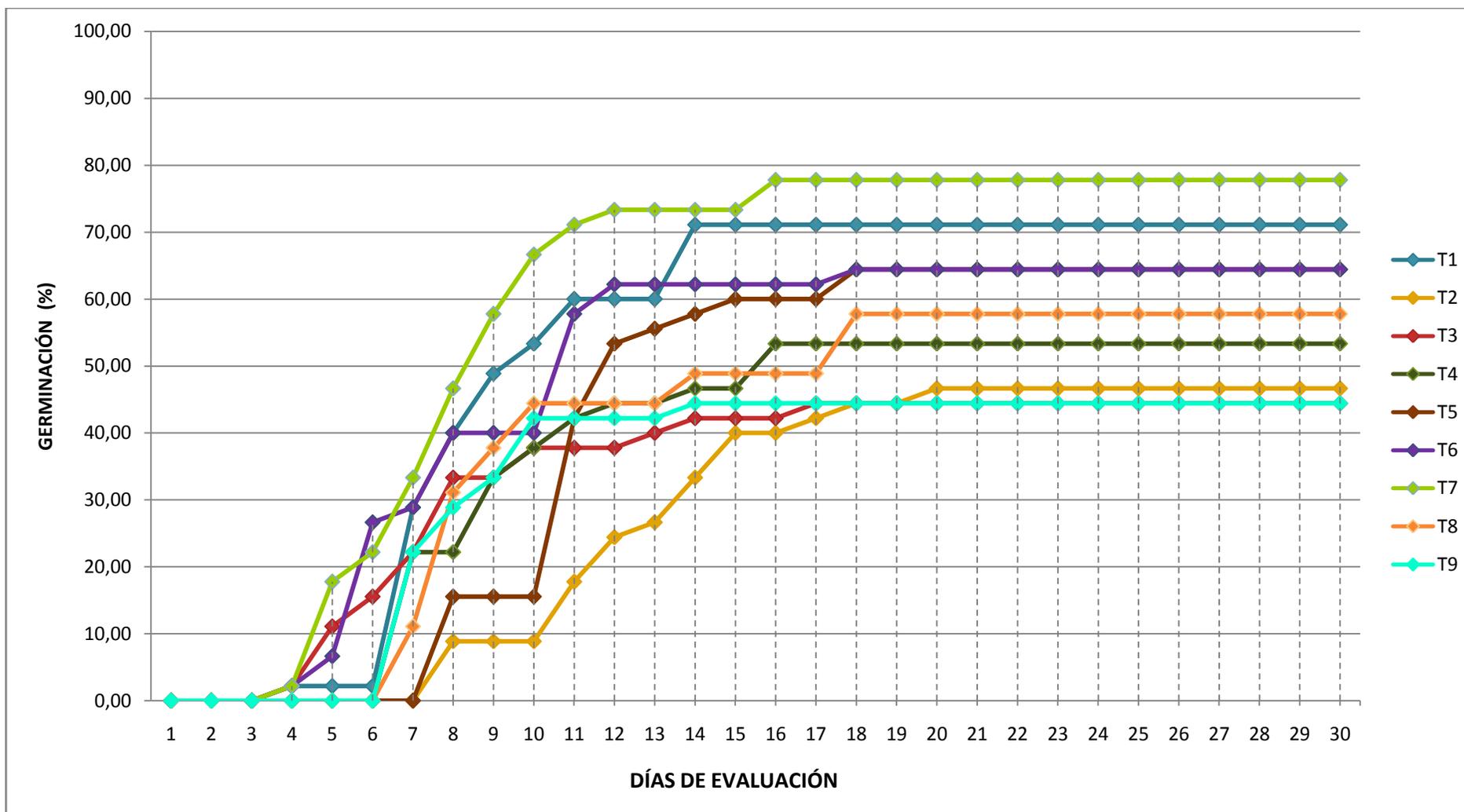


Figura 21. Curva de germinación acumulativa de los distintos tratamientos aplicados para la germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.3.4. Porcentaje de Mortalidad

En lo referente a la evaluación de la variable porcentaje de mortalidad, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,9215$) (Anexo 3), el T4 (Sin escarificación + 0,5 mg/l AG_3) y el T7 (Sin escarificación + 1 mg/l AG_3) presentaron los promedios de mortalidad más bajos con 11,11 % y 13,33 % respectivamente, frente al T1 (Sin escarificación + 0 mg/l AG_3) que mostró el valor promedio más alto con 22,22 % de mortalidad (Figura 22).

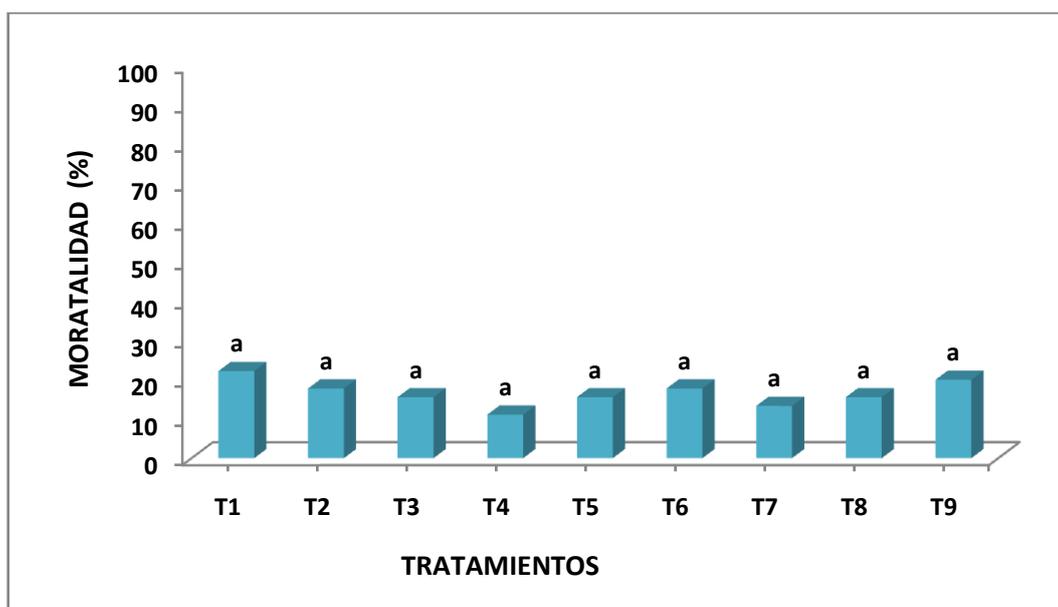


Figura 22. Porcentaje promedio de mortalidad de los diferentes tratamientos aplicados en la germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.4. Multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.4.1. Porcentaje de contaminación

En la evaluación del efecto de las diferentes concentraciones de citocininas para la fase de multiplicación *in vitro* de explantes, se obtuvo que la variable porcentaje de contaminación si presenta diferencias significativas ($p=0,0360$) entre tratamientos (Anexo 4), el T5 (1 mg/L 2ip) y T6 (2 mg/L 2ip) presentaron el valor de porcentaje de contaminación promedio más bajo ($0 \pm 7,07$), mientras que el T2 (2 mg/L BAP) mostró el valor promedio más alto de contaminación ($33,33 \pm 7,07$) provocada por hongos y bacterias (Figura 23).

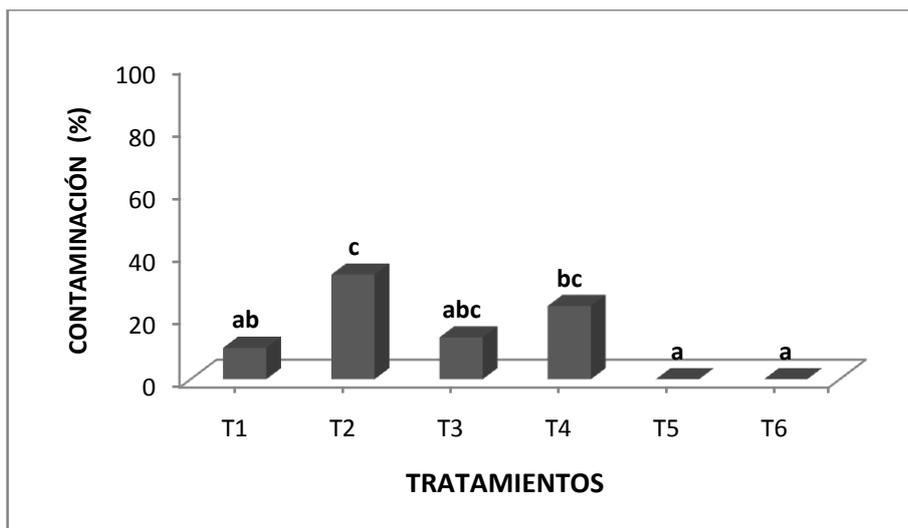


Figura 23. Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la multiplicación *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.4.2. Porcentaje de mortalidad

En cuanto a los resultados obtenidos de la evaluación de la variable porcentaje de mortalidad indican que si existe diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre tratamientos (Anexo 4), en donde el T5 (1 mg/L 2ip) mostró el valor de porcentaje de mortalidad promedio más bajo ($13,33 \pm 5,61$) frente al T3 (1 mg/L KIN) que presentó el valor promedio más alto ($73,33 \pm 5,61$) de mortalidad, provocada por factores fisiológicos propios de la especie (Figura 24).

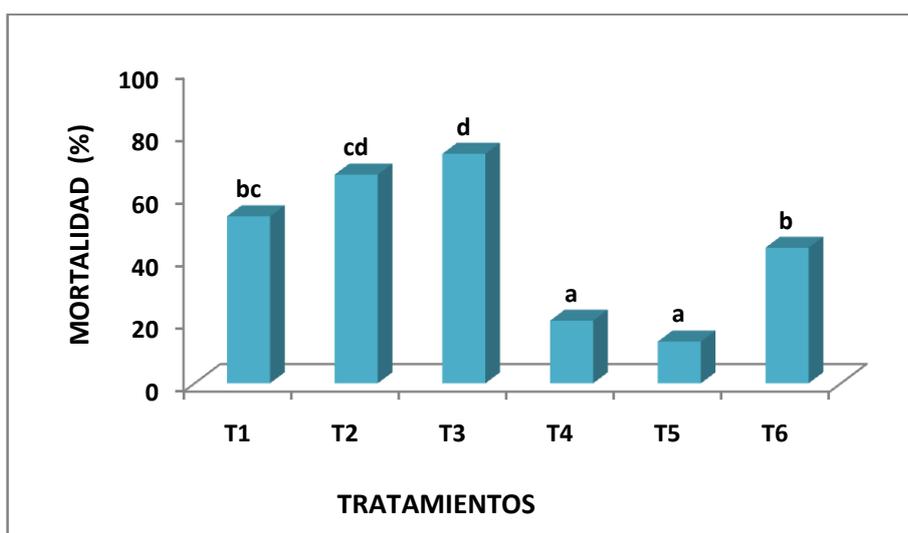


Figura 24. Porcentaje promedio de mortalidad de los diferentes tratamientos aplicados en la multiplicación *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.4.3. Número de brotes/explante, tamaño del brote (mm), altura de la planta (cm), número de hojas/explante y número de nudos/explante

Los resultados obtenidos para las variables número de brotes/explante y tamaño del brote (mm) no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,5660$ y $p=0,5310$ respectivamente). No se logró la formación de brotes mediante los tratamientos aplicados.

En cuanto a los resultados obtenidos para la variable altura de la planta, no se encontraron diferencias significativas ($p=0,0620$); sin embargo, si se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para las variables: número hojas/explante ($p<0,001$) y número de nudos/explante ($p=0,006$). Con el T5 (1 mg/L 2ip) se logró el mayor valor promedio de altura de la planta (5,21 cm), el mayor número de hojas formadas/explante(6,16), así como también, el mayor número de nudos/explante (5,40) en promedio; frente al T2 (2 mg/l BAP) que presentó los valores promedio más bajos con 3,36 cm de altura de la planta, (3,78) hojas/explante y (2,56) nudos/explante en promedio (Cuadro 18).

Cuadro 18. Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas a los tres meses en el ensayo de multiplicación *in vitro* de explantes de *L. huasango*.

Trat	N° brotes/explante	Tamaño del brote (mm)	Altura de la planta (cm)	N° hojas/explante	N° nudos/explante
T1	0,00 \pm 0,06a	0,00 \pm 1,14a	3,85 \pm 0,38ab	3,83 \pm 0,56a	3,11 \pm 0,46a
T2	0,00 \pm 0,06a	0,00 \pm 1,14a	3,36 \pm 0,38a	3,78 \pm 0,56a	2,56 \pm 0,46a
T3	0,08 \pm 0,06a	1,00 \pm 1,14a	4,41 \pm 0,38abc	6,11 \pm 0,56b	4,72 \pm 0,46bc
T4	0,11 \pm 0,06a	2,61 \pm 1,14a	4,64 \pm 0,38bc	6,03 \pm 0,56b	4,62 \pm 0,46bc
T5	0,00 \pm 0,06a	0,00 \pm 1,14a	5,21 \pm 0,38c	6,16 \pm 0,56b	5,4 \pm 0,46c
T6	0,00 \pm 0,06a	0,00 \pm 1,14a	4,43 \pm 0,38abc	4,01 \pm 0,56a	3,49 \pm 0,46ab

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

4.5. Brotamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.5.1. Porcentaje de contaminación

En la evaluación del efecto de la interacción de citocininas con sustancias complejas en la fase de brotamiento *in vitro* de explantes, se obtuvo que la variable porcentaje de contaminación no presentó diferencias significativas ($p=0,5465$) entre tratamientos. Se logró controlar la contaminación puesto que en la mayoría de tratamientos se obtuvo en 0% de contaminación, con excepción del T7 (1 mg/L KIN + 25 mg/L de S. adenina + 0 % de agua

de coco) y T9 (1 mg/L 2ip + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco), en donde se presentó una contaminación mínima del 6,67 % en cada uno (Anexo 5).

4.5.2. Porcentaje de mortalidad

Los resultados obtenidos de la evaluación de la variable porcentaje de mortalidad muestran que no existen diferencias significativas ($p=0,8552$) entre tratamientos (Anexo 5). Los valores promedio del porcentaje de mortalidad se presentan en la Figura 25.

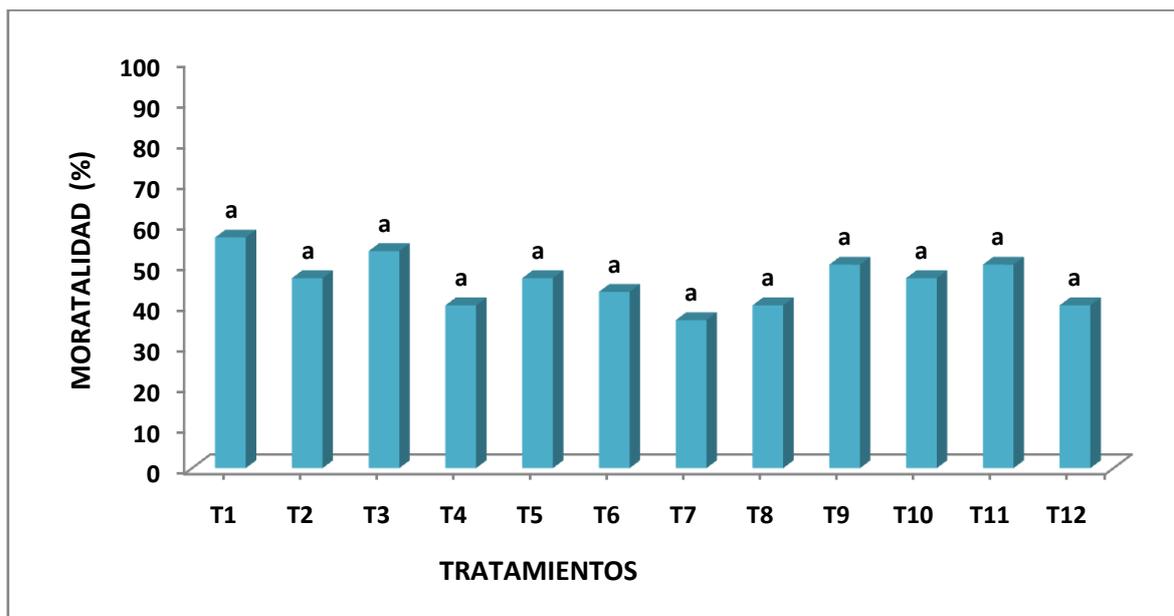


Figura 25. Porcentaje promedio de mortalidad de los diferentes tratamientos aplicados en el brotamiento *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

El T4 (1 mg/L BAP + 25 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco), T8 (1 mg/L KIN + 25 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco) y T12 (1 mg/L KIN + 25 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco), presentaron el porcentaje de mortalidad más bajo de 40 %, con respecto al T1 (1 mg/L BAP + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco) en donde se registró el valor más alto con 56,67 % de mortalidad.

4.5.3. Número de brotes/explante, tamaño del brote (mm), altura de la planta (cm), número de hojas/explante y número de nudos/explante

Los resultados obtenidos para las variables número de brotes/explante y tamaño del brote (mm) no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,4803$ y $p=0,5401$ respectivamente). No se obtuvo resultados favorables en cuanto a la formación de brotes mediante los tratamientos aplicados.

Si se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para las variables: altura de la planta (cm) ($p=0,0026$), número hojas/explante ($p=0,0264$) y número de nudos/explante ($p=0,0021$). El T9 (1 mg/L 2ip + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco) es el mejor tratamiento para promover la elongación del explante, pues obtuvo el valor promedio más alto de altura (5,31 cm), con (5,79) hojas/explante y (3,99) nudos/explante en promedio; frente al T3 (1 mg/l BAP + 25 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco) que presentó los valores promedio más bajos con 3,37 cm de altura de la planta, (2,72) hojas formadas y (1,78) nudos/explante en promedio (Cuadro 19).

Cuadro 19. Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas a los tres meses en el ensayo de brotamiento *in vitro* de explantes de *L. huasango*.

Trat	N° brotes/explante	Tamaño del brote (mm)	Altura de la planta (cm)	N° Hojas/explante	N° Nudos/explante
T1	0,00 \pm 0,06a	0,00 \pm 0,62a	3,75 \pm 0,27ab	3,40 \pm 0,53ab	2,16 \pm 0,34abc
T2	0,00 \pm 0,06a	0,00 \pm 0,62a	3,72 \pm 0,27ab	3,78 \pm 0,53ab	2,53 \pm 0,34abc
T3	0,00 \pm 0,06a	0,00 \pm 0,62a	3,37 \pm 0,27a	2,72 \pm 0,53 ^a	1,78 \pm 0,34 ^a
T4	0,05 \pm 0,06a	0,29 \pm 0,62a	3,52 \pm 0,27ab	2,78 \pm 0,53 ^a	2,63 \pm 0,34abcd
T5	0,17 \pm 0,06a	0,94 \pm 0,62a	4,19 \pm 0,27bc	3,78 \pm 0,53ab	3,56 \pm 0,34de
T6	0,00 \pm 0,06a	0,00 \pm 0,62a	3,77 \pm 0,27ab	3,40 \pm 0,53ab	2,30 \pm 0,34abc
T7	0,05 \pm 0,06a	0,71 \pm 0,62a	4,62 \pm 0,27d	4,03 \pm 0,53ab	2,91 \pm 0,34bcd
T8	0,00 \pm 0,06a	1,39 \pm 0,62a	3,86 \pm 0,27abc	3,02 \pm 0,53ab	2,05 \pm 0,34ab
T9	0,06 \pm 0,06a	1,39 \pm 0,62a	5,31 \pm 0,27d	5,79 \pm 0,53c	3,99 \pm 0,34e
T10	0,12 \pm 0,06a	1,06 \pm 0,62a	3,68 \pm 0,27ab	3,11 \pm 0,53ab	2,22 \pm 0,34abc
T11	0,12 \pm 0,06a	0,74 \pm 0,62a	3,86 \pm 0,27abc	4,39 \pm 0,53bc	3,04 \pm 0,34cde
T12	0,14 \pm 0,06a	1,61 \pm 0,62a	3,59 \pm 0,27ab	3,88 \pm 0,53ab	2,90 \pm 0,34bcd

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

Durante la evaluación del ensayo se evaluaron adicionalmente las variables número de raíces/explante y longitud de raíces (cm), cuyos resultados demostraron que si existen diferencias significativas entre tratamientos para las dos variables ($p=0,0021$ y $p<0,0001$ respectivamente) (Anexo 5).

El T9 (1 mg/L 2ip + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco) fue el tratamiento que mostró el mayor número de raíces formadas por explante (5,25 \pm 0,72), frente al T3 (1 mg/L BAP + 25 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco), en donde la presencia de raíces formadas por explante fue baja (0,22 \pm 0,72). En cuanto a la longitud de raíces el T7 (1 mg/L KIN + 25 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco) mostró los mejores resultados con 1,54 cm; frente al T1 (1 mg/L BAP + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco) que presentó el valor más bajo con 0,07 cm de longitud de raíces en promedio.

4.6. Enraizamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.6.1. Porcentaje de contaminación

En la evaluación del efecto de las diferentes concentraciones de auxinas para la fase de enraizamiento *in vitro* de explantes, se obtuvo que la variable porcentaje de contaminación si presenta diferencias significativas ($p=0,0008$) entre tratamientos (Anexo 6). Se presentó contaminación en dos tratamientos aplicados durante esta fase, el T2 (1,0 mg/L ANA) cuyo valor fue el más alto ($33,33 \pm 4,71$), frente al T6 (1,5 mg/L AIA) que presentó un valor promedio menor ($16,67 \pm 4,71$) de contaminación causada por hongos y bacterias (Figura 26).

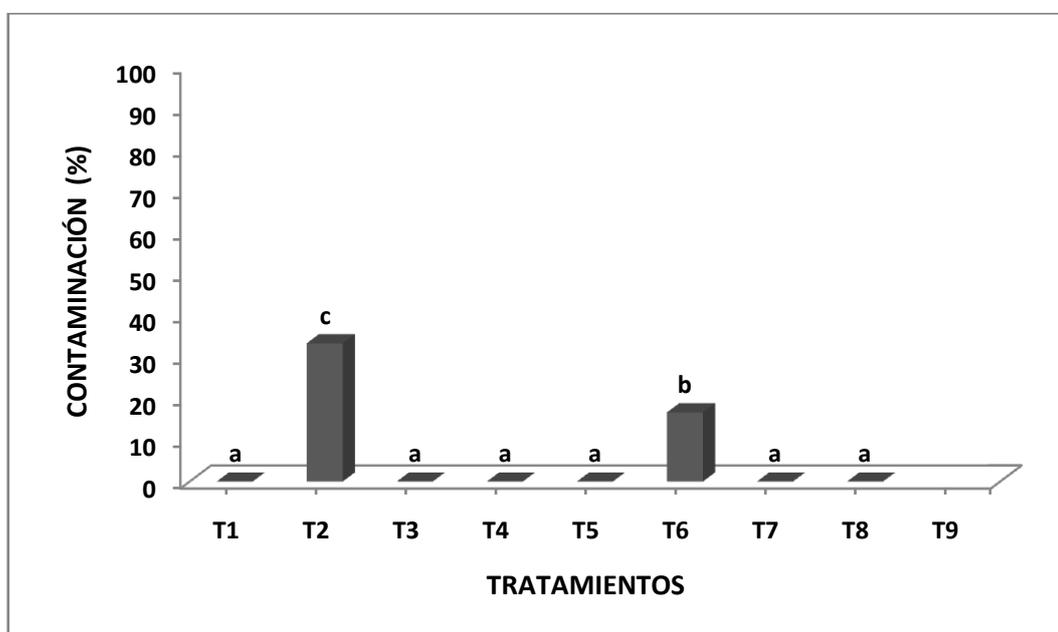


Figura 26. Porcentaje promedio de contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en el enraizamiento *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.6.2. Porcentaje de mortalidad

Los resultados referentes a la variable porcentaje de mortalidad muestran que no existen diferencias significativas ($p=0,3557$) entre tratamientos (Anexo 6). El T3 (1,5 mg/L ANA) presentó el mayor porcentaje de mortalidad ($56,67 \pm 5,83$), frente al T2 (1,0 mg/L ANA) que mostró un valor promedio menor ($36,67 \pm 5,83$) (Figura 27).

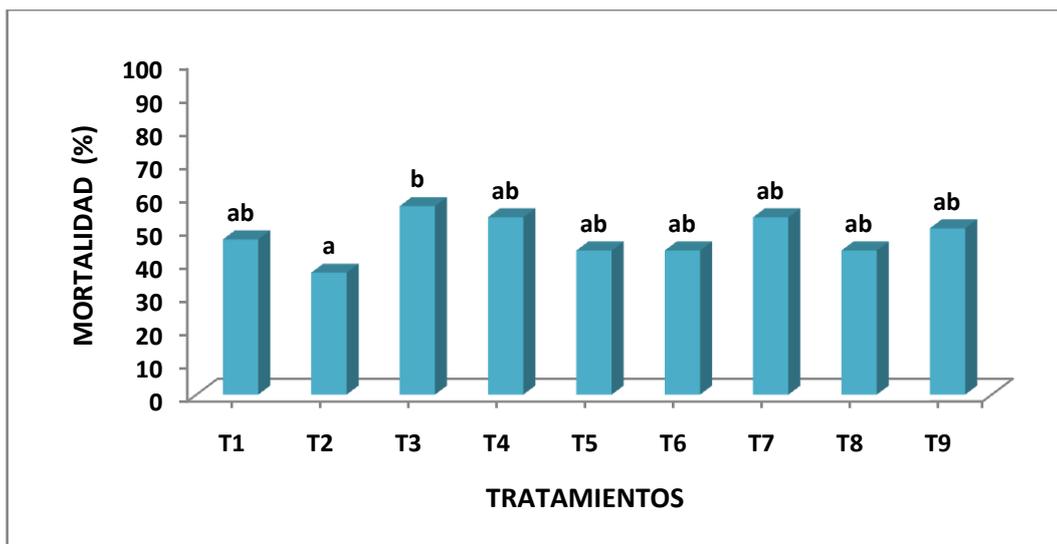


Figura 27. Porcentaje promedio de mortalidad de los diferentes tratamientos aplicados en el enraizamiento *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

4.6.3. Altura de la planta (cm), número de hojas/explante, número de nudos/explante, número de raíces/explante y longitud de raíces (cm)

Los resultados obtenidos referentes a la variable número de raíces/explante indican que si existen diferencias significativas ($p=0,0404$) entre tratamientos; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para las variables; altura de planta (cm) ($p=0,8047$), número de hojas/explante ($p=0,5724$), número de nudos/explante ($p=0,1613$) y longitud de raíces (cm) ($p=0,4285$).

El T6 (1,5 mg/L AIA) obtuvo los mejores resultados en cuanto al número de raíces formadas/explante (23,90) y altura de la planta (4,34 cm); mientras que, el T5 (1 mg/L AIA) obtuvo los valores más altos respecto al número de hojas/explante (5,35) y longitud de raíces (2,63 cm); y el T1 (0,5 mg/L ANA) fue el tratamiento que obtuvo el valor más alto de número de nudos/explante (3,8). En cambio, el T7 (0,5 mg/L AIB) presentó los resultados más bajos en cuanto a la número de raíces formadas (5,87), número de nudos/explante (2,27) y longitud de raíces (1,38 cm); el T9 (1,5 mg/L AIB) presentó el valor promedio más bajo para la variable altura de la planta (3,76 cm) y el T8 (1,0 mg/L AIB) alcanzó el valor más bajo de número de hojas/explante (3,92) en promedio (Cuadro 20),

Cuadro 20. Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas en el ensayo de enraizamiento *in vitro* de explantes de *L. huasango*.

Trat	Altura de la planta (cm)	N° Hojas/explante	N° Nudos/explante	N° Raíces/explante	Longitud de raíces (cm)
T1	3,82 \pm 0,26a	5,28 \pm 0,57a	3,8 \pm 0,44b	10,94 \pm 3,12a	1,94 \pm 0,44 ^a
T2	4,09 \pm 0,26a	4,19 \pm 0,57a	2,75 \pm 0,44ab	12,39 \pm 3,12a	1,39 \pm 0,44 ^a
T3	3,83 \pm 0,26a	4,85 \pm 0,57a	3,27 \pm 0,44ab	11,17 \pm 3,12a	1,75 \pm 0,44 ^a
T4	3,77 \pm 0,26a	4,72 \pm 0,57a	3,57 \pm 0,44ab	8,72 \pm 3,12a	2,16 \pm 0,44 ^a
T5	3,99 \pm 0,26a	5,35 \pm 0,57a	3,58 \pm 0,44ab	14,3 \pm 3,12a	2,63 \pm 0,44a
T6	4,34 \pm 0,26a	4,99 \pm 0,57a	3,57 \pm 0,44ab	23,90 \pm 3,12b	2,41 \pm 0,44a
T7	3,84 \pm 0,26a	4,03 \pm 0,57a	2,27 \pm 0,44a	5,87 \pm 3,12a	1,38 \pm 0,44a
T8	4,03 \pm 0,26a	3,92 \pm 0,57a	2,33 \pm 0,44a	8,97 \pm 3,12a	1,63 \pm 0,44a
T9	3,76 \pm 0,26a	4,39 \pm 0,57a	2,74 \pm 0,44ab	10,9 \pm 3,12a	1,96 \pm 0,44a

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

5. DISCUSIÓN

5.1.Desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Los tratamientos aplicados para la desinfección de las semillas demostraron que las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión influyen en el control de la desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango*, pues en el T1 (25% de hipoclorito de sodio durante 5 min) y el T4 (50% de hipoclorito de sodio durante 5 min) la contaminación nula, lo cual se corrobora con lo manifestado por Hernández y González (2010), quienes mencionan que a medida que aumenta la concentración del hipoclorito de sodio disminuye la incidencia de contaminantes, obteniendo menor contaminación con la concentración ensayada; sin embargo, un aspecto que afecta a la desinfección de las semillas de *Loxopterygium huasango* es la existencia de bacterias endógenas³.

La contaminación inicial por hongos y bacterias de las semillas influye negativamente durante la germinación *in vitro* y también en la supervivencia posterior de las plántulas. Esto se puede atribuir a la asociación de las semillas de especies forestales tropicales con muchos microorganismos, que de manera natural ayudan a los procesos de germinación, pero que representan un factor limitante para los trabajos *in vitro* (Castro 2001). Esta asociación afecta directa o indirectamente el proceso de micropropagación, de manera directa al contaminar y matar los embriones; y de manera indirecta mediante los tratamientos de desinfección aplicados y que pueden ser tóxicos para la semilla (Kunneman y Faaij-Groenen 1998).

Fuentes y Chuquillanque (2003) indican que la presencia de bacterias endógenas permanecen latentes y aparecen en subcultivos avanzados, durante la evaluación del presente ensayo se determinó que el T6 cuya concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión fue mayor (50 % hipoclorito de sodio durante 15 min) obtuvo el mayor porcentaje de contaminación con 35,56 %, por lo que se puede destacar que algunas semillas de la especie *Loxopterygium huasango* presentaron microorganismos endógenos que provocaron la contaminación de las mismas en condiciones *in vitro*.

Los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, las bacterias y levaduras (George 1993, Leifert *et al.* 1994), denominados vitropatógenos, aunque también

³ Las bacterias endógenas habitan dentro de los tejidos de las plantas al menos durante una parte de su ciclo de vida, son consideradas como los contaminantes más comunes y las que ocasionan los problemas más serios, porque su detección es difícil.

existen otros menos frecuentes como los virus, viroides y microartrópodos. El término vitropatógeno ha sido usado para aquellos organismos que no son necesariamente patógenos para las plantas en el campo, pero sí son perjudiciales para células, tejidos u órganos cultivados *in vitro*, mientras que el término patógeno ha sido confinado para describir a un organismo que causa enfermedad a las plantas cultivadas (Leifert *et al.* 1989).

5.2.Desinfección de explantes de campo

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se trata de implantar los cultivos *in vitro* con explantes de campo, es la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por explante –medio de cultivo – condiciones físicas de incubación, es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos (Mroginski *et al.* 2010).

Rache y Pacheco (2012), mencionan que los procesos de asepsia superficial son importantes para mantener la viabilidad y facilitar la reactivación del crecimiento y desarrollo del explante; lo cual coincide con lo manifestado por Roca y Mroginski (1991) quienes señalan que evitar la contaminación es un aspecto básico para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, pues en el mejor de los casos los microorganismos no destruyen los cultivos pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican.

En la presente investigación la contaminación por hongos y bacterias destruyó completamente el cultivo *in vitro* de explantes de campo, pues los resultados del porcentaje de contaminación que se alcanzaron en los seis tratamientos de desinfección aplicados, empleando tres concentraciones de hipoclorito de sodio (15, 20 y 25 % cloro comercial) en dos tiempos de inmersión (5 y 10 min) respectivamente, fueron superiores al 75% de contaminación; esto demuestra lo manifestado por Ramírez y Salazar (1997) y Digonzelli *et al.* (2001), quienes indican, que es difícil controlar la presencia de microorganismos cuando la planta donante crece directamente en el campo y está expuesta a plagas y enfermedades, polvo y agentes, sin ningún tipo de control ambiental; pues los explantes que son tomados de plantas cultivadas en el campo en climas tropicales son más difíciles y a veces imposibles de esterilizar.

Los resultados obtenidos concuerdan con el estudio realizado por Alvarado (1998), donde menciona, que existen bacterias persistentes, capaces de permanecer latentes en el interior de las células, los espacios intercelulares o los haces conductores y quedar protegidos de los agentes químicos empleados en los métodos de desinfección.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación el porcentaje de contaminación en todos los tratamientos aplicados para la desinfección de explantes de campo fue superior al 75%, estos valores difieren a los alcanzados por Vargas *et al.* (2010), al probar la desinfección de explantes provenientes de plántulas de invernadero de *Cedrela salvadorensis*, con hipoclorito de sodio al 3% de concentración, durante 10 minutos, obtuvieron porcentajes de contaminación inferiores al 20%; la comparación de ambos resultados, permiten destacar la importancia que involucra las condiciones en que se encuentra el material donador de explantes. El empleo de plantas establecidas en condiciones de invernadero, facilita el proceso de desinfección e implantación *in vitro*, por el empleo de tejido vegetal joven.

Tang y Newton (2004) y George (1996), señalan que la oxidación fenólica también se constituye en un factor limitante para el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales, especialmente cuando se parte de material colectado directamente en el campo; esto se evidenció en la presente investigación, pues los niveles de fenolización de explantes de campo de *Loxopterygium huasango*, fueron mayores al 70% en los seis tratamientos evaluados, esto coincide con los resultados obtenidos por Méndez y Abdelnour (2014), quienes probando la desinfección de explantes de *Terminalia amazonia*, con hipoclorito de sodio al 3% en 10 y 15 minutos, obtuvieron altos porcentajes de oxidación fenólica con 93,7% y 84,2% respectivamente.

El empleo de soluciones antioxidantes para el enjuague de explantes de campo durante su desinfección y la adición de ácido cítrico (150 mg/L), ácido ascórbico (100 mg/L) y carbón activado (1,5 gr/L) como agentes antioxidantes al medio de cultivo, no lograron controlar la oxidación fenólica, lo cual se corrobora con lo señalado por Albornoz *et al.* (1993) quienes indican que los tejidos adultos de especies leñosas, particularmente de angiospermas, liberan al medio de cultivo pigmentos constituidos principalmente por polifenoles y taninos; debido a ello la oxidación fenólica es un problema latente en el cultivo *in vitro* de las especies leñosas.

George y Sherrington (1984), recomiendan mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja, como un mecanismo para disminuir la oxidación fenólica, pues las enzimas involucradas en la biosíntesis y oxidación de fenoles se incrementan con la luz; por lo cual, se sugiere emplear esta técnica para nuevos ensayos de propagación *in vitro* de explantes de campo de *Loxopterygium huasango*.

5.3. Germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Las giberelinas constituyen una familia de compuestos químicos que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray y Estelle 1998).

Las semillas de especies forestales generalmente no germinan debido a que la testa dura impide la entrada de agua (latencia física), y la semilla no germina a menos que la testa sea escarificada (Poulsen y Stubsgaard 1995).

Álvarez y Varona (1988) manifiestan que es necesario aplicar ciertos tratamientos que permitan alterar la dormancia y promover la germinación de las semillas procurando romper o ablandar la testa.

La aplicación de diferentes métodos de escarificación y distintas concentraciones de ácido giberélico (AG₃) ensayadas, no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, para la variable porcentaje de germinación, sin embargo, en el T1 (Sin escarificación + 0 mg/l AG₃) y T7 (Sin escarificación + 1 mg/l AG₃) se alcanzó porcentajes de germinación *in vitro* de 71,11 y 77,78 % respectivamente, la germinación se inició al cuarto día y se estabilizó al día 16. Estos resultados son similares a los obtenidos por Minchala *et al.* (2014), donde la germinación de *Tabebuia billbergii* utilizando las mismas concentraciones de ácido giberélico (AG₃) y métodos de escarificación, fue del 75%, no existiendo diferencias significativas entre los métodos de escarificación, la germinación se inició al sexto día, con una contaminación del 30 %, causada por bacterias y hongos.

Con respecto a la germinación de semillas de *Loxopterygium huasango*, se obtuvo que el T7 (Sin escarificación + 1 mg/l AG₃) alcanzó el porcentaje de germinación más alto con 77,78%; este valor es similar al obtenido por Díaz (2012), quien alcanzó el 72% de germinación en *Cedrela montana*, utilizando 2 mg/L AG₃. Estos resultados corroboran lo mencionado por Zurita *et al.* (2014), López-Encina y González-Padilla (1996) quienes señalan que la germinación *in vitro* tiene ventajas frente a la propagación sexual por

semillas, ya que pueden aumentar la tasa de germinación, reducir el tiempo y homogenizar la germinación.

Minchala *et al.* (2013), al ensayar la propagación sexual por semillas aplicando diferentes tipos de escarificación (mecánica, física y química) y sustratos estilizados, en cuatro especies forestales nativas y promisorias de la Región Sur del Ecuador; obtuvieron porcentajes de germinación de semillas de *L. huasango*, entre 20 y 40% realizando escarificación mecánica a las semillas, la germinación se produjo entre los 15 a 20 días y finalizó a entre los 38 a 45 días.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, el mayor porcentaje de mortalidad se registró en el T1 (Sin escarificación + 0 mg/l AG₃) con 22,22%; este valor es similar al reportado por Díaz (2012), donde alcanzó el 28% de mortalidad en la fase de germinación *in vitro* de *Cedrela montana*.

5.4. Multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

El empleo de material vegetal aséptico proveniente de vitroplantas, permite disminuir la presencia de agentes contaminantes en el cultivo *in vitro*, pues como lo manifiestan Leifert y Cassels (2001) y Suárez *et al.* (2006) la presencia de contaminantes tanto externos como internos afectan el desempeño de los explantes una vez establecidos en condiciones *in vitro* haciendo indispensable el uso técnicas que permitan la detección de patógenos sistémicos y su desinfección superficial.

Sin embargo, Guerrero y Ramírez (2000) aseguran que la contaminación *in vitro*, puede estar asociada a la disminución del pH durante la esterilización del medio, favoreciendo de esta manera al desarrollo de hongos y al ataque de bacterias, también aducen que esto se debe a la influencia de las bajas concentraciones de hipoclorito de sodio y la mala manipulación del operador.

Por otro lado, es importante tomar en cuenta que el comportamiento de los explantes durante la fase de propagación *in vitro*, requiere de un adecuado balance endógeno de reguladores de crecimiento, siendo imprescindible para la multiplicación *in vitro* de tejidos vegetales (Vázquez y Torres 1995). Los reguladores de crecimiento especialmente el BAP, son necesarios para la proliferación y elongación de brotes. Es ampliamente conocido que una pequeña cantidad de citocinina puede ser sintetizada por los brotes en crecimiento y que esta es insuficiente para inducir el crecimiento y desarrollo *in vitro* de

los brotes y yemas. Por tal razón, más del 85% de los medios de cultivo empleados en la micropropagación incluyen algún suplemento de citocinina (Pérez 1998).

De acuerdo a los resultados alcanzados en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *L. huasango*, el T5 (1 mg/L 2ip) permitió obtener la mayor altura de la planta con 5,21 cm en promedio, el mayor número de hojas (6,16) y número de nudos/explante (5,4), no se presentó contaminación en este tratamiento; sin embargo, la mortalidad fue del 13,33%, que corresponde al valor más bajo registrado en los seis tratamientos aplicados. Por otra parte, respecto a la formación de brotes/explante no se registraron resultados en los tratamientos ensayados durante esta fase; estos resultados difieren a los obtenidos por Montes (2007) que al probar 1,5 mg de BAP junto con 0,5 mg/L de 2ip en la multiplicación de *Switeniahumilis*, obtuvo la formación de brotes con un promedio de 2,3 brotes por explante, hojas de color verde intenso bien formadas y con una altura del brote de 2,1 cm.

En la presente investigación debido a que no se logró la formación de brotes mediante los tratamientos ensayados, es conveniente recomendar el uso de otra citocinina, como es la Benziladenina (BA), pues Zurita *et al.* (2014) en su estudio con *Tilia mexicana* en explantes cultivados en MS con 0, 25 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de BA produjeron 7.75 brotes en un periodo de 60 días, estos resultados concuerdan con lo reportado por Orellana (1998), quien señala que la citocinina BA es la más efectiva y empleada para la inducción de brotes.

5.5. Brotamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Para la formación de brotes *in vitro*, Thorpe y Biondi (1982) señalan que se requiere un balance preciso de los componentes del medio para interactuar con el tejido y determinar la respuesta morfogénica, especialmente de la interacción cuantitativa entre auxinas y citocininas y otros factores como luz y temperatura, entre otros.

Castillo (2004), manifiesta que durante esta fase de brotamiento se espera que los explantes originen brotes axilares con varios nudos y hojas. De acuerdo a los resultados de la presente investigación no se tuvo respuesta en la formación de brotes/explante en los doce tratamientos ensayados para el brotamiento *in vitro* de *Loxopterygium huasango*; no obstante, en el T9 (1 mg/L 2ip + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco) se alcanzó los mejores resultados en altura de la planta con 5,31 cm, un promedio de 6 hojas formadas

y 4 nudos; además, se evidenció la formación de raíces con un promedio de 5,25 raíces/explante de 1,36 cm de longitud.

Sin embargo, estos resultados obtenidos son inferiores a los reportados por Minchala *et al.* (2014) en el brotamiento *in vitro* de *Tabebuia billbergii*, pues al probar 1 mg/L de 2ip suplementado con 25 mg/L de sulfato de adenina, y 20 % de agua coco, obtuvieron plántulas de 6,31 cm de altura, con 6 nudos en promedio y únicamente lograron inducir la formación de un solo brote/explante de 4,8 cm de longitud.

Con base en los resultados obtenidos, es importante señalar, que las concentraciones ensayadas y la adición de agua de coco al medio de cultivo para brotamiento *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango*, no tienen influencia en la formación de brotes.

Con respecto a resultados obtenidos en la formación de brotes/explante de *Loxopterygium huasango* y los reportados por Minchala *et al.* (2014) en *Tabebuia billbergii*, son menores en comparación a los alcanzados por Díaz (2012) en *Cedrela montana*, que utilizando 2,0 mg/L de BAP, alcanzó un promedio de tres brotes por explante; así como también, difieren a los obtenidos por Castillo *et al.* (2011) en su trabajo realizado en *Cedrela odorata*, en el cual probó la combinación de ANA (0,2 mg/L) y BA (2,0 mg/L), logrando la formación de 2,4 brotes/explante; la comparación de estos estudios similares permite corroborar lo señalado por Bernal *et al.* (2009), quienes mencionan que los requerimientos de citocinina en las plantas *in vitro* son extremadamente variables y las respuestas a la inducción de brotes dependen del contenido endógeno de cada especie y del tipo de explante utilizado.

5.6. Enraizamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Las auxinas desempeñan un papel decisivo en muchos procesos del desarrollo vegetal como crecimiento, tropismos, enraizamiento, diferenciación vascular, etc. Teniendo en cuenta la localización de la biosíntesis de la auxina, se debe considerar que el transporte de la hormonas desde los lugares de síntesis hasta los tejidos y órganos implicados en las respuestas puede resultar clave en estos procesos (Acosta 2004).

El efecto de las auxinas en la iniciación y crecimiento de raíces adventicias en condiciones *in vitro* ha sido ampliamente estudiado, y su aplicación en la fase de enraizamiento es de probada conveniencia, aunque existen especies que producen un buen sistema radicular en ausencia de estas (Suárez *et al.* 2006). Por su parte Zurita *et al.* (2014), indican que los

sistemas de enraizamiento como etapa final en un proceso de micropropagación permiten obtener plántulas en óptimas condiciones para su trasplante y aclimatación.

En la presente investigación se evidenció que el T6 (1,5 mg/L AIA) permitió la formación del mayor número de raíces/explante con 23,90, con una longitud promedio de 2,41 cm y altura de las plántulas de 4,34 cm en promedio; estos valores alcanzados son superiores a los reportados por Castillo *et al.* (2011) en *Cedrela odorata*, pues mediante la interacción ANA 0,05 mg/L + AIA 0,05 mg/L obtuvieron un promedio de 6,9 raíces formadas por brote; ocurre lo mismo con los resultados alcanzados por Díaz (2012) en *Cedrela montana*, pues utilizando 1 mg/L AIB, obtuvo un promedio de 2,4 raíces/explante de 3,05 cm de longitud; de igual forma, se tiene que los resultados de la presente investigación son superiores, a los alcanzados por Zurita *et al.* (2014) en *Tilia mexicana*, que empleando 5 mg/L AIB, logró un promedio de 3,3 raíces/explante de 2,47 cm de longitud y altura de las plántulas de 4,51 cm y a los reportados por Minchala *et al.* (2014) en *Tabebuia billbergii*, donde, utilizando 1,0 mg/L AIB, alcanzó una altura de las plántulas de 6,04 cm y formación de 15 raíces/explante de 2,7 cm de longitud en promedio.

Ford *et al.* (2002), mencionan que la auxina endógena (AIA) desempeña un papel importante en el enraizamiento adventicio, lo cual se comprobó con los resultados alcanzados en la presente investigación, pues la adición de 1,5 mg/L de AIA permitió obtener resultados satisfactorios en la formación del mayor número de raíces por explante con 23,90 raíces en promedio; así como también, se corroboró lo manifestado por Pérez (1998), quien señala la importancia de obtener un mayor número de raíces, aún de poca longitud, ya que las plantas obtenidas de cultivo *in vitro* requieren de un buen sistema radicular (mayor número de raíces) para tener éxito en transplante y adaptación a condiciones de invernadero.

6. CONCLUSIONES

- La utilización de 50% de hipoclorito de sodio (cloro comercial) durante 5 minutos para la desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango*, permitió controlar la contaminación. Sin embargo, es importante mencionar que existieron tratamientos en donde se observó contaminación, la cual se debió a la presencia de hongos y bacterias endógenas que permanecen latentes en la especie.
- En la fase de desinfección e implantación *in vitro* de los explantes, no se logró controlar la contaminación y oxidación fenólica mediante los tratamientos ensayados.
- Los métodos de escarificación no incidieron en la germinación *in vitro* de las semillas de *Loxopterygium huasango*, pues el mayor porcentaje de germinación (77,78 %) se obtuvo con el tratamiento sin escarificación + 1 mg/l AG₃
- En la fase de multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales), la adición de 1 mg/L 2ip al medio de cultivo MS, permitió obtener el mejor crecimiento en altura de la planta con 5,21 cm, con 6 hojas formadas y 5 nudos/explante en promedio.
- En la fase de brotamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales), los tratamientos ensayados no permitieron la inducción de brotes, sin embargo, mediante la adición de 1 mg/L 2ip suplementado 5 mg/L de sulfato de adenina al medio de cultivo MS, se obtuvo los mejores resultados en altura de la planta con 5,31 cm en promedio, 6 hojas y 4 nudos formados/explante en promedio; además se evidenció la formación de raíces con un promedio de 5,25 raíces/explante de 1,36 cm de longitud.
- Para la fase de enraizamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) la presencia de 1,5 mg/L de AIA en el medio de cultivo MS, permitió obtener los mejores resultados de enraizamiento, se logró inducir la formación de 24 raíces/explante en promedio, cuya longitud fue de 2,41 cm, la altura promedio de las plántulas fue de 4,34 cm, con 5 hojas y 4 nudos formados/explante.

7. RECOMENDACIONES

- En la selección de semillas de *Loxopterygium huasango*, para la germinación *in vitro*, se recomienda observar las semillas con el estereomicroscopio y de esta manera descartar las semillas vanas (sin embrión).
- En la desinfección de explantes de *Loxopterygium huasango*, es conveniente la utilización de plantas donadoras de explantes establecidas en condiciones de invernadero, pues mediante el tratamiento de las plantas con soluciones fungicidas y bactericida, se puede disminuir la contaminación del material vegetal.
- Durante la fase de implantación *in vitro*, para disminuir la oxidación fenólica de explantes de campo de *Loxopterygium huasango*, se deberían mantener en la oscuridad durante 24 horas, luego pasarlos a una intensidad lumínica baja.
- En la fase de brotamiento *in vitro* de los explantes, es conveniente emplear nuevas citocininas como BA (Benziladenina), para inducir la formación de brotes en explantes de *Loxopterygium huasango*, así como también, ensayar combinaciones de auxinas/citocininas.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abdelnour, A; Escalant, J. 1994. Conceptos básicos de cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 38p.

Acosta, M. 2004. Función del transporte polar y lateral en la formación de gradientes longitudinal y radial de auxina. Relación con el crecimiento, el enraizamiento y los valores de ploidía celular. Universidad de Murcia. En: Metabolismo y modo de acción de fitohormonas. Ed. Universidad de Salamanca, España. 41 p.

Aguirre, Z. 2002. Árboles útiles poco conocidos de la región del sur del Ecuador. Botánica Austroecuatorial-Estudios sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora-Chinchipe. Ediciones Abya-Yala. Quito, Ecuador. 351-374pp

Aguirre, Z. 2012. Especies forestales de los bosques secos del Ecuador. Guía dendrológica para su identificación y caracterización. Proyecto Manejo Forestal Sostenible ante el Cambio Climático. MAE/FAO - Finlandia. Quito, Ecuador. 140 p

Aguirre, Z; Delgado, T. 2005. Vegetación de los bosques secos de Cerro Negro-Cazaderos, Occidente de la Provincia de Loja. 9-24 pp. En: Vázquez M., J. Freire y L. Suárez (Eds.). 2005. Biodiversidad en los bosques secos de la zona de Cerro Negro-Cazaderos, occidente de la provincia de Loja: un reporte de las evaluaciones ecológicas y socioeconómicas rápidas. EcoCiencia, MAE y Proyecto Bosque Seco. Quito.

Aguirre, Z; Kvist, P.2005. Composición florística y estado de conservación de los bosques secos del sur-occidente del Ecuador. Lyonia. Volumen 8 (2): 41-67pp.

Aguirre, Z;Linares-Palomino, R; Kvist, L. 2006. Especies leñosas y formaciones vegetales en los bosques estacionalmente secos de Ecuador y Perú. Arnoldoa 13. 324 -350 pp.

Albornoz, L; Fernández, L; León, S; Castro, C. 1993. Efecto del tratamiento de plantas donantes y del número de explantes a utilizar para el control de la contaminación y ennegrecimiento en el cultivo *in vitro* de *Annonamuricata*L. Memorias VI Jornadas Científicas Técnicas de la Facultad de Agronomía (LUZ). Maracaibo, Venezuela. 23p.

Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de Plantas, 81-104pp.

- Álvarez, O; Varona, T. 1988. Silvicultura. La Habana, Cuba Pueblo y Educación. 318p.
- Bernal, J; Rojas, A; Hine, A. 2009. Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *Swieteniamacrophylla* King (Orden: Meliácea), Tecnología en Marcha 22(3): 34-41pp.
- Camacho, V; Rentería, A; Jiménez, H. 2006. Estudio preliminar para la propagación in vitro de dos especies de pinos. Foresta Veracruzana, 8(2), 27-32pp.
- Cárdenas, R. 2006. Establecimiento *in vitro* de diferentes especies y genotipos del género *Rhododendron* mediante el uso de técnicas de micropropagación. Tesis Doctoral. Universidad Austral de Chile. 97p.
- Castillo, A. 2008. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA. 8p.
- Castillo, A. 2004. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. 8p.
- Castillo, M; Machida, H; Cortés, C; García, F. 2011. (INIFAP), 2CENID-COMEF (INIFAP) Multiplicación y conservación *in vitro* de cedro rojo (*Cedrelaodorata*. L.) a partir de meristemas. VI Reunión Nacional de Innovación Forestal León, Guanajuato. 9p.
- Castro, D. 2001. Micropropagación de *Cedrelaodorata* L.. Universidad de Colombia, 17p.
- Convention on Biological Diversity. 1992. United Nations. 30p.
- Davies, P. 1995. The plant hormones: Their nature, occurrence, and function. En: Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. P.J. Davies (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1-12 pp.
- Díaz, G. 2012. Procesos morfogénicos in vitro de cedro (*Cedrela montanamoritz* ex turcz.) Inducidos, a partir de semillas, para propagación y conservación de germoplasma. Tesis Ing. Forestal. Carrera de Ingeniería Forestal. Universidad Nacional de Loja. 90p.
- Di Rienzo J; Casanoves F; Balzarini M; González L; Tablada M; Robledo C. 2009. InfoStat, versión 2009, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 336 p.

- Digonzelli, P; Díaz, L; Carrizo, J; Lafite, J; Sosa, S. 2001. Diferentes dosis de PPM para controlar la contaminación bacteriana y sus efectos sobre el crecimiento in vitro de la caña de azúcar en la etapa de multiplicación. Revista Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad de Tucumán. Argentina.22-32pp
- Ford, Y; Bonham, E; Cameron, R; Blake, P; Judd, H; Harrison, R. 2002. Adventitious rooting:examining the role of auxin in an easy- and difficult-to- root plant. *PlantGrowthRegulation*, 36 (2): 149-159pp.
- Frid, D. 2009. Reproducción de plantas in vitro y sus beneficios para la agricultura. Disponible en: <http://tecnocienciaysalud.com/plantas-in-vitro> (Consultado mayo 15, 2013).
- Fuentes, S; Chuquillanqui, C. 2003. Las enfermedades causadas por virus y su control. Centro Internacional de la papa. Lima. Perú. 13-31pp.
- George, E. 1993.Plant propagation by tissue culture.Chapter 5.Part 1. 2. Ed. Exegetics Ltd. 1993. 130 – 143p.
- George, E. 1996.Plant propagation by tissue culture; part 2.In Practice.2 ed. Exegetics Limited.England. 1361 p.
- George, E; Sherrington, P.1984. Plant propagation by tissue culture.Exegetics Ltd. 709p.
- Gonzáles, C; Vilca, J. 1998. Micropropagación Vegetativa *in vitro* De Aliso (*Alnusacuminata*). Edición Graficas de ADEFOR. Cajamarca – Perú. 6-13pp.
- González, E; García, C; Correa, J. 2005. Especies forestales del bosque seco Cerro Negro-Cazaderos, Zapotillo-Puyango. Loja – Ecuador. Fundación Ecológica Arcoíris. 39p.
- Gray, W; Estelle, M.1998.Biochemical genetics of plant growth.Curr.Opin.Biotechnol. 9: 196-201pp.
- Guerrero, C; Ramírez, A.2000.Influence of explant source, plant growth regulators and cultu-re environment on culture initiation and establish-ment of *Quercusrobur* L. in vitro. *Journal of ExperimentalBotany* 48(309). 951-962pp.
- Hernández, Y; González, M. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 19p.
- Jácome, J. 2012. Establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis in vitro de meristemas apicales de árboles jóvenes de romerillo (*Podocarpusoleifoluis*) como futura

estrategia de conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito. Tesis Ing. Biotecnología. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. 112p.

Jiménez, G. 1998. Generalidades del Cultivo *in vitro*. En: J. Pérez Ponce (Ed). Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología. Cap.1.Vol.1. IBP. Santa Clara: 13-24pp.

Jordán, M; Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Fisiología vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. 28p.

Jorgensen, P; León – Yáñez, S. 1999. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden Press. USA. 1111 p.

Krikorian, A. 1991. Capítulo 3 Medios de Cultivo: generalidades, composición y preparación. 49 -76pp. En: Roca W. y L. Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali, Colombia. 947p.

Kunneman, B; Faaij-Groenen, G. 1994. Elimination of Bacterial Contaminants: A Matter Of Detection And Transplanting Procedures In: Bacterial and Bacteria-like Contaminants of Plant Tissue Cultures *IshtActa Hort.* 225: 183 -188pp.

Leifert, C; Morris, C.; Waites, W. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences.* Vol. 13p.139-183pp.

Leifert, C; Waites, W; Camotta, H; Nicholas, J. 1989. *Lactobacillus platarum*; a deleterious contaminante of plant tissue. *J. App. Bacteriology*, Vol. 67. 363-370pp.

Leifert, C; Cassells, A. 2001. Microbial hazards in plant tissues and cell culture. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 367:133-138pp.

Linares-Palomino, R; Kvist, P; Aguirre, Z; González, C. 2010. Diversity and endemismo woody plant species in the Equatorial Pacific seasonally dry forests. *Biodiversity and Conservation* 19: 169-185pp.

Llorente, B. 2002. Aislamiento, Purificación, Caracterización y producción *in vitro* de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas). Universidad Nacional de la Plata. Facultad de ciencias exactas. 210p.

- López, M. 1996. Estudio de la expresión genética durante la embriogénesis somática en *Saccharum officinarum* y su relación con el ácido abscísico y la sequía. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. España. 15p.
- López-Encina C; González-Padilla, I. 1996. A propósito de semillas. Enc. en la Biol., 33: 3p.
- Lozada, P. 2010. Evaluación del efecto de auxinas, citoquininas y brasinoesteroides sobre las fases de establecimiento y multiplicación del cultivo in vitro de tomate de árbol (*Solanum betaceae*). Tesis Ing. Biotecnología. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. 92p.
- Marín, J. 1997. La micropropagación y la mejora de especies frutales. Academia de Ciencias Exactas, Física, Química y Naturales de Zaragoza. 35p.
- Martínez, M; Pacheco, J. 2006. Protocolo para la micropropagación de *Furcraea microphylla* Baker. Agronomía Colombiana 24(2): 207-213pp.
- Mejía, A. 1994. Agrobiotecnología Fundamentos y Aplicaciones, Propagación Comercial 312 especies de plantas por cultivo in vitro. La Molina Perú. 79p.
- Méndez, D; Abdelnour, A. 2014. Establecimiento in vitro de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell. Revista Forestal Mesoamericana Kurú, 11(27), 7-21pp.
- Miles, L; Newton, A; DeFries, R; Ravilious, C; May, I; Blyth, S; Kapos, V; Gordon, J. 2006. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. Journal of Biogeography. 33(3):491-505pp.
- Millones, A. 1993. Cultivo de tejidos vegetales in vitro en *Loxopterigium huasango* Lind. (Hualtaco) y *Tecomaweberbaueriana* Kranzl. (Guayacán). Tesis Lic. Botánica. UNPRG, Lambayeque (Perú). 158 p.
- Minchala, J; Eras, V; Muñoz, L; Yaguana, M; Poma, R; Delgado, G. 2013. Propagación sexual y asexual de cuatro especies forestales nativas y promisorias de la Región Sur del Ecuador. Revista CEDAMAZ. Vol.3. N°1. 15-17pp.
- Minchala, J; Eras, V; Poma, R; Yaguana, M; Muñoz, L; Delgado, G. 2014. Propagación in vitro de guayacán negro, *Tabebuia billbergii* (BIGNONIACEAE), a partir de explantes obtenidos de plántulas in vitro. Centro de Biotecnología, Vol. 3 Nro. 1. 9p.

- Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2014. Plan Nacional de Restauración Forestal 2014 – 2017. Quito, Ecuador. 50p
- Montes, M. 2007. Metodología de micropropagación de segmentos nodales de caoba (*Swietenia humilis*), obtenidos mediante semilla seleccionada. Revista Virtual de la Universidad Católica de Occidente. Santa Ana, El Salvador. 56-60pp
- Mroginski, L; Sansberro, P; Flaschland, E. 2010. Capítulo 1: Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. 17-25 pp. En: Levitus G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski, L. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- Muñoz, T. 2003. Embriogénesis Somática en Cedro (*Cedrela Odorata* Linnaeus) a partir de Cotiledones. Tesis Biol. Universidad Nacional Agraria de la Molina. Lima, Perú. 121p.
- Olmos, S; Luciani, G; Galdeano, E. 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Argentina. 12p.
- Orellana, P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. (Pérez J., Ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba. 151 – 178pp.
- Paladines, R. 2003. Propuesta de conservación del Bosque seco en el Sur de Ecuador. Lyonia, Honolulu, 4(2), 183-186pp.
- Pérez, J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Ediciones GEO. Santa Clara, Cuba. 391 p.
- Pérez, J., Mesén, F., Hilje, L., y Aguilar, M. 2004. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Revista Forestal Centroamericana, San José, C.R. 67-71pp.
- Perugorría, M. 2005. Desarrollo de una técnica para la micropropagación de especies leñosas en biorreactores. Facultad de Ciencias. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay. 83p.
- Pierik, R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Trad. Ayerbe, L. 3era Edición. Ediciones Mundi-prensa. Madrid. España 325 p.
- Pierik, R. 1997. *In vitro culture of higher plants*. Springer Science & Business Media. 114p.

- Poulsen, K; Stubsgaard, F. 1995. Tres métodos de escarificación mecánica de semillas de testa dura. Técnicas para la escarificación de semillas forestales. Serie Técnica. Manual Técnico, (36), 35p.
- Rache, L; Pacheco, J. 2012. Establecimiento de un protocolo de propagación de *Physalis peruviana* L. a partir de yemas axilares adultas. Ciencia en Desarrollo. 4(1).16p.
- Ramírez, M; Salazar, E. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayado (*Psidiumguajava*L.). Revista de la Facultad de Agronomía. Vol. 14. 497-506pp.
- Ramos, J. 2012. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. Especialización en Biotecnología Agraria. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). 83p
- Remache, L. 2011. Desarrollo de una técnica de micropropagación *in vitro* de cedro (*Cedrela montana*) a partir de ápices, hojas y entrenudos. Tesis Ing. Forestal. Escuela de Ingeniería Forestal. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 69p.
- Rivero, M. 2011. Cultivo de tejidos vegetales I. Agrobiotecnología Curso 2011. Universidad de Buenos Aires. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. 85p.
- Roca, W; Ramírez, H. 2000. Introducción a la Biotecnología Vegetal. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. CEDAF. Cali, Colombia. 174p.
- Roca, W; Mroginski, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.947p.
- Rout, G; Das, A. 1993. Somatic embryogenesis in callus culture of *Mussaendaerythrophylla* L. cvs. Queen Sirikit&Rosea. Plant Cell, Tiss. & Org. Cult., 35: 199-201pp.
- Salisbury, F; Ross, C. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana. pp. 293-317, 395-451pp.
- Seemann, P. 1993. Utilización de técnicas de micropropagación. En: Barriga P, y M. Neira (eds). Avances en Producción y Sanidad Vegetal. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. 87-109pp.

- Segretín, M. 2010. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI). Consejo Argentino para la información y el Desarrollo de la Biotecnología. 6p.
- Sitbon, F; Perrot-Rechenman, C. 1997. Expression of auxin-regulated genes. *PhysiolPlant* 100: 443–455pp
- Soberón, J; Quiroga, E; Samprieto, A; Vattuone, M. 2005. Citocininas. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina. 3p.
- Soto, B; Valverde, L; Rojas, A; Gómez, A. 2010. Establecimiento *in vitro* de *Cedrelasalvadorensis* Standl. *Tecnología en Marcha*, Vol. 23, N.º 4. 66-73pp.
- Suárez, I; Jarma, A; Ávila, M. 2006. Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de Roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). Universidad de Córdoba. Colombia. 11p.
- Tang, W; Newton, R. 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *PlantScience* 167: 621-628pp.
- Tapia, C. 2004. Iniciación *in vitro* de algunas especies Proteáceas de interés comercial en Chile e Iniciación *in vitro* de *Herbertialahue* una Iridácea chilena de interés ornamental. Tesis Lic. Agr. Santiago. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Departamento de Ciencias Vegetales. 43p.
- Thorpe, T; Bionde, F. 1982. Conifers. En: *Handbook of plant cell culture*. Vol 2. Crop species (Sharp W., D. Evans, P. Ammirato, y Y. Yamada, Eds.), MacMillan, New York. 435-470pp.
- Uribe, M; Ulloa, J; Delaveau, C; Sáez, K; Muñoz, F; Cartes, P. 2012. Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana. Botánica*, 69(1), 105-112pp.
- Vargas, B; Cerdas, L; Vargas, A; Gómez, A. 2010. Establecimiento *in vitro* de *Cedrelasalvadorensis* Standl. *Tecnología en Marcha*, 23(4), 66p.
- Vázquez, E; Torres, S. 1995. *Fisiología Vegetal*. Editorial Pueblo y Educación. Segunda edición. Ciudad de la Habana. 56-75pp.

Vázquez, M; Freire, J; Suárez (Eds.). 2005. Biodiversidad en los bosques secos de la zona de Cerro Negro-Cazaderos, occidente de la provincia de Loja: un reporte de las evaluaciones ecológicas y socioeconómicas rápidas. EcoCiencia, MAE y Proyecto Bosque Seco. Quito. 9-24pp.

Velásquez, M. 1998. Identificación, fenología, usos y clasificación de los árboles y arbustos del bosque seco de Guápala. Tesis de Ingeniero Forestal. Universidad Nacional de Loja. Facultad de Ciencias Agrícolas. Loja - Ecuador. 96p.

Villalobos, V. y Thorpe, T. 1991. Capítulo 6 Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. 127 – 141pp. En: Roca W. y L. Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali, Colombia. 947p.

Weaver, R. 1990. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México DF., MX. Editorial Trillas. 622 p

Zurita, W., Gómez, J., Atrián, E., Hernández, A., Granados, M., García, J., y Sánchez, N. 2014. Establecimiento de un método eficiente de germinación in vitro y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicanaschlecht.*)(TILIACEAE). Polibotánica, (38), 129-144pp.

9. ANEXOS

Anexo 1. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tabla de medidas resumen para el análisis de la información						
Tratamiento	Repetición	Variable	n	Media	D.E.	E.E.
T1	1	% Cont	15	0,00	0,00	0,00
	2	% Cont	15	0,00	0,00	0,00
	3	% Cont	15	0,00	0,00	0,00
T2	1	% Cont	15	13,33	35,19	9,09
	2	% Cont	15	6,67	25,82	6,67
	3	% Cont	15	6,67	25,82	6,67
T3	1	% Cont	15	6,67	25,82	6,67
	2	% Cont	15	6,67	25,82	6,67
	3	% Cont	15	0,00	0,00	0,00
T4	1	% Cont	15	0,00	0,00	0,00
	2	% Cont	15	0,00	0,00	0,00
	3	% Cont	15	0,00	0,00	0,00
T5	1	% Cont	15	13,33	35,19	9,09
	2	% Cont	15	0,00	0,00	0,00
	3	% Cont	15	13,33	35,19	9,09
T6	1	% Cont	15	20,00	41,40	10,69
	2	% Cont	15	46,67	51,64	13,33
	3	% Cont	15	40,00	50,71	13,09
T7	1	% Cont	15	0,00	0,00	0,00
	2	% Cont	15	20,00	41,40	10,69
	3	% Cont	15	0,00	0,00	0,00
T8	1	% Cont	15	26,67	45,77	11,82
	2	% Cont	15	13,33	35,19	9,09
	3	% Cont	15	6,67	25,82	6,67
T9	1	% Cont	15	33,33	48,80	12,60
	2	% Cont	15	26,67	45,77	11,82
	3	% Cont	15	0,00	0,00	0,00

Promedios \pm error estándar de la variable: Porcentaje de contaminación			
Tratamientos	% Contaminación	p-valor	CV
T1	0 \pm 5,54a	p=0,0059	86,41
T2	8,89 \pm 5,54ab		
T3	4,45 \pm 5,54ab		
T4	0 \pm 5,54a		
T5	8,89 \pm 5,54ab		
T6	35,56 \pm 5,54c		
T7	6,67 \pm 5,54ab		
T8	15,56 \pm 5,54ab		
T9	20 \pm 5,54bc		

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

Registros diarios del porcentaje de contaminación

N° Día	TRATAMIENTOS								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	4,45	0	0	22,22	0	15,58	8,89
5	0	8,89	4,45	0	8,89	22,22	4,44	15,58	15,56
6	0	8,89	4,45	0	8,89	22,22	4,44	15,58	20
7	0	8,89	4,45	0	8,89	22,22	6,67	15,58	20
8	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
9	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
10	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
11	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
12	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
13	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
14	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
15	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
16	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
17	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
18	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
19	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
20	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
21	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
22	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
23	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
24	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
25	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
26	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
27	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
28	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
29	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20
30	0	8,89	4,45	0	8,89	35,56	6,67	15,58	20

Anexo 2. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de desinfección de explantes de campo de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tabla de medidas resumen para el análisis de la información						
Tratamiento	Repetición	Variable	n	Media	D.E.	E.E.
T1	1	% Contaminación	10	90,00	31,62	10,00
	1	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
	1	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Contaminación	10	100,00	0,00	0,00
	2	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
	2	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Contaminación	10	90,00	31,62	10,00
	3	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
	3	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
T2	1	% Contaminación	10	80,00	42,16	13,33
	1	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
	1	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Contaminación	10	100,00	0,00	0,00
	2	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
	2	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Contaminación	10	70,00	48,30	15,28
	3	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
	3	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
T3	1	% Contaminación	10	100,00	0,00	0,00
	1	% Oxidación fenólica	10	50,00	52,70	16,67
	1	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Contaminación	10	100,00	0,00	0,00
	2	% Oxidación fenólica	10	70,00	48,30	15,28
	2	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Contaminación	10	100,00	0,00	0,00
	3	% Oxidación fenólica	10	90,00	31,62	10,00
	3	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
T4	1	% Contaminación	10	100,00	0,00	0,00
	1	% Oxidación fenólica	10	70,00	48,30	15,28
	1	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Contaminación	10	100,00	0,00	0,00
	2	% Oxidación fenólica	10	70,00	48,30	15,28
	2	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Contaminación	10	80,00	42,16	13,33
	3	% Oxidación fenólica	10	80,00	42,16	13,33
	3	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
T5	1	% Contaminación	10	90,00	31,62	10,00
	1	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
	1	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Contaminación	10	60,00	51,64	16,33

...Continúa

T5	2	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
	2	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Contaminación	10	90,00	31,62	10,00
	3	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
	3	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
T6	1	% Contaminación	10	70,00	48,30	15,28
	1	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
	1	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Contaminación	10	80,00	42,16	13,33
	2	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
	2	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Contaminación	10	80,00	42,16	13,33
	3	% Oxidación fenólica	10	100,00	0,00	0,00
3	% Supervivencia	10	0,00	0,00	0,00	

Promedios \pm error estándar de las variables: Porcentaje de contaminación y Porcentaje de oxidación fenólica

Tratamientos	% Contaminación		% Oxidación fenólica	
	p-valor	CV	p-valor	CV
	p=0,1452	12,59	p=0,0010	9,38
T1	93,33 \pm 6,38ab		100,00 \pm 4,91b	
T2	83,33 \pm 6,38ab		100,00 \pm 4,91b	
T3	100,00 \pm 6,38b		70,00 \pm 4,91a	
T4	93,33 \pm 6,38ab		73,33 \pm 4,91a	
T5	80,00 \pm 6,38a		100,00 \pm 4,91b	
T6	76,67 \pm 6,38a		100,00 \pm 4,91b	

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

Anexo 3. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de germinación *in vitro* de semillas
Loxopterygium huasango Spruce ex Engl.

Tabla de medidas resumen para el análisis de la información						
Tratamiento	Repetición	Variable	n	Media	D.E.	E.E.
T1	1	% Contaminación	15	6,67	25,82	6,67
	1	% Germinación	15	93,33	25,82	6,67
	1	% Mortalidad	15	26,67	45,77	11,82
	2	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	2	% Germinación	15	60,00	50,71	13,09
	2	% Mortalidad	15	20,00	41,40	10,69
	3	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	3	% Germinación	15	60,00	50,71	13,09
	3	% Mortalidad	15	20,00	41,40	10,69
T2	1	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	1	% Germinación	15	40,00	50,71	13,09
	1	% Mortalidad	15	6,67	25,82	6,67
	2	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	2	% Germinación	15	53,33	51,64	13,33
	2	% Mortalidad	15	20,00	41,40	10,69
	3	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	3	% Germinación	15	46,67	51,64	13,33
	3	% Mortalidad	15	26,67	45,77	11,82
T3	1	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	1	% Germinación	15	66,67	48,80	12,60
	1	% Mortalidad	15	20,00	41,40	10,69
	2	% Contaminación	15	6,67	25,82	6,67
	2	% Germinación	15	40,00	50,71	13,09
	2	% Mortalidad	15	0,00	0,00	0,00
	3	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	3	% Germinación	15	26,67	45,77	11,82
	3	% Mortalidad	15	26,67	45,77	11,82
T4	1	% Contaminación	15	26,67	45,77	11,82
	1	% Germinación	15	80,00	41,40	10,69
	1	% Mortalidad	15	6,67	25,82	6,67
	2	% Contaminación	15	26,67	45,77	11,82
	2	% Germinación	15	40,00	50,71	13,09
	2	% Mortalidad	15	13,33	35,19	9,09
	3	% Contaminación	15	20,00	41,40	10,69
	3	% Germinación	15	40,00	50,71	13,09
	3	% Mortalidad	15	13,33	35,19	9,09
T5	1	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	1	% Germinación	15	73,33	45,77	11,82
	1	% Mortalidad	15	20,00	41,40	10,69
	2	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00

...Continúa

... Continuación Anexo 3

T5	2	% Germinación	15	53,33	51,64	13,33
	2	% Mortalidad	15	6,67	25,82	6,67
	3	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	3	% Germinación	15	66,67	48,80	12,60
	3	% Mortalidad	15	20,00	41,40	10,69
T6	1	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	1	% Germinación	15	53,33	51,64	13,33
	1	% Mortalidad	15	13,33	35,19	9,09
	2	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	2	% Germinación	15	60,00	50,71	13,09
	2	% Mortalidad	15	26,67	45,77	11,82
	3	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	3	% Germinación	15	80,00	41,40	10,69
T7	3	% Mortalidad	15	13,33	35,19	9,09
	1	% Contaminación	15	6,67	25,82	6,67
	1	% Germinación	15	60,00	50,71	13,09
	1	% Mortalidad	15	13,33	35,19	9,09
	2	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
	2	% Germinación	15	93,33	25,82	6,67
	2	% Mortalidad	15	6,67	25,82	6,67
	3	% Contaminación	15	0,00	0,00	0,00
T8	3	% Germinación	15	80,00	41,40	10,69
	3	% Mortalidad	15	20,00	41,40	10,69
	1	% Contaminación	15	6,67	25,82	6,67
	1	% Germinación	15	66,67	48,80	12,60
	1	% Mortalidad	15	33,33	48,80	12,60
	2	% Contaminación	15	20,00	41,40	10,69
	2	% Germinación	15	73,33	45,77	11,82
	2	% Mortalidad	15	0,00	0,00	0,00
T9	3	% Contaminación	15	13,33	35,19	9,09
	3	% Germinación	15	33,33	48,80	12,60
	3	% Mortalidad	15	13,33	35,19	9,09
	1	% Contaminación	15	20,00	41,40	10,69
	1	% Germinación	15	60,00	50,71	13,09
	1	% Mortalidad	15	26,67	45,77	11,82
	2	% Contaminación	15	20,00	41,40	10,69
	2	% Germinación	15	20,00	41,40	10,69
T9	2	% Mortalidad	15	20,00	41,40	10,69
	3	% Contaminación	15	40,00	50,71	13,09
	3	% Germinación	15	53,33	51,64	13,33
	3	% Mortalidad	15	13,33	35,19	9,09

....Continúa

....Continuación Anexo 3

Promedios \pm error estándar de las variables: porcentaje de germinación, porcentaje de mortalidad y porcentaje de contaminación						
Tratamiento	% Germinación		% Mortalidad		% Contaminación	
	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV
	p=0,2728	30,59	p=0,9215	57,52	p<0,0001	64,95
T1	71,11 \pm 10,29ab		22,22 \pm 5,49a		2,22 \pm 2,96a	
T2	46,67 \pm 10,29a		17,78 \pm 5,49a		0 \pm 2,96a	
T3	44,44 \pm 10,29a		15,56 \pm 5,49a		2,22 \pm 2,96a	
T4	53,33 \pm 10,29ab		11,11 \pm 5,49a		24,44 \pm 2,96c	
T5	64,44 \pm 10,29ab		15,56 \pm 5,49a		0 \pm 2,96a	
T6	64,44 \pm 10,29ab		17,78 \pm 5,49a		0 \pm 2,96a	
T7	77,78 \pm 10,29b		13,33 \pm 5,49a		2,22 \pm 2,96a	
T8	57,78 \pm 10,29ab		15,56 \pm 5,49a		13,33 \pm 2,96b	
T9	44,44 \pm 10,29a		20,00 \pm 5,49a		26,67 \pm 2,96c	

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

Registros diarios del porcentaje de germinación									
N° Día	TRATAMIENTOS								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	2,22	0,00	2,22	0,00	0,00	2,22	2,22	0,00	0,00
5	2,22	0,00	11,11	0,00	0,00	6,67	17,78	0,00	0,00
6	2,22	0,00	15,56	0,00	0,00	26,67	22,22	0,00	0,00
7	28,89	0,00	22,22	22,22	0,00	28,89	33,33	11,11	22,22
8	40,00	8,89	33,33	22,22	15,56	40,00	46,67	31,11	28,89
9	48,89	8,89	33,33	33,33	15,56	40,00	57,78	37,78	33,33
10	53,33	8,89	37,78	37,78	15,56	40,00	66,67	44,44	42,22
11	60,00	17,78	37,78	42,22	42,22	57,78	71,11	44,44	42,22
12	60,00	24,44	37,78	44,44	53,33	62,22	73,33	44,44	42,22
13	60,00	26,67	40,00	44,44	55,56	62,22	73,33	44,44	42,22
14	71,11	33,33	42,22	46,67	57,78	62,22	73,33	48,89	44,44
15	71,11	40,00	42,22	46,67	60,00	62,22	73,33	48,89	44,44
16	71,11	40,00	42,22	53,33	60,00	62,22	77,78	48,89	44,44
17	71,11	42,22	44,44	53,33	60,00	62,22	77,78	48,89	44,44
18	71,11	44,44	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
19	71,11	44,44	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
20	71,11	46,67	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
21	71,11	46,67	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
22	71,11	46,67	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
23	71,11	46,67	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
24	71,11	46,67	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
25	71,11	46,67	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
26	71,11	46,67	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
27	71,11	46,67	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
28	71,11	46,67	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
29	71,11	46,67	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44
30	71,11	46,67	44,44	53,33	64,44	64,44	77,78	57,78	44,44

Anexo 4. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de multiplicación *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tabla de medidas resumen para el análisis de la información						
Tratamiento	Repetición	Variable	n	Media	D.E.	E.E.
T1	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
	1	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	1	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	1	Altura de la planta (cm)	10	3,92	0,17	0,09
	1	N° Hojas	10	6,00	1,63	0,82
	1	N° Nudos	10	4,25	0,96	0,48
	2	% Contaminación	10	10,00	31,62	10,00
	2	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
	2	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	2	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,50	0,87	0,43
	2	N° Hojas	10	2,00	0,00	0,00
	2	N° Nudos	10	2,25	0,50	0,25
	3	% Contaminación	10	20,00	42,16	13,33
	3	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	3	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	3	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	3	Altura de la planta (cm)	10	4,13	0,73	0,30
	3	N° Hojas	10	3,50	1,52	0,62
	3	N° Nudos	10	2,83	1,17	0,48
T2	1	% Contaminación	10	30,00	48,30	15,28
	1	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
	1	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	1	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	1	Altura de la planta (cm)	10	3,77	0,49	0,28
	1	N° Hojas	10	4,33	0,58	0,33
	1	N° Nudos	10	2,67	0,58	0,33
	2	% Contaminación	10	30,00	48,30	15,28
	2	% Mortalidad	10	80,00	42,16	13,33
	2	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	2	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,20	0,28	0,20
	2	N° Hojas	10	4,00	2,83	2,00
	2	N° Nudos	10	3,00	2,83	2,00
	3	% Contaminación	10	40,00	51,64	16,33
3	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33	
3	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00	
3	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00	
3	Altura de la planta (cm)	10	3,10	0,14	0,07	

....Continúa

... Continuación Anexo 4

T2	3	N° Hojas	10	3,00	0,00	0,00
	3	N° Nudos	10	2,00	0,82	0,41
T3	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	70,00	48,30	15,28
	1	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	1	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	1	Altura de la planta (cm)	10	4,93	0,51	0,30
	1	N° Hojas	10	6,33	0,58	0,33
	1	N° Nudos	10	5,33	0,58	0,33
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
	2	N° Brotes	10	0,25	0,50	0,25
	2	Tamaño del brote (mm)	10	3,00	6,00	3,00
	2	Altura de la planta (cm)	10	4,53	0,70	0,35
	2	N° Hojas	10	6,00	1,15	0,58
	2	N° Nudos	10	4,50	1,29	0,65
	3	% Contaminación	10	40,00	51,64	16,33
	3	% Mortalidad	10	70,00	48,30	15,28
	3	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	3	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	3	Altura de la planta (cm)	10	3,77	0,21	0,12
	3	N° Hojas	10	6,00	1,00	0,58
	3	N° Nudos	10	4,33	0,58	0,33
T4	1	% Contaminación	10	40,00	51,64	16,33
	1	% Mortalidad	10	20,00	42,16	13,33
	1	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	1	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	1	Altura de la planta (cm)	10	4,50	1,03	0,46
	1	N° Hojas	10	6,00	1,87	0,84
	1	N° Nudos	10	4,80	1,92	0,86
	2	% Contaminación	10	20,00	42,16	13,33
	2	% Mortalidad	10	10,00	31,62	10,00
	2	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	2	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	2	Altura de la planta (cm)	10	5,55	2,28	0,81
	2	N° Hojas	10	6,25	1,91	0,67
	2	N° Nudos	10	5,38	1,69	0,60
	3	% Contaminación	10	10,00	31,62	10,00
	3	% Mortalidad	10	30,00	48,30	15,28
	3	N° Brotes	10	0,33	0,52	0,21
	3	Tamaño del brote (mm)	10	7,83	12,46	5,09
	3	Altura de la planta (cm)	10	3,87	0,64	0,26
	3	N° Hojas	10	5,83	2,04	0,83
	3	N° Nudos	10	3,67	1,03	0,42

...Continúa

T5	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	20,00	42,16	13,33
	1	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	1	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	1	Altura de la planta (cm)	10	5,31	2,21	0,78
	1	N° Hojas	10	6,38	1,85	0,65
	1	N° Nudos	10	4,75	1,91	0,67
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	10,00	31,62	10,00
	2	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	2	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	2	Altura de la planta (cm)	10	4,44	1,26	0,42
	2	N° Hojas	10	6,33	1,41	0,47
	2	N° Nudos	10	5,11	1,27	0,42
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	10,00	31,62	10,00
	3	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	3	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	3	Altura de la planta (cm)	10	5,88	2,16	0,72
	3	N° Hojas	10	5,78	1,20	0,40
	3	N° Nudos	10	6,33	1,80	0,60
T6	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	1	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	1	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	1	Altura de la planta (cm)	10	5,22	1,90	0,85
	1	N° Hojas	10	4,20	1,79	0,80
	1	N° Nudos	10	3,80	1,30	0,58
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	2	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	2	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,50	0,76	0,31
	2	N° Hojas	10	3,00	1,79	0,73
	2	N° Nudos	10	2,50	1,22	0,50
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	3	N° Brotes	10	0,00	0,00	0,00
	3	Tamaño del brote (mm)	10	0,00	0,00	0,00
	3	Altura de la planta (cm)	10	4,58	1,09	0,44
	3	N° Hojas	10	4,83	2,23	0,91
	3	N° Nudos	10	4,17	1,73	0,70

Continúa Anexo 4....

....Continuación Anexo 4

Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas en el ensayo de multiplicación <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>														
Tratamientos	% Contaminación		% Mortalidad		N° Brotes/explante		Tamaño del brote (mm)		Altura de la planta (cm)		N° Hojas/explante		N° Nudos/explante	
	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV
	p=0,0360	91,86	p<0,0001	21,60	p=0,5660	302,84	p=0,5310	328,48	p=0,0620	15,20	p=0,0123	19,41	p=0,006	20,03
T1	10,00 \pm 7,07ab		53,33 \pm 5,61bc		0,00 \pm 0,06a		0,00 \pm 1,14a		3,85 \pm 0,38ab		3,83 \pm 0,56a		3,11 \pm 0,46a	
T2	33,33 \pm 7,07c		66,67 \pm 5,61cd		0,00 \pm 0,06a		0,00 \pm 1,14a		3,36 \pm 0,38a		3,78 \pm 0,56a		2,56 \pm 0,46a	
T3	13,33 \pm 7,07abc		73,33 \pm 5,61d		0,08 \pm 0,06a		1,00 \pm 1,14a		4,41 \pm 0,38abc		6,11 \pm 0,56b		4,72 \pm 0,46bc	
T4	23,33 \pm 7,07bc		20,00 \pm 5,61a		0,11 \pm 0,06a		2,61 \pm 1,14a		4,64 \pm 0,38bc		6,03 \pm 0,56b		4,62 \pm 0,46bc	
T5	0,00 \pm 7,07a		13,33 \pm 5,61a		0,00 \pm 0,06a		0,00 \pm 1,14a		5,21 \pm 0,38c		6,16 \pm 0,56b		5,4 \pm 0,46c	
T6	0,00 \pm 7,07a		43,33 \pm 5,61b		0,00 \pm 0,06a		0,00 \pm 1,14a		4,43 \pm 0,38abc		4,01 \pm 0,56a		3,49 \pm 0,46ab	

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

Anexo 5. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de brotamiento *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tabla de medidas resumen para el análisis de la información							
Tratamiento	Repetición	Variable	n	Media	D.E.	E.E.	
T1	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
	1	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67	
	1	N° Brotes	10	0	0	0	
	1	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0	
	1	Altura de la planta (cm)	10	3,86	0,4	0,18	
	1	N° Hojas	10	3,6	1,67	0,75	
	1	N° Nudos	10	2,4	2,07	0,93	
	1	N° Raíces/explante	10	0	0	0	
	1	Longitud raíces (cm)	10	0	0	0	
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
	2	% Mortalidad	10	70,00	48,30	15,28	
	2	N° Brotes	10	0	0	0	
	2	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0	
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,6	0,3	0,17	
	2	N° Hojas	10	3	1	0,58	
	2	N° Nudos	10	1,67	0,58	0,33	
	2	N° Raíces/explante	10	0,33	0,58	0,33	
	2	Longitud raíces (cm)	10	0,1	0,17	0,1	
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
	3	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67	
	3	N° Brotes	10	0	0	0	
	3	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0	
	3	Altura de la planta (cm)	10	3,8	0,68	0,3	
	3	N° Hojas	10	3,6	1,52	0,68	
	3	N° Nudos	10	2,4	1,14	0,51	
	3	N° Raíces/explante	10	0,8	1,79	0,8	
	3	Longitud raíces (cm)	10	0,1	0,22	0,1	
	T2	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
		1	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
		1	N° Brotes	10	0	0	0
1		Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0	
1		Altura de la planta (cm)	10	3,7	0,22	0,11	
1		N° Hojas	10	3	1,41	0,71	
1		N° Nudos	10	1,75	0,96	0,48	
1		N° Raíces/explante	10	0	0	0	
1		Longitud raíces (cm)	10	0	0	0	
2		% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
2		% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33	
2		N° Brotes	10	0	0	0	
2		Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0	

....Continúa

T2	2	Altura de la planta (cm)	10	3,5	0,3	0,12
	2	N° Hojas	10	3	1,1	0,45
	2	N° Nudos	10	2,33	1,51	0,61
	2	N° Raíces/explante	10	0,83	2,04	0,83
	2	Longitud raíces (cm)	10	0,02	0,04	0,02
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	3	N° Brotes	10	0	0	0
	3	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
	3	Altura de la planta (cm)	10	3,95	0,71	0,29
	3	N° Hojas	10	5,33	1,21	0,49
	3	N° Nudos	10	3,5	1,52	0,62
	3	N° Raíces/explante	10	2,33	2,25	0,92
	3	Longitud raíces (cm)	10	0,3	0,31	0,13
	T3	1	% Contaminación	10	0,00	0,00
1		% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
1		N° Brotes	10	0	0	0
1		Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
1		Altura de la planta (cm)	10	3,17	0,1	0,05
1		N° Hojas	10	2	0,82	0,41
1		N° Nudos	10	1	0	0
1		N° Raíces/explante	10	0	0	0
1		Longitud raíces (cm)	10	0	0	0
2		% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
2		% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
2		N° Brotes	10	0	0	0
2		Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
2		Altura de la planta (cm)	10	3,3	0,24	0,12
2		N° Hojas	10	2,5	1	0,5
2	N° Nudos	10	2,5	1	0,5	
2	N° Raíces/explante	10	0,5	1	0,5	
2	Longitud raíces (cm)	10	0,28	0,55	0,28	
3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
3	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33	
3	N° Brotes	10	0	0	0	
3	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0	
3	Altura de la planta (cm)	10	3,65	0,83	0,34	
3	N° Hojas	10	3,67	1,37	0,56	
3	N° Nudos	10	1,83	1,6	0,65	
3	N° Raíces/explante	10	0,17	0,41	0,17	
3	Longitud raíces (cm)	10	0,08	0,2	0,08	
T4	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	1	N° Brotes	10	0	0	0
	1	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0

....Continúa

T4	1	Altura de la planta (cm)	10	3,25	0,51	0,21	
	1	N° Hojas	10	2	1,1	0,45	
	1	N° Nudos	10	2,67	1,63	0,67	
	1	N° Raíces/explante	10	0,5	1,22	0,5	
	1	Longitud raíces (cm)	10	0,08	0,2	0,08	
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
	2	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67	
	2	N° Brotes	10	0	0	0	
	2	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0	
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,34	0,43	0,19	
	2	N° Hojas	10	2,2	0,84	0,37	
	2	N° Nudos	10	1,8	0,84	0,37	
	2	N° Raíces/explante	10	0	0	0	
	2	Longitud raíces (cm)	10	0	0	0	
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
	3	% Mortalidad	10	30,00	48,30	15,28	
	3	N° Brotes	10	0,14	0,38	0,14	
	3	Tamaño del brote (mm)	10	0,86	2,27	0,86	
	3	Altura de la planta (cm)	10	3,96	0,7	0,26	
	3	N° Hojas	10	4,14	1,95	0,74	
	3	N° Nudos	10	3,43	0,98	0,37	
	3	N° Raíces/explante	10	2,57	2,94	1,11	
	3	Longitud raíces (cm)	10	0,5	0,43	0,16	
	T5	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
		1	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
		1	N° Brotes	10	0	0	0
		1	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
		1	Altura de la planta (cm)	10	4,17	1,12	0,46
		1	N° Hojas	10	4	1,67	0,68
		1	N° Nudos	10	3	1,26	0,52
		1	N° Raíces/explante	10	2,33	2,25	0,92
		1	Longitud raíces (cm)	10	1,62	2,51	1,03
		2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
2		% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33	
2		N° Brotes	10	0	0	0	
2		Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0	
2		Altura de la planta (cm)	10	4,25	0,96	0,48	
2		N° Hojas	10	3,5	0,58	0,29	
2		N° Nudos	10	3,5	1,73	0,87	
2		N° Raíces/explante	10	4	1,41	0,71	
2		Longitud raíces (cm)	10	1,13	0,3	0,15	
3		% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
3		% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33	
3		N° Brotes	10	0,5	0,55	0,22	
3	Tamaño del brote (mm)	10	2,83	3,19	1,3		

....Continúa

T5	3	Altura de la planta (cm)	10	4,15	0,81	0,33
	3	N° Hojas	10	3,83	1,33	0,54
	3	N° Nudos	10	4,17	1,94	0,79
	3	N° Raíces/explante	10	3,17	4,02	1,64
	3	Longitud raíces (cm)	10	0,77	1,01	0,41
	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	1	N° Brotes	10	0	0	0
	1	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
	1	Altura de la planta (cm)	10	4,02	1,21	0,5
T6	1	N° Hojas	10	3,83	1,47	0,6
	1	N° Nudos	10	2,5	1,05	0,43
	1	N° Raíces/explante	10	3,67	5,24	2,14
	1	Longitud raíces (cm)	10	0,42	0,39	0,16
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	2	N° Brotes	10	0	0	0
	2	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,22	0,68	0,28
	2	N° Hojas	10	2,17	1,6	0,65
T7	2	N° Nudos	10	2	0,63	0,26
	2	N° Raíces/explante	10	0,67	1,21	0,49
	2	Longitud raíces (cm)	10	0,15	0,23	0,1
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	3	N° Brotes	10	0	0	0
	3	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
	3	Altura de la planta (cm)	10	4,08	0,71	0,32
	3	N° Hojas	10	4,2	0,84	0,37
	3	N° Nudos	10	2,4	0,55	0,24
T7	3	N° Raíces/explante	10	3,6	3,65	1,63
	3	Longitud raíces (cm)	10	0,36	0,23	0,1
	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	30,00	48,30	15,28
	1	N° Brotes	10	0,14	0,38	0,14
	1	Tamaño del brote (mm)	10	2,14	5,67	2,14
	1	Altura de la planta (cm)	10	3,9	1,18	0,44
	1	N° Hojas	10	3,71	1,89	0,71
	1	N° Nudos	10	2,86	1,35	0,51
	1	N° Raíces/explante	10	2,86	2,27	0,86
T7	1	Longitud raíces (cm)	10	0,87	0,48	0,18
	2	% Contaminación	10	20,00	42,16	13,33
	2	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
	2	N° Brotes	10	0	0	0
2	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0	

....Continúa

T7	2	Altura de la planta (cm)	10	3,92	1,07	0,54
	2	N° Hojas	10	3,5	0,58	0,29
	2	N° Nudos	10	2	0	0
	2	N° Raíces/explante	10	3	2,16	1,08
	2	Longitud raíces (cm)	10	1,75	2,06	1,03
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	20,00	42,16	13,33
	3	N° Brotes	10	0	0	0
	3	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
	3	Altura de la planta (cm)	10	6,04	2,26	0,8
	3	N° Hojas	10	4,88	2,3	0,81
	3	N° Nudos	10	3,88	1,25	0,44
	3	N° Raíces/explante	10	3,5	3,07	1,09
	3	Longitud raíces (cm)	10	1,99	1,9	0,67
	T8	1	% Contaminación	10	0,00	0,00
1		% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
1		N° Brotes	10	0	0	0
1		Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
1		Altura de la planta (cm)	10	4,07	0,63	0,26
1		N° Hojas	10	3,33	1,21	0,49
1		N° Nudos	10	2	0,89	0,37
1		N° Raíces/explante	10	1,5	1,76	0,72
1		Longitud raíces (cm)	10	0,25	0,32	0,13
2		% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
2		% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
2		N° Brotes	10	0	0	0
2		Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
2		Altura de la planta (cm)	10	3,7	0,65	0,29
2		N° Hojas	10	2,6	0,89	0,4
2	N° Nudos	10	2	0	0	
2	N° Raíces/explante	10	3,6	2,51	1,12	
2	Longitud raíces (cm)	10	0,94	1,3	0,58	
T9	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	30,00	48,30	15,28
	3	N° Brotes	10	0	0	0
	3	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
	3	Altura de la planta (cm)	10	3,8	0,7	0,26
	3	N° Hojas	10	3,14	1,21	0,46
	3	N° Nudos	10	2,14	0,69	0,26
	3	N° Raíces/explante	10	1,71	1,7	0,64
	3	Longitud raíces (cm)	10	0,77	1,32	0,5
	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
1	% Mortalidad	10	30,00	48,30	15,28	
1	N° Brotes	10	0	0	0	
1	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0	

....Continúa

T9	1	Altura de la planta (cm)	10	5,7	1,31	0,5
	1	N° Hojas	10	5,71	1,5	0,57
	1	N° Nudos	10	4,29	1,25	0,47
	1	N° Raíces/explante	10	7,57	2,64	1
	1	Longitud raíces (cm)	10	0,99	0,99	0,38
	2	% Contaminación	10	20,00	42,16	13,33
	2	% Mortalidad	10	80,00	42,16	13,33
	2	N° Brotes	10	0	0	0
	2	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
	2	Altura de la planta (cm)	10	4,7	0,85	0,6
	2	N° Hojas	10	6	4,24	3
	2	N° Nudos	10	4	4,24	3
	2	N° Raíces/explante	10	4	5,66	4
	2	Longitud raíces (cm)	10	1,25	1,77	1,25
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
3	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33	
3	N° Brotes	10	0,17	0,41	0,17	
3	Tamaño del brote (mm)	10	4,17	10,21	4,17	
3	Altura de la planta (cm)	10	5,52	2,84	1,16	
3	N° Hojas	10	5,67	1,75	0,71	
3	N° Nudos	10	3,67	1,37	0,56	
3	N° Raíces/explante	10	4,17	4,96	2,02	
3	Longitud raíces (cm)	10	1,85	1,22	0,5	
T10	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	1	N° Brotes	10	0	0	0
	1	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
	1	Altura de la planta (cm)	10	3,86	0,5	0,22
	1	N° Hojas	10	3,2	1,79	0,8
	1	N° Nudos	10	1,8	1,3	0,58
	1	N° Raíces/explante	10	0	0	0
	1	Longitud raíces (cm)	10	0	0	0
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	2	N° Brotes	10	0,17	0,41	0,17
	2	Tamaño del brote (mm)	10	2,17	5,31	2,17
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,75	0,5	0,2
	2	N° Hojas	10	4,33	1,75	0,71
2	N° Nudos	10	2,67	1,63	0,67	
2	N° Raíces/explante	10	2,5	2,43	0,99	
2	Longitud raíces (cm)	10	0,65	0,82	0,34	
3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00	
3	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67	
3	N° Brotes	10	0,2	0,45	0,2	
3	Tamaño del brote (mm)	10	1	2,24	1	

....Continúa

T10	3	Altura de la planta (cm)	10	3,42	0,46	0,21
	3	N° Hojas	10	1,8	0,84	0,37
	3	N° Nudos	10	2,2	0,45	0,2
	3	N° Raíces/explante	10	0	0	0
	3	Longitud raíces (cm)	10	0	0	0
T11	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	1	N° Brotes	10	0,2	0,45	0,2
	1	Tamaño del brote (mm)	10	1,4	3,13	1,4
	1	Altura de la planta (cm)	10	4,08	0,41	0,19
	1	N° Hojas	10	4,6	1,14	0,51
	1	N° Nudos	10	2,8	0,84	0,37
	1	N° Raíces/explante	10	1,6	2,61	1,17
	1	Longitud raíces (cm)	10	0,46	0,92	0,41
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	2	N° Brotes	10	0,17	0,41	0,17
	2	Tamaño del brote (mm)	10	0,83	2,04	0,83
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,65	0,66	0,27
	2	N° Hojas	10	4,83	1,6	0,65
	2	N° Nudos	10	3,33	1,03	0,42
	2	N° Raíces/explante	10	1,67	1,63	0,67
	2	Longitud raíces (cm)	10	0,5	0,67	0,27
	T12	3	% Contaminación	10	0,00	0,00
3		% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
3		N° Brotes	10	0	0	0
3		Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0
3		Altura de la planta (cm)	10	3,85	0,99	0,49
3		N° Hojas	10	3,75	2,36	1,18
3		N° Nudos	10	3	2,16	1,08
3		N° Raíces/explante	10	3,5	6,35	3,18
3		Longitud raíces (cm)	10	0,57	0,8	0,4
1		% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
1		% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
1	N° Brotes	10	0,17	0,41	0,17	
1	Tamaño del brote (mm)	10	2,33	5,72	2,33	
1	Altura de la planta (cm)	10	3,75	0,58	0,24	
1	N° Hojas	10	4,5	0,55	0,22	
1	N° Nudos	10	2,83	0,41	0,17	
1	N° Raíces/explante	10	0,5	0,84	0,34	
1	Longitud raíces (cm)	10	0,27	0,48	0,2	
T12	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
	2	N° Brotes	10	0	0	0
	2	Tamaño del brote (mm)	10	0	0	0

....Continúa

	2	Altura de la planta (cm)	10	3,02	0,32	0,16
	2	N° Hojas	10	2,25	1,26	0,63
	2	N° Nudos	10	2,5	0,58	0,29
	2	N° Raíces/explante	10	0,75	1,5	0,75
	2	Longitud raíces (cm)	10	0,05	0,1	0,05
T12	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	20,00	42,16	13,33
	3	N° Brotes	10	0,25	0,46	0,16
	3	Tamaño del brote (mm)	10	2,5	4,75	1,68
	3	Altura de la planta (cm)	10	3,99	1,01	0,36
	3	N° Hojas	10	4,88	1,55	0,55
	3	N° Nudos	10	3,38	1,3	0,46
	3	N° Raíces/explante	10	3,5	3,07	1,09
	3	Longitud raíces (cm)	10	0,9	1,4	0,49

Continúa Anexo 5...

...Continuación Anexo 5

Promedios ± error estándar de las variables evaluadas en el ensayo de brotamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>														
Tratamientos	% Contaminación		% Mortalidad		N° Brotes/explante		Tamaño del brote (mm)		Altura de la planta (cm)		N° Hojas/explante		N° Nudos/explante	
	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV
	p=0,5465	424,26	p=0,8552	31,07	p=0,4803	187,94	p=0,5401	191,29	p=0,0026	12,05	p=0,0264	24,82	p=0,0021	62,82
T1	0 ± 2,72a		56,67 ± 8,22a		0,00 ± 0,06a		0,00 ± 0,62a		3,75 ± 0,27ab		3,40 ± 0,53ab		2,16 ± 0,34abc	
T2	0 ± 2,72a		53,33 ± 8,22a		0,00 ± 0,06a		0,00 ± 0,62a		3,72 ± 0,27ab		3,78 ± 0,53ab		2,53 ± 0,34abc	
T3	0 ± 2,72a		46,67 ± 8,22a		0,00 ± 0,06a		0,00 ± 0,62a		3,37 ± 0,27a		2,72 ± 0,53a		1,78 ± 0,34a	
T4	0 ± 2,72a		40,00 ± 8,22a		0,05 ± 0,06a		0,29 ± 0,62a		3,52 ± 0,27ab		2,78 ± 0,53a		2,63 ± 0,34abcd	
T5	0 ± 2,72a		46,67 ± 8,22a		0,17 ± 0,06a		0,94 ± 0,62a		4,19 ± 0,27bc		3,78 ± 0,53ab		3,56 ± 0,34de	
T6	0 ± 2,72a		43,33 ± 8,22a		0,00 ± 0,06a		0,00 ± 0,62a		3,77 ± 0,27ab		3,40 ± 0,53ab		2,30 ± 0,34abc	
T7	6,67 ± 2,72a		36,67 ± 8,22a		0,05 ± 0,06a		0,71 ± 0,62a		4,62 ± 0,27d		4,03 ± 0,53ab		2,91 ± 0,34bcd	
T8	0 ± 2,72a		40,00 ± 8,22a		0,00 ± 0,06a		1,39 ± 0,62a		3,86 ± 0,27abc		3,02 ± 0,53ab		2,05 ± 0,34ab	
T9	6,67 ± 2,72a		50,00 ± 8,22a		0,06 ± 0,06a		1,39 ± 0,62a		5,31 ± 0,27d		5,79 ± 0,53c		3,99 ± 0,34e	
T10	0 ± 2,72a		46,67 ± 8,22a		0,12 ± 0,06a		1,06 ± 0,62a		3,68 ± 0,27ab		3,11 ± 0,53ab		2,22 ± 0,34abc	
T11	0 ± 2,72a		50,00 ± 8,22a		0,12 ± 0,06a		0,74 ± 0,62a		3,86 ± 0,27abc		4,39 ± 0,53bc		3,04 ± 0,34cde	
T12	0 ± 2,72a		40,00 ± 8,22a		0,14 ± 0,06a		1,61 ± 0,62a		3,59 ± 0,27ab		3,88 ± 0,53ab		2,90 ± 0,34bcd	

Promedios ± error estándar de las variables adicionales: N° raíces/explante y Longitud de raíces (cm)				
Tratamientos	N° Raíces/explante		Longitud de raíces (cm)	
	p-valor	CV	p-valor	CV
	p=0,0021	424,26	p<0,0001	31,07
T1		0,38 ± 0,72a		0,07 ± 0,19a
T2		1,05 ± 0,72abc		0,11 ± 0,19ab
T3		0,22 ± 0,72a		0,12 ± 0,19ab
T4		1,02 ± 0,72abc		0,19 ± 0,19a
T5		3,17 ± 0,72de		1,17 ± 0,19cd
T6		2,65 ± 0,72bcd		0,31 ± 0,19ab
T7		3,12 ± 0,72cd		1,54 ± 0,19d
T8		2,27 ± 0,72abcd		0,65 ± 0,19bc
T9		5,25 ± 0,72e		1,36 ± 0,19d
T10		0,83 ± 0,72ab		0,22 ± 0,19ab
T11		2,26 ± 0,72abcd		0,51 ± 0,19ab
T12		1,58 ± 0,72abcd		0,41 ± 0,19ab

LSD Fisher $\alpha=0,05$; letras en común significan que los valores no son estadísticamente diferentes

Anexo 6. Resultados obtenidos en la evaluación del ensayo de enraizamiento *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tabla de medidas resumen para el análisis de la información						
Tratamiento	Repetición	Variable	n	Media	D.E.	E.E.
T1	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
	1	Altura de la planta (cm)	10	4,28	0,61	0,3
	1	N° Hojas	10	5	2	1
	1	N° Nudos	10	3,25	1,5	0,75
	1	N° Raíces	10	15,5	6,24	3,12
	1	Longitud de raíces (cm)	10	1,38	0,51	0,25
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,65	0,3	0,12
	2	N° Hojas	10	5,67	1,03	0,42
	2	N° Nudos	10	4,33	0,52	0,21
	2	N° Raíces	10	7,83	8,8	3,59
	2	Longitud de raíces (cm)	10	1,53	1,31	0,54
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	3	Altura de la planta (cm)	10	3,52	0,42	0,17
	3	N° Hojas	10	5,17	1,6	0,65
	3	N° Nudos	10	3,83	1,47	0,6
	3	N° Raíces	10	9,5	4,46	1,82
	3	Longitud de raíces (cm)	10	1,67	1,3	0,53
T2	1	% Contaminación	10	40,00	51,64	16,33
	1	% Mortalidad	10	30,00	48,30	15,28
	1	Altura de la planta (cm)	10	4,7	1,57	0,79
	1	N° Hojas	10	4,5	2,38	1,19
	1	N° Nudos	10	3,25	2,06	1,03
	1	N° Raíces	10	18	9,27	4,64
	1	Longitud de raíces (cm)	10	2,3	0,67	0,33
	2	% Contaminación	10	20,00	42,16	13,33
	2	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	2	Altura de la planta (cm)	10	4,05	0,86	0,43
	2	N° Hojas	10	4,25	0,96	0,48
	2	N° Nudos	10	3	0,82	0,41
	2	N° Raíces	10	12,5	10,85	5,42
	2	Longitud de raíces (cm)	10	0,9	0,42	0,21
	3	% Contaminación	10	40,00	51,64	16,33
3	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33	
3	Altura de la planta (cm)	10	3,52	0,53	0,22	
3	N° Hojas	10	3,83	1,6	0,65	

....Continúa

T2	3	N° Nudos	10	2	0,63	0,26
	3	N° Raíces	10	6,67	5,2	2,12
	3	Longitud de raíces (cm)	10	0,97	0,66	0,27
T3	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	1	Altura de la planta (cm)	10	3,4	0,62	0,28
	1	N° Hojas	10	3,8	1,1	0,49
	1	N° Nudos	10	2,8	0,84	0,37
	1	N° Raíces	10	11	5,34	2,39
	1	Longitud de raíces (cm)	10	1,58	0,68	0,31
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,5	0,47	0,23
	2	N° Hojas	10	5,25	0,5	0,25
	2	N° Nudos	10	3,25	1,5	0,75
	2	N° Raíces	10	12,5	5,92	2,96
	2	Longitud de raíces (cm)	10	2,73	0,49	0,25
T4	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
	3	Altura de la planta (cm)	10	4,6	1,96	0,98
	3	N° Hojas	10	5,5	1,29	0,65
	3	N° Nudos	10	3,75	1,71	0,85
	3	N° Raíces	10	10	4,83	2,42
	3	Longitud de raíces (cm)	10	0,93	0,26	0,13
	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
1	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33	
1	Altura de la planta (cm)	10	3,92	0,43	0,22	
1	N° Hojas	10	5,75	2,36	1,18	
1	N° Nudos	10	4,5	1,91	0,96	
1	N° Raíces	10	7,75	1,71	0,85	
1	Longitud de raíces (cm)	10	3,15	1,55	0,78	
T4	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,82	0,92	0,41
	2	N° Hojas	10	5,2	2,49	1,11
	2	N° Nudos	10	4	2,35	1,05
	2	N° Raíces	10	8,2	4,49	2,01
	2	Longitud de raíces (cm)	10	1,62	0,77	0,35
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	3	Altura de la planta (cm)	10	3,56	0,63	0,28
	3	N° Hojas	10	3,2	2,17	0,97
	3	N° Nudos	10	2,2	1,79	0,8
	3	N° Raíces	10	10,2	4,97	2,22
	3	Longitud de raíces (cm)	10	1,72	1,22	0,54

....Continúa

T5	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	30,00	48,30	15,28
	1	Altura de la planta (cm)	10	3,7	0,45	0,17
	1	N° Hojas	10	4,86	1,07	0,4
	1	N° Nudos	10	3,14	1,07	0,4
	1	N° Raíces	10	16,29	5,44	2,06
	1	Longitud de raíces (cm)	10	2,47	1,52	0,57
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	2	Altura de la planta (cm)	10	4,1	0,63	0,28
	2	N° Hojas	10	4,6	1,82	0,81
	2	N° Nudos	10	3,2	1,1	0,49
	2	N° Raíces	10	14,4	8,08	3,61
	2	Longitud de raíces (cm)	10	2,22	1,41	0,63
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	3	Altura de la planta (cm)	10	4,16	0,52	0,23
	3	N° Hojas	10	6,6	2,3	1,03
	3	N° Nudos	10	4,4	1,52	0,68
	3	N° Raíces	10	12,2	6,14	2,75
	3	Longitud de raíces (cm)	10	3,2	1,05	0,47
T6	1	% Contaminación	10	10,00	31,62	10,00
	1	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	1	Altura de la planta (cm)	10	4,47	0,8	0,33
	1	N° Hojas	10	3,67	1,63	0,67
	1	N° Nudos	10	2,5	1,52	0,62
	1	N° Raíces	10	12,17	9,79	4
	1	Longitud de raíces (cm)	10	0,95	1,05	0,43
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	2	Altura de la planta (cm)	10	4,48	0,76	0,34
	2	N° Hojas	10	5,8	1,64	0,73
	2	N° Nudos	10	4,2	1,64	0,73
	2	N° Raíces	10	20,2	6,76	3,02
	2	Longitud de raíces (cm)	10	3,1	0,9	0,4
	3	% Contaminación	10	40,00	51,64	16,33
	3	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	3	Altura de la planta (cm)	10	4,07	1,08	0,44
	3	N° Hojas	10	5,5	2,07	0,85
	3	N° Nudos	10	4	2,19	0,89
	3	N° Raíces	10	39,33	52,02	21,24
	3	Longitud de raíces (cm)	10	3,17	1,28	0,52
T7	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	60,00	51,64	16,33
	1	Altura de la planta (cm)	10	4,45	0,87	0,43
	1	N° Hojas	10	5,5	1,29	0,65
	1	N° Nudos	10	3	0,82	0,41

....Continúa

T7	1	N° Raíces	10	6	2,71	1,35
	1	Longitud de raíces (cm)	10	1,3	0,64	0,32
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,52	0,23	0,1
	2	N° Hojas	10	3,2	0,84	0,37
	2	N° Nudos	10	1,6	0,55	0,24
	2	N° Raíces	10	6,8	3,11	1,39
	2	Longitud de raíces (cm)	10	1,32	0,87	0,39
	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	3	Altura de la planta (cm)	10	3,54	0,44	0,2
	3	N° Hojas	10	3,4	1,14	0,51
	3	N° Nudos	10	2,2	0,84	0,37
T8	3	N° Raíces	10	4,8	1,92	0,86
	3	Longitud de raíces (cm)	10	1,52	0,74	0,33
	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	1	Altura de la planta (cm)	10	3,45	0,56	0,23
	1	N° Hojas	10	2,67	0,82	0,33
	1	N° Nudos	10	1,33	0,52	0,21
	1	N° Raíces	10	7,17	6,85	2,8
	1	Longitud de raíces (cm)	10	1	0,24	0,1
	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	2	Altura de la planta (cm)	10	4	1,25	0,51
	2	N° Hojas	10	4,5	2,35	0,96
	2	N° Nudos	10	2,67	1,75	0,71
2	N° Raíces	10	9,33	2,66	1,09	
2	Longitud de raíces (cm)	10	1,58	0,54	0,22	
T9	3	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	3	% Mortalidad	10	50,00	52,70	16,67
	3	Altura de la planta (cm)	10	4,64	0,96	0,43
	3	N° Hojas	10	4,6	3,05	1,36
	3	N° Nudos	10	3	1,58	0,71
	3	N° Raíces	10	10,4	3,21	1,44
	3	Longitud de raíces (cm)	10	2,32	0,61	0,27
	1	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	1	% Mortalidad	10	70,00	48,30	15,28
	1	Altura de la planta (cm)	10	4	0,46	0,26
	1	N° Hojas	10	5,33	2,08	1,2
	1	N° Nudos	10	3,33	1,15	0,67
	1	N° Raíces	10	11	1,73	1
	1	Longitud de raíces (cm)	10	2,7	0,56	0,32
T9	2	% Contaminación	10	0,00	0,00	0,00
	2	% Mortalidad	10	30,00	48,30	15,28
	2	Altura de la planta (cm)	10	3,69	0,45	0,17
	2	N° Hojas	10	4	1,41	0,53
	2	N° Nudos	10	2,57	1,62	0,61
	2	N° Raíces	10	13,86	4,56	1,72
	2	Longitud de raíces (cm)	10	2,04	0,91	0,34
	3	% Contaminación	10	0	0	0
	3	% Mortalidad	10	40,00	51,64	16,33
	3	Altura de la planta (cm)	10	3,6	0,35	0,14
	3	N° Hojas	10	3,83	1,83	0,75
	3	N° Nudos	10	2,33	1,75	0,71
	3	N° Raíces	10	7,83	1,83	0,75
	3	Longitud de raíces (cm)	10	1,13	0,35	0,14

Continúa Anexo 6...

....Continuación Anexo 6

Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas en el ensayo de enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>L. huasango</i>														
Tratamientos	% Contaminación		% Mortalidad		Altura de la planta (cm)		N° Hojas/explante		N° Nudos/explante		N° Raíces/explante		Longitud de raíces (cm)	
	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV	p-valor	CV
	p=0,0008	141,53	p=0,3557	21,34	p=0,8047	11,32	p=0,5724	21,41	p=0,1613	24,86	p=0,0404	45,44	p=0,4285	40,38
T1	0 \pm 4,71a		46,67 \pm 5,83ab		3,82 \pm 0,26a		5,28 \pm 0,57a		3,8 \pm 0,44b		10,94 \pm 3,12a		1,94 \pm 0,44a	
T2	33,33 \pm 4,71c		36,67 \pm 5,83a		4,09 \pm 0,26a		4,19 \pm 0,57a		2,75 \pm 0,44ab		12,39 \pm 3,12a		1,39 \pm 0,44a	
T3	0 \pm 4,71a		56,67 \pm 5,83b		3,83 \pm 0,26a		4,85 \pm 0,57a		3,27 \pm 0,44ab		11,17 \pm 3,12a		1,75 \pm 0,44a	
T4	0 \pm 4,71a		53,33 \pm 5,83ab		3,77 \pm 0,26a		4,72 \pm 0,57a		3,57 \pm 0,44ab		8,72 \pm 3,12a		2,16 \pm 0,44a	
T5	0 \pm 4,71a		43,33 \pm 5,83ab		3,99 \pm 0,26a		5,35 \pm 0,57a		3,58 \pm 0,44ab		14,3 \pm 3,12a		2,63 \pm 0,44a	
T6	16,76 \pm 4,71b		43,33 \pm 5,83ab		4,34 \pm 0,26a		4,99 \pm 0,57a		3,57 \pm 0,44ab		23,90 \pm 3,12b		2,41 \pm 0,44a	
T7	0 \pm 4,71a		53,33 \pm 5,83ab		3,84 \pm 0,26a		4,03 \pm 0,57a		2,27 \pm 0,44a		5,87 \pm 3,12a		1,38 \pm 0,44a	
T8	0 \pm 4,71a		43,33 \pm 5,83ab		4,03 \pm 0,26a		3,92 \pm 0,57a		2,33 \pm 0,44a		8,97 \pm 3,12a		1,63 \pm 0,44a	
T9	0 \pm 5,77a		50 \pm 7,14ab		3,76 \pm 0,26a		4,39 \pm 0,57a		2,74 \pm 0,44ab		10,9 \pm 3,12a		1,96 \pm 0,44a	

Anexo 7. Imágenes de la contaminación y fenolización en el ensayo de desinfección de explantes de campo de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

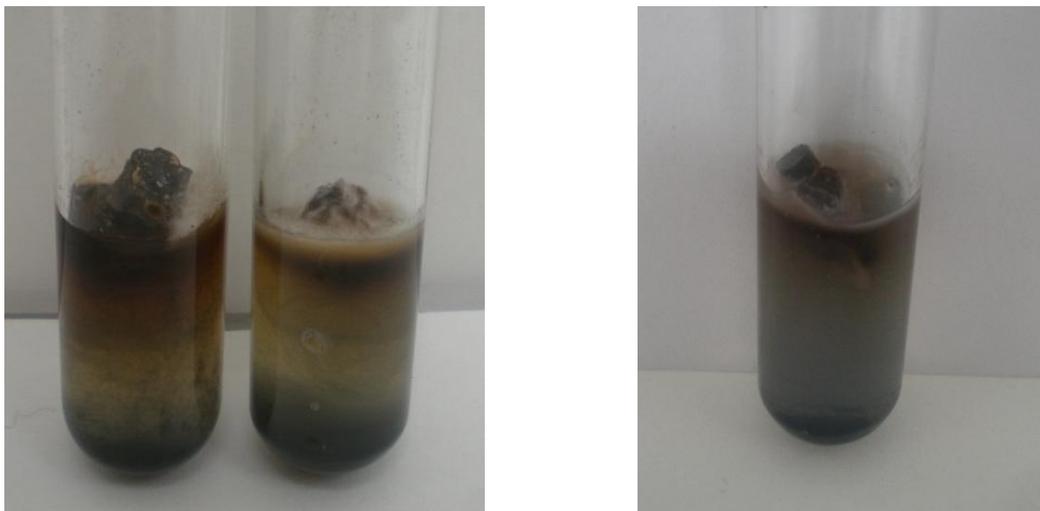


Foto 1. Explantes contaminados por hongos y bacterias

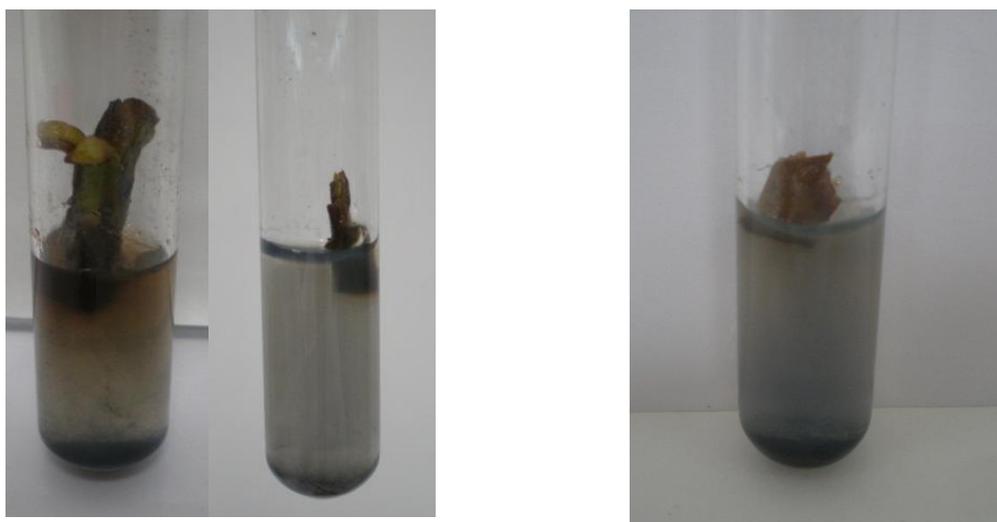


Foto 2. Explantes fenolizados

Anexo 8. Imágenes del ensayo de germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.



Foto 3. Semillas no germinadas



Foto 4. Semillas contaminadas por hongos y bacterias



Foto 5. Plantas obtenidas mediante germinación *in vitro* de semillas con el T1 (Sin escarificación + 0 mg/l AG₃)



Foto 6. Plantas obtenidas mediante germinación *in vitro* de semillas con el T7 (Sin escarificación + 1 mg/l AG₃)

Anexo 9. Imágenes del ensayo de multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.



Foto 7. Explantes contaminados por hongos



Foto 8. Explantes contaminados por bacterias



Foto 9. Explantes muertos



Foto 10. Explantes de multiplicación *in vitro* evaluados a los 90 días en el T5 (1 mg/L Zip), el cual presentó los mejores resultados.

Anexo 10. Imágenes del ensayo de brotamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.



Foto 11. Explantes de brotamiento *in vitro* evaluados a los 90 días en el T9 (1 mg/L 2ip + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco), el cual presentó los mejores resultados en las variables: altura de la planta (cm), N° hojas, N° nudos y N° raíces/explante



Foto 12. Explantes de brotamiento *in vitro* evaluados a los 90 días en el T7 (1 mg/L KIN + 25 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco), el cual obtuvo el mejor resultado en cuanto a la longitud de raíces

Anexo 11. Imágenes del ensayo de enraizamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.



Foto 13. Explantes de enraizamiento *in vitro* evaluados a los 90 días en el T6 (1,5 mg/L AIA), el cual obtuvo el mayor número de raíces formadas/explante

Anexo 12. Imágenes de la toma de datos de los diferentes ensayos durante la investigación



Anexo 13. Imágenes de la socialización de la tesis al equipo técnico del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.



Anexo 14. Imágenes de la socialización de los resultados de la tesis a los estudiantes de Quinto año de la Carrera de Ingeniería Forestal



Anexo 15. Tríptico para la difusión de los resultados de la tesis

RESULTADOS

4. Multiplicación *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango*



Tratamientos	Variables				
	Nº Brotes	Tamaño del brote (mm)	Altura de la planta (cm)	Nº Hojas	Nº Nudos
T1	0	0	3,85	3,83	3,11
T2	0	0	3,36	3,78	2,56
T3	0,08	1	4,41	6,11	4,72
T4	0,11	2,61	4,64	6,03	4,62
T5	0	0	5,21	6,16	5,4
T6	0	0	4,43	4,01	3,49

5. Brotamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango*



Tratamientos	Variables				
	Nº Brotes	Tamaño del brote (mm)	Altura de la planta (cm)	Nº Hojas	Nº Nudos
T1	0	0	3,75	3,40	2,16
T2	0	0	3,72	3,78	2,53
T3	0	0	3,37	2,72	1,78
T4	0,05	0,29	3,52	2,78	2,63
T5	0,17	0,94	4,19	3,78	3,56
T6	0	0	3,77	3,40	2,30
T7	0,05	0,71	4,62	4,03	2,91
T8	0	0	3,86	3,02	2,05
T9	0,06	1,39	5,31	5,79	3,99
T10	0,12	1,06	3,68	3,11	2,22
T11	0,12	0,74	3,86	4,39	3,04
T12	0,14	1,61	3,59	3,88	2,90

6. Enraizamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) de *Loxopterygium huasango*



Tratamientos	Variables				
	Nº Raíces	Longitud de raíces	Altura de la planta (cm)	Nº Hojas	Nº Nudos
T1	10,94	1,94	3,82	5,28	3,8
T2	12,39	1,39	4,09	4,19	2,75
T3	11,17	1,75	3,83	4,85	3,27
T4	8,72	2,16	3,77	4,72	3,57
T5	14,3	2,63	3,99	5,35	3,58
T6	23,90	2,41	4,34	4,99	3,57
T7	5,87	1,38	3,84	4,03	2,27
T8	8,97	1,63	4,03	3,92	2,33
T9	10,9	1,96	3,76	4,39	2,74



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
 Área Agropecuaria y de Recursos
 Naturales Renovables
 Laboratorio de Micropropagación
 Vegetal
 Carrera de Ingeniería Forestal

“Procesos biotecnológicos para la proliferación y enraizamiento *in vitro* de Hualtaco *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl, proveniente del bosque seco de la provincia de Loja”



RESPONSABLE:

Verónica Maribel Conde Solano

DIRECTOR:

Ing. Víctor Hugo Eras Guamán Mg. Sc.

Loja - Ecuador

2015

Cara anterior

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador el estado de conservación de los bosques secos es crítico, debido a la explotación forestal a la que han sido sometidos, así como por su conversión en áreas agrícolas y ganaderas, especialmente en la última mitad del siglo XX (Vásquez et al. 2005).

La micropropagación vegetal de la especie *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl. se plantea como una alternativa de propagación vegetal, ya que esta técnica permite tener un mayor conocimiento de los factores fisiológicos y ambientales involucrados en la formación de órganos adventicios, mediante la propagación in vitro.

Bajo esta perspectiva y con el ánimo de aportar en la obtención de protocolos de propagación in vitro de *Loxopterygium huasango*, se desarrolló la presente investigación

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la generación de procesos biotecnológicos, que permitan la proliferación y enraizamiento in vitro de la especie forestal *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl. proveniente del Bosque Seco de la provincia de Loja, a partir de semillas, ápices caulinares y segmentos nodales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⇒ Evaluar la desinfección de semillas y explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl. aplicando distintas concentraciones y tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio, durante la fase de implantación de los explantes.
- ⇒ Evaluar el efecto de diferentes concentraciones hormonales, para la fase de multiplicación de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl. provenientes de plántulas obtenidas in vitro o del invernadero.
- ⇒ Ensayar diferentes concentraciones hormonales para la fase de brotamiento y enraizamiento de ápices caulinares y segmentos nodales de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.
- ⇒ Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, docentes y estudiantes de la Carrera de Ingeniería Forestal

METODOLOGÍA

1. Ubicación del área de estudio

La investigación se desarrolló dos fases: de laboratorio y de campo. La primera fase se efectuó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, y la segunda fase de campo se efectuó en los cantones: Paltas, Macará y Zapotillo, en donde se realizó la recolección del material vegetal.

2. Metodología para evaluar la desinfección de semillas

Se probaron nueve tratamientos, empleando tres concentraciones de hipoclorito de sodio (25, 50 y 75%) con tres tiempos de inmersión (5, 10 y 15 min) respectivamente. Se evaluó el número de días a la contaminación y % de contaminación.

3. Metodología para evaluar la desinfección e implantación in vitro de explantes de campo

Se utilizó estacas de 50 - 60 cm de largo para la obtención de los explantes, se probaron seis tratamientos para la desinfección, en donde se empleó tres concentraciones de hipoclorito de sodio (15, 20 y 25%) con dos tiempos de inmersión (5 y 10 min) respectivamente, los explantes se inocularon in vitro en medio de cultivo MS, suplementado con vitaminas y antioxidantes. Se evaluó: % contaminación, % oxidación fenólica y % sobrevivencia.

4. Metodología para evaluar la germinación in vitro de semillas

Se probó nueve tratamientos, aplicando tres métodos de escarificación (sin escarificación, físico y mecánico) y la adición de AG_3 al medio de cultivo MS en tres concentraciones (0; 0,5 y 1 mg/L) respectivamente. Se evaluó el número de días a la germinación, % de germinación, % de contaminación y % de mortalidad.

5. Metodología para evaluar la multiplicación, brotamiento y enraizamiento in vitro de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales).

Se utilizó plántulas germinadas in vitro de 4 - 5 cm de altura y de 1 a 2 nudos para la obtención de explantes, en todos los ensayos se empleó el medio de cultivo MS, suplementado con diversos reguladores de crecimiento.

- **Multiplicación in vitro:** se empleó tres citocininas (BAP, KIN y 2ip) en dos concentraciones (1 y 2 mg/L) respectivamente
- **Brotamiento in vitro:** se utilizaron tres citocininas (BAP, KIN y 2ip) en 1 mg/L, suplementadas con sulfato de adenina 5 y 25 mg/L y agua de coco 0 y 20%, respectivamente
- **Enraizamiento in vitro:** se probaron tres auxinas (ANA, AIA y AIB) con tres concentraciones (0,5; 1,0 y 1,5 mg/L), respectivamente.

RESULTADOS

1. Desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango*

La aparición de contaminación se evidenció al cuarto día a partir de la siembra. A continuación se muestran los promedios del porcentaje de contaminación alcanzado en cada tratamiento.



2. Desinfección de explantes de campo de *Loxopterygium huasango*

Los tratamientos aplicados para la desinfección de explantes de campo no permitieron resultados favorables, pues se obtuvo contaminación mayor al 75% causada por hongos y bacterias, referente a la oxidación fenólica fue mayor al 70% y se tuvo el

3. Germinación in vitro de semillas de *Loxopterygium huasango*

La germinación se inició al cuarto día y se estabilizó al día 20. A continuación se presentan los promedios del % germinación, % contaminación y % mortalidad.



Cara posterior