

**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**

**Biotechnological processes for proliferation and rooting *in vitro* of hualtaco
Loxopterygium huasango Spruce ex Engl. from of dry forest in the province of Loja.**

Verónica Maribel Conde Solano¹, Víctor Hugo Eras Guamán², Darlin González Zaruma²;
José Moreno Serrano², Julia Minchala Patiño³, Magaly Yaguana Arévalo³, Ruth Poma
Angamarca³, Cristian Valarezo Ortega³.

¹ Tesista de la Carrera de Ingeniería Forestal, Universidad Nacional de Loja. Ecuador

² Docentes Investigadores, Universidad Nacional de Loja. Ecuador

³ Técnicos del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, Universidad Nacional de Loja.
Ecuador

* Autor para correspondencia: victorhugoeras@hotmail.com // victor.eras@unl.edu.ec

Recibido: 2017-03-31

Aceptado: 12017-06-06

Resumen

La micropropagación *in vitro* de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl es una alternativa de propagación vegetal pues permite mayor conocimiento de factores fisiológicos y ambientales que envuelven el cultivo *in vitro* de esta especie. El objetivo de esta investigación fue la generación de procesos biotecnológicos y enraizamiento *in vitro* a partir de semillas, ápices caulinares y segmentos nodales. El material vegetal se colectó en tres cantones de la provincia de Loja. Metódicamente se utilizó el medio de cultivo Murashige Skoog más reguladores de crecimiento. El ensayo de multiplicación *in vitro* utilizó tres citocininas y tres auxinas. En germinación *in vitro* de semillas probamos tres métodos de escarificación y tres concentraciones de ácido giberélico (AG₃). Para el brotamiento *in vitro* de explantes se utilizó tres citocininas con sulfato de adenina y agua de coco. Se aplicó hipoclorito de sodio al 50 % durante cinco minutos y se controló la contaminación. Se obtuvo el 77,78 % de germinación sin escarificación, con adición de 1 mg/L de AG₃. La citocinina 2ip en concentración de 1 mg/L fue el mejor tratamiento en la multiplicación *in vitro* de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl. En el brotamiento de

explantes con 1 mg/L de 2ip + 5 mg/L de sulfato de adenina y 0% de agua de coco fue el mejor. La adición de 1 mg/L 2ip al medio de cultivo permitió obtener mejor crecimiento de la planta. En la fase de brotamiento, los tratamientos ensayados no permitieron la inducción de brotes, pero adicionando 1 mg/L 2ip suplementado con 5 mg/L de sulfato de adenina al medio se obtuvieron mejores resultados.

Palabras clave: Reguladores de crecimiento, propagación *in vitro*.

Abstract

In vitro micropropagation of *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl is an alternative practice of rapidly multiplying stock plant material to produce a large number of progeny plants, because it allows greater knowledge of physiological and environmental factors that surround the *in vitro* culture of this species. The generation of biotechnological processes and *in vitro* rooting from seeds, shoot apices and nodal segments was the general objective of this research. The plant material was collected in three cantons of Loja province. The Murashige and Skoog medium was employed plus plant growth regulators. The *in vitro* multiplication assay used three cytokinins and three auxins. At *in vitro* germination of seeds it was tested three methods of scarification and three concentrations of AG₃. For the *in vitro* sprout of explants we used three cytokinins with adenine sulfate and coconut water. Applying 50% of sodium hypochlorite for five minutes the contamination was controlled. It was obtained 77.78% of germination without scarification and the addition of 1 mg / L of AG₃. At the *in vitro* multiplication, the use of cytokinin 2ip at a concentration of 1 mg / L was the best plant treatment. In the budding of explants with 1 mg / L of 2ip + 5 mg / L of adenine sulfate and 0% of coconut water, it was the best. The addition of 1 mg / L 2ip to the culture medium allowed a better plant growth. In the budding phase, the treatments tested did not allow the induction of shoots, but adding 1 mg / L 2ip supplemented with 5 mg / L of adenine sulfate to the medium gave better results.

Keywords: growth regulators, *in vitro* propagation.

INTRODUCCIÓN

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). 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 vegetales se encuentran sobre suelos aptos para la producción agrícola, por lo que han sido intervenidos desde siglos pasados (Hocquenghem, A.M. 1998). 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: *Handroanthus chrysanthus*, *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl, *Bursera graveolens*, entre otras, que son características de la región de endemismo tumbesino y representativas de la Región Sur del Ecuador. Por otra parte, el sobrepastoreo de ganado caprino y bovino afecta la regeneración natural, alterando de esta manera la dinámica de crecimiento del bosque (Aguirre y Delgado, 2005).

La reforestación con especies nativas constituye una herramienta promisoriosa para la restauración de ecosistemas degradados en la región sur del Ecuador. Es importante entonces profundizar en el conocimiento de la ecología, silvicultura y 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 en paisajes degradados (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*. La micropropagación constituye 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. La propagación de plantas *in vitro* es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. Permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Los cultivos son realizados por personal especializado en medios específicos (hormonas, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua, etc.) y condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad y luz). Una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso de modo de llevarlo a mayor escala de producción (Segretin, M.E. 2006).

Bajo esta perspectiva se realizó la presente investigación cuyos objetivos son: 1) 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; y, 2) evaluar el efecto de diferentes concentraciones hormonales para las fases de multiplicación, brotamiento y enraizamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales).

Materiales y métodos

Ubicación del área de estudio

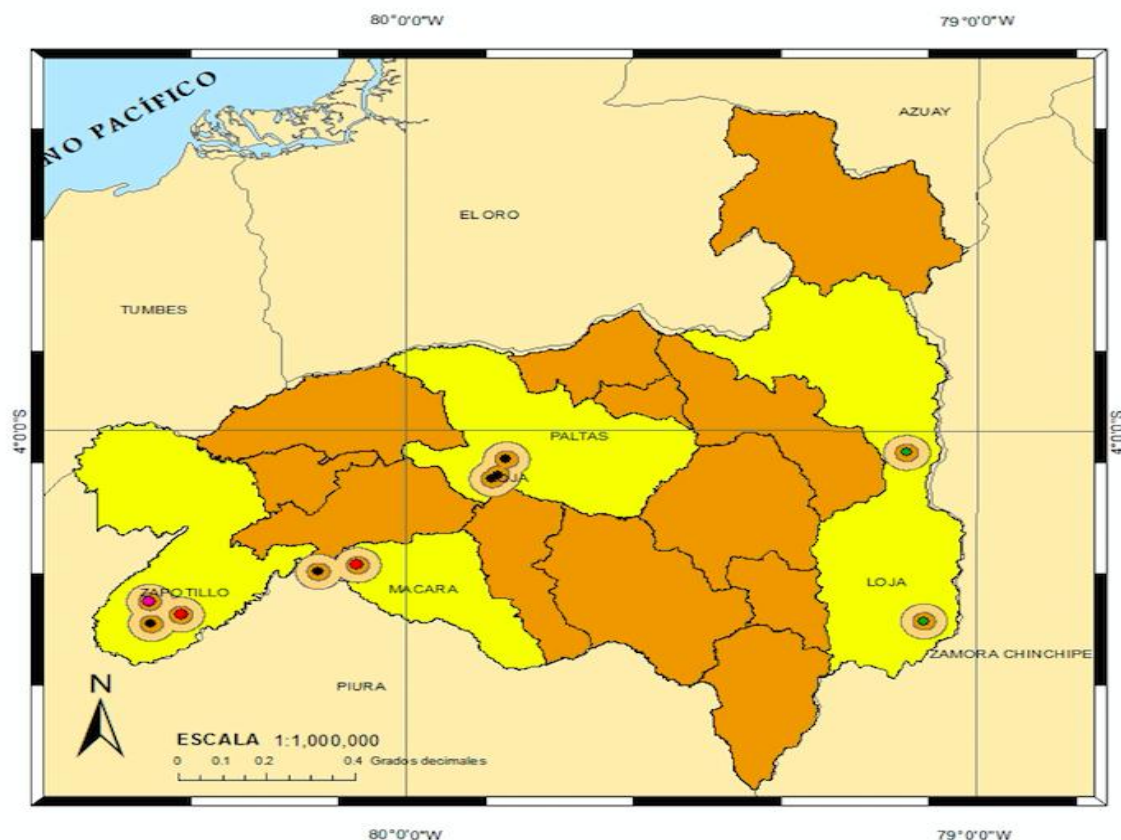


Figura 1. Mapa de la provincia de Loja en el cual se ubican los árboles de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl de los cuales se obtuvo en material vegetal para cada uno de los ensayos desarrollados a nivel *in vitro* de referencia en estudio.

La investigación se desarrolló en dos fases: 1) fase de laboratorio: se la desarrollo 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 de Loja; y, 2) fase de campo: se efectuó en los sectores de Lucarqui – Bramaderos (cantón Paltas), Puente Internacional – Vicín (cantón Macará) y Limones (cantón Zapotillo). En estos sitios se recolecto el material vegetal como: semillas y explantes.

Selección de material Vegetal

Se emplearon semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl recolectadas de árboles previamente seleccionados durante la ejecución 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” de la Universidad Nacional de Loja desde el año 2010 al 2012. En la selección se tomó en cuenta características fenóticas sobresalientes como fuste recto, sano y grueso, capacidad y edad para producir semillas, facilidad de recolección de frutos y buen estado fitosanitario. Además se seleccionó las semillas en base a los siguientes criterios: fisiológicamente maduras, tamaño adecuado y buen estado fitosanitario. La colecta del material vegetal para la obtención de explantes se realizó en 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.

Medio de cultivo

Se utilizó un medio de cultivo basal constituido por sales minerales MS de (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con concentraciones de las vitaminas: 1 mg/L de tiamina y 100 mg/L de mio-inositol; 20 gr/L de sacarosa; y, 6 gr/L de bacto agar, como agente gelificante. Para las fases de brotamiento y enraizamiento *in vitro* de explantes se adicionaron otras vitaminas con las siguientes concentraciones: 5 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mio-inositol, 2 mg/L de piridoxina, 1 mg/L de ácido nicotínico y 2 mg/L de glicina. Además, se agregó 1 ml/L de Ergostín como bioestimulante vegetal, enriquecido con diversos reguladores de crecimiento como bencil amino purina (BAP), kinetina (KIN) y N-isopentenil adenina (2-iP) .

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.8 ± 0.2 con HCl o NaOH 1N. Posteriormente se distribuyó 5 ml del medio de cultivo en tubos de ensayo y 25 ml en frascos de vidrio. Seguidamente se esterilizaron los tubos y frascos en autoclave a 120°C y 1,5 kg/cm² de presión.

Ensayo de desinfección de semillas

Previo el ensayo de germinación, las semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl fueron desinfectadas en la cámara de flujo laminar con alcohol etílico al 70% durante 1 min y enjuague con agua destilada estéril. Para evaluar los efectos del ensayo se utilizó un diseño complementado al azar (DCA) con arreglo factorial. El primer factor fue el hipoclorito de sodio con tres niveles: 1) 25%; 2) 50 % y 3) al 75 %. El segundo factor fue el tiempo de inmersión con tres niveles: 1) 5 minutos de inmersión; 2) 10 minutos y 3) 15 minutos de inmersión. Se obtuvo un diseño 3 x 3 o nueve tratamientos a los que se les aplicaron 3 repeticiones. Los tratamientos a evaluarse fueron los siguientes: T1 = 25 % de hipoclorito de sodio + 5 min de inmersión; T2 = 25 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión; T3 = 25 % de hipoclorito de sodio + 15 min de inmersión ; T4 = 50 % de hipoclorito de sodio + 5 min de inmersión; T5 = 50 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión y, T6 = 50 % de hipoclorito de sodio + 15 min de inmersión; T7= 75 % de hipoclorito de sodio + 5 min de inmersión; T8 = 75 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión y, T9 = 75 % de hipoclorito de sodio + 15 min de inmersión.

Ensayo de desinfección e implantación *in vitro* de explantes provenientes de campo

El medio de cultivo para la implantación de los explantes recolectados en campo fue similar al medio de cultivo empleado en el ensayo para evaluar la desinfección *in vitro* de semillas. Adicionalmente se agregaron 1,5 gr/L de carbón activado, 150 mg/L de ácido cítrico y 100 mg/L de ácido ascórbico como agentes antioxidantes. La desinfección e inoculación *in vitro* de los explantes se realizó en la cámara de flujo laminar. Para la desinfección los explantes fueron colocados en hipoclorito de sodio. Se removió la solución de hipoclorito de sodio mediante tres enjuagues con una solución antioxidante estéril (ácido cítrico 150 mg/l y ácido ascórbico 100 mg/l). Los explantes permanecieron sumergidos en la solución antioxidante previo la inoculación. Seguido se inoculó un explante por cada tubo de ensayo que contenía el medio de cultivo; luego fueron colocados en el cuarto de incubación.

Se empleó un DCA con arreglo factorial. El primer factor fue el hipoclorito de sodio en tres niveles: 1) 15 %; 2) 20 % y 3) 25 %. El segundo factor fue el tiempo de inmersión en dos niveles: 1) 5 minutos de inmersión y 2) 10 minutos de inmersión. Se consideró un diseño 3 x 2 o seis tratamientos con tres repeticiones. Los tratamientos a evaluarse fueron los siguientes: T1= 15 % de hipoclorito de sodio + 5 min de inmersión; T2 = 15 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión; T3 = 20 % de hipoclorito de sodio + 5 min

de inmersión; T4 = 20 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión; T5 = 25 % de hipoclorito de sodio + 5 min de inmersión y, T6 = 25 % de hipoclorito de sodio + 10 min de inmersión.

Ensayo de germinación *in vitro* de semillas

La desinfección de semillas para el proceso de germinación se realizó con el mejor tratamiento obtenido en el ensayo de desinfección de semillas (T4 = 50 % hipoclorito de sodio + 5 min). Se utilizó la cámara de flujo laminar para inocular una semilla por cada tubo de ensayo, luego se colocaron los tubos de ensayo en el cuarto de incubación. Se evaluó los efectos del ensayo con un DCA con arreglo factorial 3 × 3 o nueve tratamientos con tres repeticiones. El primer factor fue la escarificación en tres niveles: 1) sin escarificación; 2) con escarificación física y 3) con escarificación mecánica. El segundo factor fue la cantidad de AG₃ en tres concentraciones: 1) 0 mg/l de AG₃; 2) 0,5 mg/l de AG₃ y 3) 1 mg/l de AG₃. Los tratamientos a evaluarse fueron los siguientes: T1 = Sin escarificación + 0 mg/l de AG₃; T2 = Escarificación físico + 0 mg/l de AG₃; T3 = Escarificación mecánica + 0 mg/l de AG₃; T4 = Sin escarificación + 0,5 mg/l de AG₃; T5 = Escarificación física + 0,5 mg/l de AG₃; T6 = Escarificación mecánica + 0,5 mg/l de AG₃; T7 = Sin escarificación + 1 mg/l de AG₃; T8 = Escarificación física+ 1 mg/l de AG₃ y T9 = Escarificación mecánica + 1 mg/l de AG₃.

Ensayos de multiplicación, brotamiento y enraizamiento *in vitro* de explantes (ápices caulinares y segmentos nodales)

Para evaluar las condiciones del ensayo se utilizó el DCA con arreglo factorial 3x2 o seis tratamientos con tres repeticiones. Estuvo conformado por tres factores: 1) BAP, 2) KIN y 3) 2-iP en dos concentraciones: 1 y 2 mg/l. Los tratamientos evaluados fueron: T1 = 1,0 mg/l de BAP; 2) T2 = 2,0 mg/l de BAP; 3) T3 = 1,0 mg/l de KIN; T4 = 2,0 mg/l de KIN; T5 = 1,0 mg/l de 2ip y T6= 2,0 mg/l de 2ip.

En el brotamiento *in vitro* de explantes se empleó un DCA con arreglo factorial 3 × 2 × 2 o 12 tratamientos con tres repeticiones. El primer factor fue el BAP en 1 mg/l mas sulfato de adenina en dos porciones: 1) 5 mg/l de S. Adenina y 2) 25 mg/l de S. Adenina y más agua de coco en dos niveles: 1) 0 % de agua de coco y 2) 20 % de agua de coco. El segundo factor fue el KIN en 1 mg/l más sulfato de adenina en dos porciones: 1) 5 mg/l de S. Adenina y 2) 25 mg/l de S. Adenina y más agua de coco en dos niveles: 1) 0 % de agua de coco y 2) 20 % de agua de coco. El último factor fue el 2-iP en 1 mg/l mas sulfato de adenina en dos porciones: 1) 5 mg/l de S. Adenina y 2) 25 mg/l de S. Adenina y más agua de coco en dos niveles: 1) 0 % de agua de coco y 2) 20 % de agua de coco.

Los tratamientos evaluados fueron: T1 = 1 mg/l de BAP + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco; T2 = 1 mg/l de BAP + 5 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco; T3 = 1 mg/l de BAP + 25 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco; T4 = 1 mg/l de BAP + 25 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco; T5 = 1 mg/l de KIN + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco; T6 = 1 mg/l de KIN + 5 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco; T7 = 1 mg/l de KIN + 25 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco; T8 = 1 mg/l de KIN + 25 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco; T9 = 1 mg/l de 2ip + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco; T10 = 1 mg/l de 2ip + 5 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco; T11 = 1 mg/l de 2ip + 25 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco y T12 = 1 mg/l de 2ip + 25 mg/l de S. adenina + 20 % de agua de coco.

Para la fase de enraizamiento *in vitro* de explantes, se utilizó un DCA en arreglo factorial 3×3 , o nueve tratamientos con tres repeticiones. Como primer factor tenemos ANA en tres concentraciones: 1) 0,5 mg/l; 2) 1,0 mg/l y 3) 1,5 mg/l. El segundo factor fue AIA en tres concentraciones: 1) 0,5 mg/l; 2) 1,0 mg/l y 3) 1,5 mg/l. El último factor se consideró AIB en tres concentraciones: 1) 0,5 mg/l; 2) 1,0 mg/l y 3) 1,5 mg/l. Los tratamientos evaluados fueron; T1 = 0,5 mg/l de ANA; T2 = 1,0 mg/l de ANA; T3 = 1,5 mg/l de ANA; T4 = 0,5 mg/l de AIA; T5 = 1,0 mg/l de AIA; T6 = 1,5 mg/l de AIA; T7 = 0,5 mg/l de AIB; T8 = 1,0 mg/l de AIB y, T9 = 1,5 mg/l de AIB. La inoculación *in vitro* de los explantes, se realizó en la cámara de flujo laminar, sembrando dos explantes por cada frasco y posteriormente se colocaron en el cuarto de incubación.

Condiciones ambientales de incubación

Los frascos de vidrio y tubos de ensayo inoculados se mantuvieron en incubación en el cuarto de luces a una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16-8 horas, luz-oscuridad.

Análisis estadístico de los datos: Se utilizó el programa Info Stat (Di Rienzo et al. 2009), en cual se realizó un análisis de varianza (ANAVA).- Se estableció diferencias significativas con el test de LSD Fisher a un nivel de significancia α de 0,05, en cada uno de los ensayos realizados.

RESULTADOS

Desinfección de semillas

La aparición de contaminación en las semillas se evidenció al cuarto día de evaluación a partir de la siembra en los tratamientos y se estabilizó al octavo día (Figura 2). Respecto

al porcentaje de contaminación se encontraron diferencias significativas ($p=0,0059$) entre tratamientos, 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 ($0 \pm 5,54$) (ver tabla 1).

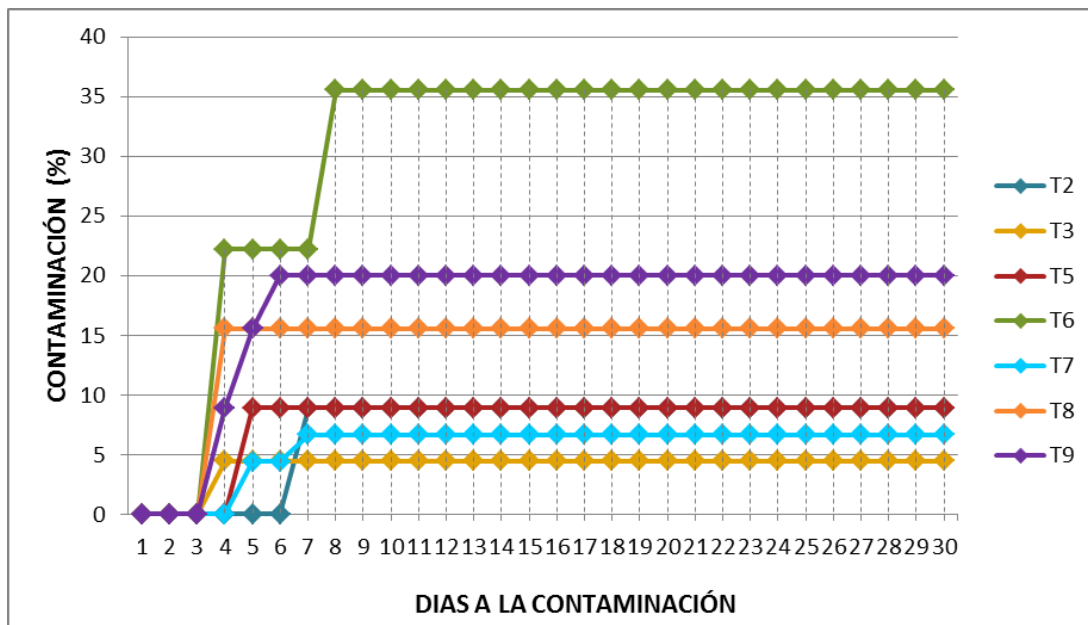


Figura 2. Representación gráfica del número de días a la contaminación de los diferentes tratamientos aplicados en la desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tabla 1. Promedios \pm error estándar de la variable evaluada en la desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tratamientos	% Contaminación
T1	$0 \pm 5,54^a$
T2	$8,89 \pm 5,54ab$
T3	$4,45 \pm 5,54ab$
T4	$0 \pm 5,54^a$
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

Desinfección e implantación *in vitro* de explantes

Los resultados obtenidos referentes al porcentaje de contaminación no mostraron diferencias significativas ($p=0,1452$) entre tratamientos. El porcentaje de oxidación fenólica registró diferencias significativas ($p=0,0010$) entre tratamientos. Sin embargo el porcentaje de sobrevivencia, tuvo pérdida del 100 % de los explantes durante la fase de implantación *in vitro*, debido a que no se logró combatir la contaminación y oxidación fenólica (Tabla 2).

Tabla 2. Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas en el ensayo de desinfección e implantación de explantes de campo de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tratamientos	% Contaminación	% Oxidación fenólica
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.

Germinación *in vitro* de semillas

La germinación se inició al cuarto día y se estabilizó en el día 16 (Figura 3). En cuanto a los porcentajes de germinación y mortalidad, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,2728$ y $p=0,9215$ respectivamente). El T7 (Sin escarificación + 1 mg/l AG₃) alcanzó el mayor valor de germinación con 77,78 % y una mortalidad de 13,33 %. Referente al porcentaje de contaminación, se encontraron diferencias significativas ($p<0,0001$) entre tratamientos, donde 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 contaminación nula (Tabla 3).

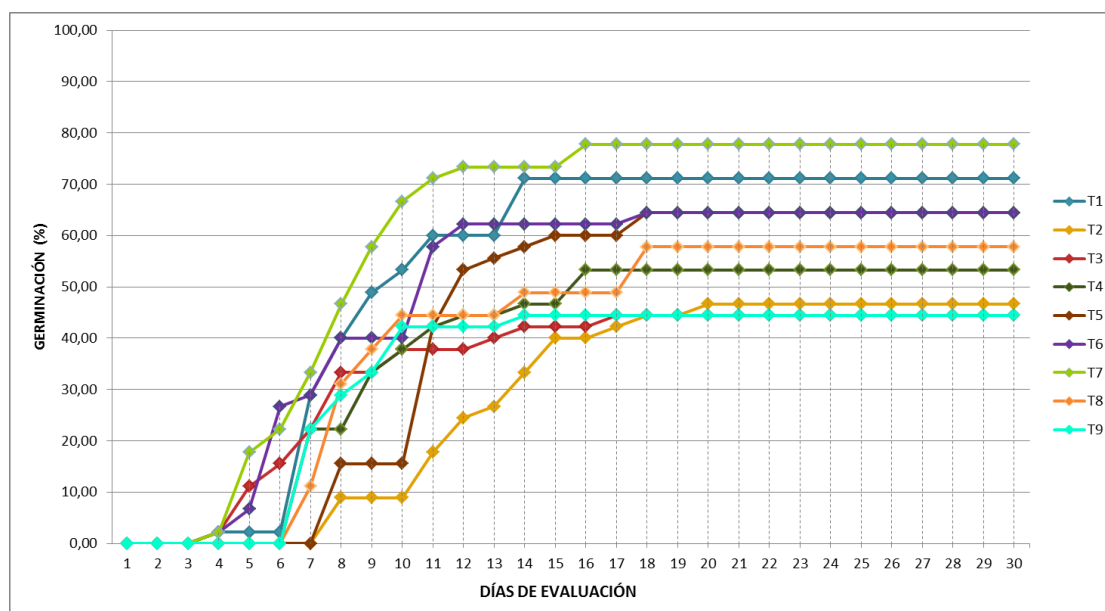


Figura 3. Curva de germinación acumulativa de los distintos tratamientos aplicados para la germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tabla 3. Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas en el ensayo de germinación *in vitro* de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tratamiento	% Germinación	% Mortalidad	% Contaminación
T1	71,11 \pm 10,29ab	22,22 \pm 5,49a	2,22 \pm 2,96 ^a
T2	46,67 \pm 10,29 ^a	17,78 \pm 5,49a	0 \pm 2,96 ^a
T3	44,44 \pm 10,29 ^a	15,56 \pm 5,49a	2,22 \pm 2,96 ^a
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 2,96 ^a
T6	64,44 \pm 10,29ab	17,78 \pm 5,49a	0 \pm 2,96 ^a
T7	77,78 \pm 10,29b	13,33 \pm 5,49a	2,22 \pm 2,96 ^a
T8	57,78 \pm 10,29ab	15,56 \pm 5,49a	13,33 \pm 2,96b
T9	44,44 \pm 10,29 ^a	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

Multiplicación *in vitro* de explantes

Los resultados referentes al porcentaje de contaminación y de mortalidad mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,0360$ y $p<0,0001$ respectivamente). En cuanto a las variables número de brotes/explante ($p=0,5660$), tamaño del brote (mm) ($p=0,5310$) y altura de las plántulas ($p=0,0620$) no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas entre tratamientos

para las variables: número hojas/explante ($p < 0,001$) y número de nudos/explante ($p = 0,006$) (Tabla 4).

El T5 (1 mg/l de 2ip) fue el mejor tratamiento, obteniendo el valor más bajo de mortalidad 13,33 %, la contaminación fue nula, se logró el mayor valor promedio de altura de las plántulas (5,21 cm), el mayor número de hojas formadas/explante (6,16). También se obtuvo el mayor número promedio de nudos/explante (5,40). Sin embargo, no se logró la formación de brotes en ninguno de los tratamientos aplicados.

Tabla 4. Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas a los tres meses en el ensayo de multiplicación *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tratamientos	% Cont	% Mort	N° brotes/expl	Tamaño del brote (mm)	Altura de la planta (cm)	N° hojas/expl	N° nudos/expl
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
	33,33 \pm 7,07c	66,67 \pm 5,61cd	0,00 \pm 0,06a	0,00 \pm 1,14a	3,36 \pm 0,38 ^a	3,78 \pm 0,56a	2,56 \pm 0,46a
T2	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
	23,33 \pm 7,07bc	20,00 \pm 5,61 ^a	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
T3	0,00 \pm 7,07^a	13,33 \pm 5,61^a	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
	0,00 \pm 7,07 ^a	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
T6							

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

Brotamiento *in vitro* de explantes

Los resultados del porcentaje de contaminación y de mortalidad no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0,5465$ y $p = 0,8552$ respectivamente). Así también las variables número de brotes/explante ($p = 0,4803$) y tamaño del brote (mm) ($p = 0,5401$), no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. En los diferentes tratamientos no se registró la formación de brotes. Sin embargo, 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 ($p=0,0021$) (Tabla 5).

El T9 (1 mg/L de Zip + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco) resultó ser el mejor tratamiento para promover la elongación del explante, pues obtuvo el valor promedio más alto de altura de las plántulas (5,31 cm) con (5,79) hojas/explante y (3,99) nudos/explante en promedio. La mortalidad fue del 50 % y la contaminación fue baja (6,67%), causada por hongos y bacterias.

Tabla 5. Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas a los tres meses en el ensayo de brotamiento *in vitro* de explantes de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl.

Tratamientos	% Cont	% Mort	N° brotes/e xpl	Tamaño del brote (mm)	Altura de la planta (cm)	N° hojas/ex pl	N° nudos/ex pl
T1	0 \pm 2,72a	56,67 \pm 8,22a	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 \pm 2,72a	53,33 \pm 8,22a	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 \pm 2,72a	46,67 \pm 8,22a	0,00 \pm 0,06a	0,00 \pm 0,62a	3,37 \pm 0,27 ^a	2,72 \pm 0,53 ^a	1,78 \pm 0,34 ^a
T4	0 \pm 2,72a	40,00 \pm 8,22a	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 \pm 2,72a	46,67 \pm 8,22a	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 \pm 2,72a	43,33 \pm 8,22a	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	6,67 \pm 2,72 ^a	36,67 \pm 8,22a	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 \pm 2,72a	40,00 \pm 8,22a	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	6,67 \pm 2,72^a	50,00 \pm 8,22a	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 \pm 2,72a	46,67 \pm 8,22a	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 \pm 2,72a	50,00 \pm 8,22a	0,12 \pm 0,06a	0,74 \pm 0,62a	3,86 \pm 0,27ab	4,39 \pm 0,53ab	3,04 \pm 0,34ab

		8,22a	0,06a	0,62a	0,27abc	0,53bc	0,34cde
T12	0 ± 2,72a	40,00 ±	0,14 ±	1,61 ±	3,59 ±	3,88 ±	2,90 ±
		8,22a	0,06a	0,62a	0,27ab	0,53ab	0,34bcd

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

Enraizamiento *in vitro* de explantes

Los resultados referentes al porcentaje de contaminación ($p=0,0008$) y número de raíces/explante ($p=0,0404$) si presentaron diferencias significativas entre tratamientos. En cuanto a 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) ($p=0,4285$) no se encontraron diferencias significativas (Tabla 6).

El T6 (1,5 mg/L de AIA) obtuvo los mejores resultados según el número de raíces formadas/explante (23,90) y altura de la plántula (4,34 cm). Mientras que, el T5 (1 mg/l de 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 de ANA) fue el tratamiento que obtuvo el valor más alto en número de nudos/explante (3,8). En cambio, el T7 (0,5 mg/l de 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 de 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 en número promedio de hojas/explante (3,92).

Tabla 6. Promedios \pm error estándar de las variables evaluadas en el ensayo de enraizamiento *in vitro* de explantes de *Loxopterigium huasango* Spruce ex Engel.

Trat	% Cont	% Mort	Altura de la planta (cm)	N° Hojas/exp l	N° Nudos/ex pl	N° raíces/e xpl	Longitud de raíces (cm)
T1	0 ± 4,71a	46,67 ±	3,82 ±	5,28 ±	3,8 ±	10,94 ±	1,94 ±
		5,83ab	0,26a	0,57a	0,44b	3,12a	0,44 ^a
T2	33,33 ±	36,67 ±	4,09 ±	4,19 ±	2,75 ±	12,39 ±	1,39 ±
	4,71c	5,83a	0,26a	0,57a	0,44ab	3,12a	0,44 ^a
T3	0 ± 4,71a	56,67 ±	3,83 ±	4,85 ±	3,27 ±	11,17 ±	1,75 ±
		5,83b	0,26a	0,57a	0,44ab	3,12a	0,44 ^a
T4	0 ± 4,71a	53,33 ±	3,77 ±	4,72 ±	3,57 ±	8,72 ±	2,16 ±

		5,83ab	0,26a	0,57a	0,44ab	3,12a	0,44 ^a
T5	0 ± 4,71a	43,33 ±	3,99 ±	5,35 ±	3,58 ±	14,3 ±	2,63 ±
		5,83ab	0,26a	0,57a	0,44ab	3,12a	0,44^a
T6	16,76 ±	43,33 ±	4,34 ±	4,99 ±	3,57 ±	23,90 ±	2,41 ±
	4,71b	5,83ab	0,26a	0,57a	0,44ab	3,12b	0,44 ^a
T7	0 ± 4,71a	53,33 ±	3,84 ±	4,03 ±	2,27 ±	5,87 ±	1,38 ±
		5,83ab	0,26a	0,57a	0,44a	3,12a	0,44 ^a
T8	0 ± 4,71a	43,33 ±	4,03 ±	3,92 ±	2,33 ±	8,97 ±	1,63 ±
		5,83ab	0,26a	0,57a	0,44a	3,12a	0,44 ^a
T9	0 ± 5,77a	50 ±	3,76 ±	4,39 ±	2,74 ±	10,9 ±	1,96 ±
		7,14ab	0,26a	0,57a	0,44ab	3,12a	0,44 ^a

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

DISCUSIÓN

Desinfección de semillas

Los tratamientos aplicados para la desinfección de las semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl, demostraron que las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión influyeron en la desinfección. Así con el T1 (25 % de hipoclorito de sodio, durante 5 min) y el T4 (50 % de hipoclorito de sodio, durante 5 min) la contaminación fue nula, lo cual es consistente 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. Un aspecto que afectó a la desinfección de las semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl es la existencia de bacterias endógenas, lo que fue confirmado por lo manifestado por Fuentes y Chuquillanque (2003) que 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 %,

Desinfección e implantación *in vitro* de explantes de campo

La contaminación por hongos y bacterias destruyó completamente el cultivo *in vitro* de explantes provenientes del 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 coincide con lo manifestado por Ramírez y Salazar (1997) y Digonzelli *et al.* (2001) quienes señalan 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. Así los explantes que son tomados de plantas cultivadas en el campo en climas tropicales son más difíciles y a veces imposibles de esterilizar.

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 utiliza material colectado directamente en el campo. Esto se evidenció en la presente investigación, mediante los niveles de fenolización de explantes de campo de *Loxopterygium huasango* que fueron mayores al 70 % en los seis tratamientos evaluados. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Méndez y Abdelnour (2014) quienes probaron la desinfección de explantes de *Terminalia amazonia* con hipoclorito de sodio al 3 % en 10 a 15 minutos y obtuvieron altos porcentajes de oxidación fenólica con 93,7 % y 84,2 % respectivamente.

Germinación *in vitro* de semillas

Las giberelinas constituyen una familia de compuestos químicos que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray y Estelle 1998). Con respecto a la germinación de semillas de *Loxopterygium huasango*, se obtuvo que el T7 (Sin escarificación + 1 mg/l de AG₃) alcanzó el porcentaje de germinación más alto con 77,78 %. Este valor fue similar al obtenido por Díaz (2012) quien alcanzó el 72 % de germinación en *Cedrela montana*, utilizando 2 mg/L de 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 podría aumentar la tasa de germinación, reducir el tiempo y homogenizar la germinación.

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 de 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*.

Multiplicación *in vitro* de explantes

El empleo de material vegetal aséptico proveniente de vitroplantas, permite disminuir la presencia de agentes contaminantes en el cultivo *in vitro* 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 de técnicas que permitan la detección de patógenos sistémicos y su desinfección superficial (Suarez, I.E, 2006).

En la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de *Loxopterigium huasango*, el T5 (1 mg/L de 2ip) permitió obtener la mayor altura promedio de las plántulas, con 5,21 cm, 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%. Los resultados respecto a la no formación de brotes/explante difieren a los obtenidos por Montes (2007) quien al probar 1,5 mg de BAP junto con 0,5 mg/L de 2ip en la multiplicación de *Switenia humilis*, obtuvo la formación de brotes en un promedio de 2,3 brotes por explante. También obtuvo hojas de color verde intenso bien formadas y con una altura del brote de 2,1 cm.

Debido a que no se logró la formación de brotes en los tratamientos ensayados sería conveniente probar 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. También se justifica por lo reportado por Orellana (1998) quien señala que la citocinina BA es la más efectiva y empleada para la inducción de brotes.

Brotamiento *in vitro* de explantes

Se afirma que durante esta fase de brotamiento se espera que los explantes originen brotes axilares con varios nudos y hojas Castillo (2004). De acuerdo a los resultados de la presente investigación no se tuvo respuesta favorable en la formación de brotes/explante, en los 12 tratamientos ensayados. No obstante, en el T9 (1 mg/L de 2ip + 5 mg/l de S. adenina + 0 % de agua de coco) se alcanzó los mejores resultados en altura de las plántulas con 5,31 cm, un promedio de seis hojas formadas y cuatro nudos. Además, se evidenció la formación de raíces con un promedio de 5,25 raíces/explante, de 1,36 cm de longitud. Estos resultados obtenidos son inferiores a los reportados por Minchala *et al.*, (2014) en el brotamiento *in vitro* de *Handroanthus 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. Esta comparación se fundamenta ya que estas dos especies forestales comparten el mismo hábitat en condiciones de campo y su desarrollo a nivel *in vitro* es también similar.

Los 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 donde se reporta un promedio de tres brotes por explante. También, difieren a los obtenidos por Castillo *et al.*, (2011) en *Cedrela odorata* en los cuales se 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 debido a que dependen del contenido endógeno de citocinina y del tipo de explante utilizado en cada especie.

Enraizamiento *in vitro* de explantes

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.

Los resultados de la investigación evidencian que el T6 (1,5 mg/l de AIA) permitió la formación del mayor número de raíces/explante con 23,90, con promedios tanto en longitud de 2,41 cm y altura de las plántulas de 4,34 cm. Estos valores alcanzados son superiores a los reportados por Castillo *et al.* (2011) en *Cedrela odorata* los que 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* quien con el uso 1 mg/L de AIB obtuvo un promedio de 2,4 raíces/explante de 3,05 cm de longitud. Pérez (1998), señala que es importante obtener un mayor número de raíces, aún de poca longitud, ya que las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* requieren de un buen sistema radicular (mayor número de raíces), para tener éxito en la fase de trasplante y adaptación a condiciones de invernadero.

CONCLUSIONES

- La utilización de 50 % de hipoclorito de sodio durante cinco minutos para la desinfección de semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl, permitió controlar la contaminación. 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.
- Los métodos de escarificación no incidieron en la germinación *in vitro* de las semillas de *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl. El mayor porcentaje de germinación (77,78 %) se obtuvo en el tratamiento sin escarificación + 1 mg/l de AG₃.
- Para la fase de multiplicación *in vitro* de los explantes, la adición de 1 mg/L de 2-iP al medio de cultivo MS, permitió obtener el mejor crecimiento en altura de las plántulas con 5,21 cm, con seis hojas formadas y cinco nudos/explante en promedio.
- En la fase de brotamiento *in vitro* de los explantes, los tratamientos ensayados no permitieron la inducción de brotes, sin embargo, mediante la adición de 1 mg/L de 2-iP, suplementado con 5 mg/L de sulfato de adenina al medio de cultivo MS, se obtuvo los mejores resultados promedios, en altura de las plántulas con 5,31 cm, seis hojas y cuatro nudos formados/explante.
- Para la fase de enraizamiento *in vitro* de los explantes, 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.

AGRADECIMIENTOS

A las Autoridades de la Universidad Nacional de Loja, y al Equipo Técnico del Proyecto de Investigación "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", por el apoyo financiero y técnico brindado para la ejecución de la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, Z., Delgado, T. (2005). Vegetación de los bosques secos de Cerro Negro-Cazaderos, Occidente de la provincia de Loja. En: Vázquez, M., Freile, J.F., Suárez, L. (eds). Biodiversidad en los Bosques secos de la zona de Cerro Negro-Cazaderos, suroccidente de la provincia de Loja: Un reporte de las evaluaciones ecológicas y

socioeconómicas rápidas, pp. 9-24 Eco-Ciencia, MAE y Proyecto Bosque Seco. Quito, Ecuador

Aguirre, Z., & Kvist, L. P. (2006). Composición florística y estado de conservación de los bosques secos del sur-occidente del Ecuador. *Lyonia*, 8, 41-67.

Álvarez, D. M., & Esquivel, A. A. (2014). Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 11(27), 7-21

Azofeifa, J. B., Rojas-Vargas, A., & Hine-Gómez, A. (2009). Optimización del proceso de enraizamiento y aclimatización de vitroplantas de *Swietenia macrophylla* King (Orden: Meliaceae). *Revista Tecnología en Marcha*, 22(3), 34.

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay*.

Castillo, M., Machida, H., Cortés, C., & García, F. (2011). Multiplicación y conservación *in vitro* de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) a partir de meristemos. *VI Reunión Nacional de Innovación Forestal*, (pág. 9). León, Guanajuato.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2009). InfoStat versión 2011. (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, Argentina).

Digonzelli, P., Díaz, L., Bellones, S. C., Latife, J., & Sosa, S. (2001). Diferentes dosis de PPM para contriolar la contaminación bacteriana y sus efectos sobre el crecimiento *in vitro* de caña de azúcar en la etapa de multiplicaión. *In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL*.

Fuentes, S., & Chuquillanqui, C. (2004). Las enfermedades causadas por virus y su control. *El cultivo de ulluco en la sierra central del Perú. Serie: conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: una década de investigación para el desarrollo (1993–2003)*, (3). Centro Internacional de la Papa, Universidad Nacional del Centro, Instituto Viada en los Andes, Universidad Nacional Agraria La Molina, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima.

George, E. F. (1996). *Plant propagation by tissue culture. Part 2: the technology* (No. Ed. 2). Exegetics limited. England.

Gray, W. M., & Estelle, M. (1998). Biochemical genetics of plant growth. *Current opinion in biotechnology*, 9(2), 196-201.

Hernández, Y., & González, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*. 31(4), 15-23

Hocqueghem, A. (1998). Una historia del bosque seco. Memorias del Seminario Internacional Bosque Seco y Desertificación. A. Cuba Salerno (ed.). Lambayeque, pp. 231-254.

Quichimbo, D. (2012). Procesos morfogénicos *in vitro* de cedro (*Cedrela montana* Moritz ex Turcz) inducidos a partir de semillas para la propagación y conservación de germoplasma (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Loja, Ecuador.

Leifert, C., & Cassells, A. C. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(2), 133-138.

López, E. C. (1996). A propósito de semillas. 33. (Dialnet, Ed.) España: Encuentros en la Biología.

Mendoza, Z. A., Linares-Palomino, R., & Kvist, L. P. (2006). Especies leñosas y formaciones vegetales en los bosques estacionalmente secos de Ecuador y Perú. *Arnaldoa*, 13(2), 324-350.

Montes, A. 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. *Centro América 2da publicación junio-septiembre*.

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. 151-178.

Paladines, R. (2003). Propuesta de conservación del Bosque seco en el Sur de Ecuador. *Lyonia*, 4(2), 183-186.

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*. *Revista Biotecnológica*, 3 (1), 6-14.

Pérez, J., Mesén, F., Hilje, L., & Aguilar, M. E. (2002). Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Optimización de la fase de multiplicación. *Recursos Naturales y Ambiente*, (38), 67-71.

Ramírez, M., & Salazar, E. (1997). Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, (14): 497-506.

Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología*.

Suárez, I. E., Jarma, A. J., & Avila, M. (2006). Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). *Temas Agrarios*, vol. 11, pp. 52-62.

Tang, W., & Newton, R. J. (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science*, 167(3), 621-628.

Vázquez, M. A., Freire, J. F., & Suárez, L. (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*.

Zurita-Valencia, W., Gómez-Cruz, J. E., Atrián-Mendoza, E., Hernández-García, A., Granados-García, M. E., García-Magaña, J. J.,... & Sánchez-Vargas, N. M. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* schlecht.)(Tiliaceae). *Polibotánica* (38), 129-144.