



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

Proyecto de investigación
previo a la obtención del
título de Ingeniero
Forestal.

TEMA:

GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Cordia alliodora* (R. y P.) Oken (laurel blanco)
EN SUSTRATOS CONVENCIONALES Y BAJO CONDICIONES *IN VITRO*

AUTOR:

TORRES CRUZ JOFFRE FRANCISCO

DIRECTOR:

ING. MORANTE CARRIEL JAIME, PhD.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2020

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PhD. Ing. For. Morante Carriel Jaime, en calidad de Director de Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Forestal.

CERTIFICA

Que el estudiante Torres Cruz Joffre Francisco autor de tesis titulada: GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Cordia alliodora* (Ruiz Et Pavon) *Oken* (laurel blanco) EN SUSTRATOS CONVENCIONALES Y BAJO CONDICIONES *IN VITRO* ha sido revisado en todo sus componentes por lo que se autoriza su presentación entre el tribunal respectivo.

PhD. Ing. For. Morante Carriel Jaime
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS


Yo, **TORRES CRUZ JOFFRE FRANCISCO** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.

Torres Cruz Joffre Francisco

Certificación del Urkund emitida por el Director

El suscrito, **Jaime Morante Carriel**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el Proyecto de Investigación del aspirante a Ingeniero Forestal Joffre Francisco Torres Cruz titulado “GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Cordia alliodora* (Ruiz Et Pavon) *Oken* (laurel blanco) EN SUSTRATOS CONVENCIONALES Y BAJO CONDICIONES *IN VITRO*”, fue analizado por el sistema URKUND, y presentó el 4% de similitud; este porcentaje está considerado dentro de los límites permitidos por el Reglamento e Instructivos de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.



Urkund Analysis Result

Analysed Document: Tesis Joffre-Torres (1) Urkund.docx (D63392052)
Submitted: 2/3/2020 10:47:00 PM
Submitted By: \${Xml.Encode(Model.Document.Submitter.Email)}
Significance: 4 %

Sources included in the report:

TT UTE B 2017 Tigrero Vaca Joel.pdf (D35239302)
https://www.researchgate.net/publication/317442251_Rompimiento_de_la_dormancia_en_semillas_y_propagacion_in_vitro_de_Cordia_elaeagnoides_A_DC
<https://docplayer.es/108689990-Tesis-de-grado-ingeniero-forestal.html>
<https://worldwidescience.org/topicpages/l/laurel+cordia+alliodora.html>
<https://www.uv.mx/personal/sdelamo/files/2012/11/Germinacion-y-manejo-de-especies.pdf>

Instances where selected sources appear:

7

PhD Ing. For. Morante Carriel Jaime

DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

**Tribunal de Tesis
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de
Ingeniero Forestal.

APROBADO POR:

Ph.D. José Nieto Rodriguez

**PRESIDENTE DEL
TRIBUNAL**

M.Sc.Ing. Fernando Cabezas

**INTEGRANTE DEL
TRIBUNAL**

M.Sc.Ing. Fabricio Meza

**INTEGRANTE DEL
TRIBUNAL**

Quevedo-Los Ríos-Ecuador

2020

DEDICATORIA

A Dios que supo darme lo que necesité en esta etapa de mi vida, a mi madre por apoyarme y brindarme el tesoro que llevo conmigo mi educación y buenas valores.

A ustedes mi pequeña gran familia que anhele con todo el corazón los llevare siempre conmigo.

C y S

AGRADECIMIENTO

El autor de la presente investigación quiere dejar constancia de su sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la culminación de la misma.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución digna que me acogió como estudiante, forjo mis conocimientos y habilidades.

A los docentes, que me ayudaron con sus enseñanzas, permitiéndome mejorar cada vez más como estudiante.

Le agradezco a mi Director de tesis, Dr. Morante Carriel Jaime, por su enseñanza, apoyo y motivación para lograr la culminación exitosa de este trabajo de investigación.

A mi amigo y compañero Msc. Petter Vera Maldonado por todo el apoyo brindado desde el inicio de esta carrera.

A todos los que conforman parte del laboratorio de la U.T.E.Q. que con su colaboración y enseñanza permitieron que este trabajo sea posible.

RESUMEN

El *Cordia alliodora* más conocido como laurel, es uno de los árboles más utilizados tanto para uso medicinal como maderable como escultura, partes de herramientas y en ebanistería en el país. Una de las limitantes para la reproducción de esta especie, es el tiempo de germinación de la semilla, desarrollarse y en crecer. De esta manera surge esta investigación con el objetivo principal de determinar el efecto de diferentes sustratos convencionales sobre la germinación y desarrollo de plántulas de laurel blanco. Para comprobar si tiene influencia en la planta. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de germinación, donde el T3 (20.5%) y T4 (22%) mostraron mayor diferencia. La altura de plántulas evidencia una diferencia superior en el T3 (arena + tierra) y T4 (tierra + tierra negra), con promedios de (25.4 cm) y (25.86 cm). En el número de hojas el T3 (arena + tierra) y T4 (tierra + tierra negra), tuvieron una mejor respuesta positiva con promedios de (8.8) y (9.4). Los tratamientos que evidenciaron mayor grosor fueron T3 (arena + tierra) y T4 (tierra + tierra negra) con medias superiores de 6.18 y 7.02 en referencia a los demás. En el peso foliar el T2 (arena+ tierra + turba) fue estadísticamente superior a los otros tratamientos con una media de 7.54g. Dentro de los objetivos secundarios tenemos la propagación *in vitro* de plantas de laurel, de esta manera se puede acelerar el crecimiento de la planta aumentando la tasa de producción. No se obtuvo resultados, por el motivo que el medio de cultivo (Murashige & Skoog) con las semillas se contaminaba. Se realizó una identificación molecular, por medio de la técnica PCR para comprobar la presencia de genes ABA y ABS resistentes a la sequía en las plantas de laurel, en los tratamientos donde se presentan estos genes fueron los T4 (tierra + tierra negra), T2 (arena + tierra+ tierra negra) y en el T1 (arena + tierra negra).

Palabras clave: PCR, *in vitro*.

ABSTRACT

The *Cordia alliodora* better known as laurel, is one of the most used trees for both medicinal use and timber uses such as sculpture, parts of tools and woodworking in the country. One of the limitations for the reproduction of this species is the time it takes to germinate, develop and grow. In this way, this research arises with the main objective of determining the effect of different conventional substrates on the germination and development of white laurel seedlings. To check if it has influence on the plant. The variables they used were the germination percentage, where T3 (20.5%) and T4 (22%) showed a greater difference. The height of seedlings shows a greater difference in the T3 (sand + earth) and T4 (earth + black earth), with averages of (25.4 cm) and (25.86 cm). In the number of leaves, T3 (sand + earth) and T4 (earth + black earth) had a better positive response with averages of (8.8) and (9.4). The treatments that were evidenced with greater thickness were T3 (sand + earth) and T4 (earth + black earth) with superior averages of 6.18 and 7.02 in reference the others. In the foliar weight the T2 (sand + earth + peat) was statistically superior to the other treatments with an average of 7.54g. Within the secondary objectives we have *in vitro* propagation of laurel plants, this way you can accelerate plant growth by increasing the production rate. No results were obtained, for the reason that the culture medium (Murashige & Skoog) with the seeds was contaminated. A molecular identification was carried out, using the PCR technique to check the presence of drought-resistant ABA and ABS genes in laurel plants, in the treatments where these genes are presented were T4 (soil + black earth), T2 (sand + earth + black earth) and in T1 (sand + black earth).

Keywords: PCR, *in vitro*.

ÍNDICE

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACION DEL URKUND EMITIDA POR EL DIRECTOR.....	v
TRIBUNAL DE TESIS	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	xiv
CAPITULO I.....	15
1.1. Problematización de la investigación.....	1
3. 2. 1 Diagnòstico.....	1
3. 2. 2 Pronòstico.....	1
3. 2. 3 Formulaciòn del problema.....	1
3. 2. 4 Sistematizaciòn.....	1
1.2. Objetivos.....	2
1. 2. 1 Objetivo general.....	2
1. 2. 2 Objetivos específicos.....	2
1.3. Justificaciòn.....	3
CAPITULO II.....	1
2. 1 Marco teòrico.....	5
2.1.1 Fundamentaciòn conceptual.....	5
2.1.2 Laurel (<i>Cordia alliodora</i>).....	5
2.1.3 Taxonomía y descripciòn.....	5
2.1.4 Morfología	6
2.1.5 Crecimiento del <i>Cordia alliodora</i> (laurel).....	6
2.1.6 Utilidad	7

2.1.7	Distribución geográfica	7
2.1.8	<i>Cordia alliodora</i> en el Ecuador	8
2.1.9	Hábitat	8
2.1.10	Clima	9
2.1.11	Requerimientos edáficos.....	9
2.1.12	Factores limitantes de crecimiento	9
2.1.13	Recolección de semillas.....	9
2.1.14	Secado y almacenamiento de semillas.....	10
2.1.15	Dióxido de carbono	10
2.1.16	Importancia de propagación in vitro.....	11
2.1.17	Fitohormonas	11
2.1.18	Ácido Abscísico (ABA).....	12
2.1.19	Amplificación génica.....	12
2.2	Marco referencial.....	13
2.2.1	Viabilidad y germinación de semillas de tres especies arbóreas nativas de la selva tropical, chiapas, México.....	13
2.2.2	Inducción y enraizamiento de brotes epicórmicos de <i>Cordia alliodora</i> (Ruiz Et Pavon), Oken.....	13
2.2.3	Rompimiento de la dormancia en semillas y propagación in vitro de <i>Cordia elaeagnoides</i>	14
2.2.4	Germinación y crecimiento de <i>Ochroma pyramidale</i> (Cav. ex Lam.) Urb. en Ecuador	14
2.2.5	Evaluación de la variabilidad genética y dasométrica de nueve procedencias de <i>Cordia alliodora</i> (Ruiz Et Pavon) Oken (laurel) en la estación experimental central de la amazonia (eeca), parroquia san carlos, cantón la joya de los sachas, provincia de Orellana.	15
CAPITULO III		5
METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN		5
3.1	Método	17

3.1.1.	Tipo de investigación.....	17
3.1.2.	Localización del experimento.....	17
3.1.3.	Materiales	17
3. 1. 4	Sustratos a evaluar	17
3. 1. 5	Tratamientos	18
3. 2	Diseño de investigación	18
3. 2. 1	Diseño para la determinación del porcentaje de germinación de semillas de <i>Cordia alliodora</i>	18
3. 2. 2	Diseño para la determinación de los efectos en el crecimiento de plántulas de <i>Cordia alliodora</i>	19
3. 2. 3	Determinación de crecimiento de <i>Cordia alliodora</i>	19
3. 2. 4	Identificación molecular de ABA y ABS mediante primers específicos .	20
3. 3	Datos a registrar	22
CAPITULO IV		16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		16
4. 1	RESULTADOS.....	24
4. 1. 1	Determinación del porcentaje de germinación de semillas de <i>Cordia alliodora</i>	24
4. 1. 2	Evaluación del desarrollo de semillas de <i>Cordia alliodora</i> en diferentes sustratos convencionales.....	24
4. 1. 3	Determinación molecular de la presencia de genes ABA y ABS.....	28
4. 2	DISCUSIÓN	31
CAPITULO V.....		22
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		22
5.1.	CONCLUSIONES	32
5.2.	RECOMENDACIONES.....	33
CAPITULO VI.....		29
BIBLIOGRAFÍA		29

6.1 Bibliografía	35
CAPITULO VII.....	32
ANEXOS	32
7.1. ANEXOS	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Esquema del Análisis de Varianza	18
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis con presencia de ADN en plántulas de laurel (<i>Cordia alliodora</i>) en los diferentes sustratos convencionales. T+TN (tierra+ tierra negra); AR+T (arena+ tierra); AR+T+Tu (arena+ tierra+ turba); AR+Tu (arena + turba); T (tierra convencional).....	28
Figura 2. Identificación Molecular de <i>Cordia alliodora</i> mediante PCR con presencia del gen ABA Y ABS. M (Ladder de peso molecular de 100pb); T+TN (tierra+ tierra negra); AR+T (arena+ tierra); AR+T+Tu (arena+ tierra+ turba); AR+Tu (arena + turba); T (tierra convencional).....	29
Figura 3. Identificación Molecular de <i>Cordia alliodora</i> mediante PCR con presencia del gen ABA Y ABS. M (Ladder de peso molecular de 100pb); T+TN (tierra+ tierra negra); AR+T (arena+ tierra); AR+T+Tu (arena+ tierra+ turba); AR+Tu (arena + turba); T (tierra convencional).....	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 2. Germinación de semillas de laurel (<i>Cordia alliodora</i>).	40
Anexo 1. Ubicación del terreno para la prueba de germinación	40
Anexo 4. Aplicación de semillas.	40
Anexo 3. Preparación de sustratos convencionales.	40
Anexo 6. Distribución de plantas de laurel para los tratamientos.	41
Anexo 5. Plantas de laurel.	41
Anexo 7. Recolección de muestra de laurel (<i>Cordia alliodora</i>).....	41

INTRODUCCION

Las especies forestales tienen muchos beneficios para el hombre y el ambiente, por ejemplo, la fijación del anhídrido carbónico y producción de oxígeno en el proceso fotosintético de las plantas, agua limpia, conservación de suelo, hábitat y fuente de alimento para el hombre y la fauna silvestre, ecoturismo, cortinas rompe vientos entre otras (AgroMeat, 2009).

El laurel blanco, laurel cafetero, araña caspio, laurel macho (*Cordia alliodora*) es una especie forestal que debido a su alta calidad, a la dureza de su madera y a su rápido crecimiento, en la ebanistería y la agroforestería tiene una demanda creciente. Además es una especie apta para plantaciones forestales de escala industrial, ya que su madera posee varias características para el trabajo como en su belleza y brillo teniendo una demanda sostenida con altas posibilidades de incrementarse. (Ecuador forestal, 2010). No obstante por esas mismas características y buenas cualidades ha traído consigo la tala ilegal de esta especie teniendo como resultado que en los últimos años se ha reducido considerablemente la población de la misma preocupando en gran manera a las autoridades e investigadores por la regeneración de esta especie (Murillo, 2015).

En sistemas agroforestales, los árboles de laurel constituyen una fuente de ingreso adicional a los cultivos y podrían considerarse como una caja de ahorros para cualquier emergencia de gastos (Ecuador forestal, 2010). No obstante, el desconocimiento de diversos aspectos biológicos, fisiológicos y ecológicos, entre los que destacan los procedimientos adecuados para la colecta, procesamiento y almacenaje de las semillas, así como los requerimientos para su germinación son parámetros limitantes a considerar para mejorar el establecimiento de *Cordia alliodora* (Orantes et al., 2013).

En la presente investigación se pretende evaluar la respuesta de diferentes sustratos convencionales y condiciones *in vitro* sobre la germinación y desarrollo de plántulas de laurel blanco. Posteriormente, se analizará la presencia/ausencia de genes relacionados con el estrés hídrico.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problematización de la investigación.

3. 2. 1 Diagnóstico.

El desconocimiento acerca de los parametros ambientales óptimos (temperatura y humedad relativa) que influyen en la germinación y desarrollo de las semillas de laurel blanco es un problema común actualmente entre las personas que utilizan esta especie en explotaciones forestales.

3. 2. 2 Pronóstico.

La falta de información relacionada a aspectos biológicos, fisiológicos y ecológicos, entre los que destacan los procedimientos adecuados para la colecta, procesamiento y almacenaje de las semillas, requerimientos para su germinación además de sustratos con potencial para inducir a plantulas con un desarrollo precoz y de mayor vigor.

3. 2. 3 Formulación del problema.

¿Qué tipo de sustrato y que condiciones de humedad y temperatura deberian utilizarse para optimizar el desarrollo de plantas de Laurel blanco?.

3. 2. 4 Sistematización.

¿De qué manera los sustratos convencionales e *in vitro* favorecen la homogeneidad de la germinación y desarrollo de las plantulas?.

¿ En cual de los tratamientos evaluados se evidenciará la presencia/ausencia de los genes ABA y ABS?

1.2. Objetivos

1. 2. 1 Objetivo general.

Determinar el efecto de diferentes sustratos convencionales e *in vitro* sobre la germinación y desarrollo de plántulas de laurel blanco.

1. 2. 2 Objetivos específicos.

- ✓ Evaluar los efectos inducidos por los diferentes sustratos convencionales sobre la germinación de las semillas de laurel blanco.
- ✓ Evaluar la respuesta bajo condiciones experimentales *in vitro* sobre la germinación de las semillas de laurel blanco.
- ✓ Identificar mediante oligonucleótidos específicos la presencia/ausencia de los genes ABA y ABS para cada uno de los tratamientos evaluados.

1.3. Justificación.

El laurel blanco es una especie que frecuentemente sirve como sombra en cafetales y pastizales. La madera es fácil de trabajar, el duramen es de color oscuro; es un favorito de los ebanistas para la carpintería fina, además contribuye a un mejor aprovechamiento de la energía solar en el cultivo, reduce las temperaturas altas o extremas en la planta, reduce los daños causados por el viento y la evaporación del agua del suelo, favorece el desarrollo de árboles asociados con cultivos, aumenta la resistencia del suelo a la erosión entre otros beneficios, sin embargo una de las principales limitantes para la producción de esta especie, ya que resulta difícil recoger y almacenar la semilla satisfactoriamente debido a que esta pierde viabilidad rápidamente. La presente investigación busca optimizar los procesos de siembra mediante la determinación de sustratos y temperaturas adecuadas para aprovechar al máximo la viabilidad de la misma además determinar el que influya en su más rápido desarrollo. Una de las formas en que las semillas puedan sobrevivir a ambientes perjudiciales para mejorar la tasa de germinación, es la presencia de ABA, inhiben el desarrollo e inducen la formación de proteínas que ayuden a la tolerancia de agua. De esta manera podemos aumentar la producción de laurel y satisfacer las demandas del público.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2. 1 Marco teórico.

2.1.1 Fundamentacion conceptual.

2.1.2 Laurel (*Cordia alliodora*).

Cordia alliodora (Ruiz Et Pavon) Oken cumple con las condiciones necesarias para convertirse en una de las más importantes especies maderables para las zonas bajas tropicales del Centro y Sur América. La especie tiene una distribución ecológica muy amplia, crece muy rápido en varios tipos de suelos y produce una madera muy apreciada. Además, se puede utilizar tanto en plantaciones homogéneas como en sistemas agroforestales y silvopastoriles; presenta todavía pocos problemas con plagas y enfermedades (Poel, 1988).

2.1.3 Taxonomía y descripción

Reino:	Plantae
Subphyllum:	Spermatophyta
Clase:	Magnoliophytina
Orden:	Asteridas
Familia:	Polemoniales
Subfamilia:	Borraginaceas
Género:	<i>Cordia</i>
Especie:	<i>Cordia alliodora</i> (Ruiz Et Pavon) Oken

El laurel, conocido botánicamente como *Cordia alliodora*, fue descrito primero por Ruiz y Pavon y posteriormente revisado por Chamisso. Como sinónimo aparece *Cordia gerascanthus* de Jacquin (Miller, 2013).

El género *Cordia* es el más importante del grupo Boraginaceae e incluye más de 200 especies de árboles grandes y pequeños y de arbustos son espinas, ampliamente distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales del nuevo mundo. Todos los árboles grandes producen maderas utilizables (Carvalho, 2007).

Árbol de hasta 35 m de altura, con fuste cilíndrico blanco grisáceo a parduzco; las hojas son simples alternas, ovadas a lanceolado-elípticas de 8 a 18 cm de largo y de 3 a 8 cm de ancho, ápice acuminado, ásperas en el haz y con tricomas estrellados. Las flores son de 8 a 12 de mm de largo y de 2 a 2,5 mm de grosor, de color blanco y crecen en racimos

vistosos; el fruto parece una flor seca, con no más de un centímetro de longitud en cuyo interior lleva una semilla parecida en color y tamaño a un grano de arroz (CATIE, 1994).

2.1.4 Morfología

Las hojas.- son simples, alternas, de 5 a 18 cm de largo y 4,5 a 9 cm de ancho. Están dispuestas en espiral, son elípticas u oblongas, verde oscuras, tienen borde entero, con pelos diminutos en forma de estrella por el envés. Antes de caer, sus hojas se tornan amarillas y una vez en el suelo se tornan oscuras casi negras.

Las flores.- son blancas, pequeñas, de forma tubular, de 1,2 a 1,5 cm de ancho y largo. Están dispuestas en panículas axilares o terminales de 10 a 30 cm de largo. El cáliz es verde - grisáceo, hasta de 6 mm de largo, con 10 líneas sobresalientes, densamente cubierto con pelos estrellados diminutos. La corola tiene 5 pétalos blancos, ampliamente extendidos, y en ella sobresalen 5 estambres blancos, erectos. Las flores son muy aromáticas.

Los frutos.- son aquenios elipsoidales, con el pericarpio coriáceo y fibroso, de color café claro, de 0,6 a 0,8 cm de largo y 1 cm de ancho, epicarpio liso, marrón rojizo al madurar, con el cáliz y la corola de color castaño o marrón, que permanecen adheridos y sirven de alas para su dispersión.

Las semillas.- son pequeñas, ovoides de un centímetro de largo por 5 mm de ancho, el embrión es de color crema. Cada árbol en su madurez puede producir entre 1,5 y 3,5 kg de semilla.

La madera.- tiene una densidad básica de 0,39 g/ cm³ y propiedades físico-mecánicas medias a altas. Es blanda y se considera de muy buena calidad, fácil de trabajar y de pulir, con albura de color amarillento a café- pálido y duramen (corazón) de color marrón con rayas oscuras (Ospina et al., 2010).

2.1.5 Crecimiento del *Cordia alliodora* (laurel)

Es un árbol maderero bien conocido en toda la zona donde crece naturalmente. Su fama ha justificado la realización de ensayos en pequeña escala acerca de sus posibilidades de crecimiento y las propiedades de su madera. En su medio natural, el *C. alliodora* un buen colonizador que se regenera fácilmente y se presenta en arboledas casi puras en rodales

naturales del bosque o zonas taladas por el hombre. Los árboles adultos pueden alcanzar más de 30 m de altura y 1 m de diámetro con un tronco erguido y cilíndrico y copa pequeña y compacta. Se consideran resistentes al viento y no se les conocen plagas importantes.

- Condiciones aproximadas de ubicación: altura 50 m sobre el nivel del mar; precipitación 5000 mm anuales.
- Condiciones aproximadas de ubicación: altura 650 m sobre el nivel del mar; precipitación 2700 mm anuales (Murphy y Lugo, 1986).

2.1.6 Utilidad

En usos maderables es utilizado en esculturas, artículos torneados, construcciones exteriores e interiores, mangos para herramientas, carpintería en forma de barrotes, reglas y tablas, muebles finos, pisos, puertas, juguetes, lambrín, carrocerías, puentes, artículos de escritorio, durmientes, artículos deportivos, postes, ebanistería, remos, embarcaciones, aros para barriles, gabinetes, parquet, juguetes, rodapié, contrachapados, chapas decorativas, instrumentos musicales o parte de éstos.

En usos no maderables es utilizado para curar: heridas, hidropesía, granos, quemaduras, salpullido, reumatismo, antieaspasmódico, emético y diurético (Corteza). Enfermedades intestinales, antiinflamatorio de postemas y tumores, dolor de muelas (Tallo); Las hojas contienen alcanfor. La flor en cocción es emoliente. Es forrajera, la pasta residual que queda después de extraer el aceite a las semillas, se utiliza como alimento para el ganado. La fibra algodonosa que rodea las semillas se utiliza en la industria como aislante térmico y acústico en cámaras frigoríficas y aviones. Es una especie clasificada como planta melífera, también es utilizada en sistemas agroforestales por la sombra. Los Frutos son comestibles, decocciones de las hojas como tónicas y estimulantes, especialmente en el caso de catarras y pulmones afectados, y ungüentos fabricados de semillas pulverizadas para curar enfermedades cutáneas (ITTO, 2020).

2.1.7 Distribución geográfica

La especie *Cordia alliodora* es la más extendida de su género y se encuentra en América Latina desde Misiones (Argentina) (latitud 25° S) hasta Sinaloa (México) (latitud 25° N). Dentro de su amplia distribución se han observado considerables variaciones de algunas

de sus características botánicas (por ejemplo, vellosidad y tamaño de la flor (Johnson, Morales y Whitmore, 1972) han sugerido la posibilidad de que haya dos o más tasas. Crece en la mayoría de los países continentales entre los dos extremos citados. Existe en la mayoría de las islas del Caribe, desde el este de Cuba hasta Trinidad, pero probablemente en Jamaica no sea indígena. Parece especialmente común en América Central y el noroeste de América del Sur.

Es originaria de América tropical se distribuye de México a Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, en el Ecuador se encuentra en los bosques primarios y secundarios de la Costa y Amazonia ecuatorianas (Cañadas, 1983).

2.1.8 *Cordia alliodora* en el Ecuador

El Ecuador es uno de los 17 países megadiversos del mundo, debido a sus ecosistemas, especies, recursos genéticos, tradiciones y costumbres de su gente. Uno de los ecosistemas importantes son los bosques secos pluvio estacionales, que se encuentran en el centro y sur de la región occidental de los Andes, en las provincias de Imbabura, 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.

Las especies vegetales características de los bosques secos pluvioestacionales son: *Ceiba trichistandra*, *Cavanillesia platanifolia*, *Eriotheca ruizi*, *Tabebuia chrysantha*, *Cordia lutea*, *Terminalia valverdae*, *Machaerium millei*, *Cochlospermum vitifolium*, *Bursera graveolens*, *Coccoloba ruiziana*, *Caesalpinia glabrata*, *Piscidia carthagenensis*, *Pithecellobium excelsum* y especies de cactáceas como *Armatocereus cartwrightianus*, *Opuntia ficus indica* y *Enpostoa lanata* (Aguirre et al., 2001; Aguirre y Kvist, 2006).

2.1.9 Hábitat

El laurel es la especie de más amplia distribución del género *Cordia* que incluye alrededor de 200 especies que van de arbustos a árboles de gran tamaño. Su distribución geográfica va desde la latitud 25°N hasta los 25°S. Su distribución latitudinal es amplia, desde cerca del nivel del mar en varios países hasta los 2000m en tierras altas, pero crece con mayor frecuencia debajo de los 500 metros sobre el nivel del mar.

2.1.10 Clima

El *Cordia alliodora* (laurel) crece mejor en las zonas de vida forestales tropicales húmedos y tropical muy húmedo en donde la precipitación anual promedio varía entre 2000 y 5000 mm y la temperatura anual promedio es de 24°C. El laurel alcanza la madurez sexual en un periodo de 5 a 10 años algunos florecen a los 4 año (BIRF et al., 1999).

2.1.11 Requerimientos edáficos

La especie tiene su óptimo desarrollo es suelos profundos, franco arenosos y franco arcillosos, bien drenados, de preferencia aluvial con ceniza volcánica reciente, sin capas endurecidas ni agua freática permanente a poca profundidad y rico en materia orgánica. Soporta suelos alcalinos, neutros y ligeramente ácidos, se comporta mejor en estos últimos (pH de 4.5 a 6.5).

2.1.12 Factores limitantes de crecimiento

El laurel es un especie latifoliada nativa, presenta tazas satisfactorias de crecimiento. Tiene buena adaptabilidad en diferentes localizaciones, pero no se recomienda plantarlo en asocio con pastos, debido al pisoteo de ganado, ya que restringe el crecimiento diametral del fuste. Fuera de su hábitat su rendimiento final decae, como plántula soporta la sombra, pero luego requiere total exposición por ser heliófita.

No se desarrolla bien en los suelos muy ácidos y pobres con bajo contenido de calcio, son grandes limitantes para su buen desarrollo y crecimiento. No tolera el drenaje interno pobre, el encharcamiento, ni suelos compactados (EcuadorForestal, 2012).

2.1.13 Recolección de semillas

El *Cordia alliodora* produce abundante fruto, pero ha resultado difícil recoger y almacenar la semilla satisfactoriamente. Existe un limitado período de 2 a 3 semanas antes de que caiga la semilla en que puede recogerse simiente adecuada, almacenada en condiciones de baja temperatura y humedad, sobrevivirá lo suficiente para su utilización. (Tutin y Alli, 2010). Cabe destacar que esta especie posee rápido crecimiento con respecto a otras especies forestales y adaptabilidad a una amplia variedad de suelos. No obstante,

para algunas de ellas no se cuenta con suficiente material de siembra de buena calidad para satisfacer estas necesidades y suplir la demanda media anual (BIRF et al., 1999).

2.1.14 Secado y almacenamiento de semillas

Una vez recolectados los frutos, se les deben desprender los restos de pétalos que aún conservan. Luego, en un ambiente fresco, a la sombra y ventilado, se colocan las semillas esparcidas en papel periódico, sobre recipientes que permitan la circulación de aire entre las diferentes capas de semilla, para lo cual pueden utilizarse mallas o zarandas. Para un secado más uniforme deben eliminarse los excesos de humedad mediante la utilización de ventiladores y efectuando un volteo periódico para mezclar los frutos. Con días soleados, el secado puede durar unos 10 días, con lo que se logran contenidos de humedad de 7% a 8%.

El almacenamiento debe garantizar la viabilidad durante un tiempo prolongado. Para *Cordia alliodora* las condiciones óptimas de almacenamiento son: 7% a 8% de contenido de humedad, temperatura entre 4 y 6°C, empaque en bolsas plásticas de grueso calibre, selladas y guardadas en recipientes de vidrio herméticos, lo cual asegura su viabilidad hasta por 24 meses. La semilla que permanece en condiciones medioambientales y con contenidos de humedad mayores al 10%, pierden rápidamente su viabilidad, debido al bajo contenido de grasas (2.35%), a una proporción relativa de proteínas (21%-29%) y un alto porcentaje de ácidos grasos no saturados, como el ácido linoléico, en una proporción del 27%. Un gramo de semilla con porcentajes de germinación superiores al 60%, permite obtener unas 20 plántulas efectivas² (Ospina et al., 2010).

2.1.15 Dióxido de carbono

El dióxido de carbono es la forma energéticamente más estable de carbono y como tal es un compuesto clave del ciclo natural del carbono. Tras su absorción de la atmósfera, durante la fotosíntesis de las plantas, el dióxido de carbono reacciona con el agua utilizando energía solar. Esto convierte el dióxido de carbono en carbohidratos ricos en energía y se acompaña de una liberación de oxígeno. Los carbohidratos son tomados por los animales como sustratos que suministran energía para el metabolismo. Allí, o bien se convierten en biomasa o son descompuestos en dióxido de carbono y agua mediante la respiración, con lo que el dióxido de carbono resultante se emite a la atmósfera circundante. De la proporción de oxígeno absorbido al dióxido de carbono liberado, se

puede calcular la tasa metabólica basal de un animal. Plantas o animales muertos también liberan dióxido de carbono, que acaba en la atmósfera o en solución acuosa, cuando están siendo aeróbicamente degradados (Trujillo et al., 2008).

2.1.16 Importancia de propagación *in vitro*

Actualmente, el problema más grave del laurel es la poca eficiencia de los sistemas de propagación. La reproducción a través de semillas y la propagación vegetativa son incapaces de satisfacer la demanda de plantas que se requieren para emprender programas de recuperación y de uso racional de esta especie. En este sentido, la propagación masiva a través de métodos biotecnológicos, o micropropagación, es una alternativa para la solución de este problema. Sin embargo, a la fecha no existen reportes acerca del desarrollo de las metodologías requeridas para el cultivo y propagación *in vitro* del laurel, por lo que es necesario llevar a cabo la investigación necesaria para el establecimiento de estos protocolos.

La biotecnología puede ofrecer herramientas muy interesantes para el manejo racional de las especies forestales, incluyendo aquellas que están amenazadas o cuyas poblaciones se reducen debido a la sobreexplotación. Una de estas herramientas es la propagación *in vitro*, la cual permite la producción masiva de ejemplares con fines de establecimiento de plantaciones comerciales, reforestación o explotación sostenible (Valle et al., 2013).

En las especies forestales, la vía de regeneración *in vitro* que ha mostrado la mayor eficiencia es la embriogénesis somática, misma que ya se utiliza a nivel comercial con algunas especies, sobre todo coníferas (Grossnickle & Sutton, 1999). La mayoría de los protocolos de embriogénesis somática reportados para especies forestales son indirectos, ya que primero se requiere la generación de tejido calloso embriogénico, a partir del cual se generan los embriones somáticos en una segunda fase (Canhoto, Lopes y Cruz, 1999).

2.1.17 Fitohormonas

Las fitohormonas u hormonas vegetales, son sustancias producidas por células vegetales ubicadas mayormente en las hojas de la planta y que actúan sobre otras células como mensajeras químicas. Las hormonas vegetales son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas. Las fitohormonas se producen

en pequeñas cantidades en tejidos vegetales, a diferencia de las hormonas animales, sintetizadas en glándulas.

Las hormonas vegetales controlan un gran número de eventos, entre ellos el crecimiento de las plantas, incluyendo sus raíces, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación de las semillas. Una hormona interviene en varios procesos, y, también, todo proceso está regulado por la acción de varias hormonas. Existen fenómenos de antagonismo y balance hormonal que conducen a una regulación precisa de las funciones vegetales, lo que permite solucionar la ausencia de sistema nervioso. Las hormonas ejercen sus efectos mediante complejos mecanismos moleculares, que desembocan en cambios de la expresión genética, cambios en el esqueleto, regulación de las vías metabólicas y cambio de flujos iónicos (Srivastava, 2002).

2.1.18 Ácido Abscísico (ABA)

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que regula diversos procesos en plantas vasculares, incluyendo maduración de embriones, dormancia en semillas, senescencia y respuestas a estrés abiótico, además del cierre estomático. El ABA ha sido llamado la hormona del estrés, ya que incrementa la adaptación a varios tipos de estrés como, temperaturas bajas y salinidad, también participa en las respuestas de la planta ante el déficit hídrico. El modo de acción del ABA es complejo por ello es un tema dinámico de investigación (Chamorro et al., 2003).

2.1.19 Amplificación génica

La amplificación génica es un aumento en el número de copias de un fragmento de ADN particular. Cuando las células están listas para dividirse replican su ADN. En ocasiones, una célula puede cometer un error en la replicación y copiar porciones de su ADN más de una vez. Esto es lo que se conoce como amplificación génica.

En Biotecnología se utiliza para la identificación de género y especie de plantas, hongos benéficos o fitopatógenos, bacterias entre otros microorganismos de interés. Además, se utiliza para la detección de algún metabolito de interés producido por una especie vegetal o microorganismos en específico (Izquierdo, 1995).

2. 2 Marco referencial.

2. 2. 1 Viabilidad y germinación de semillas de tres especies arbóreas nativas de la selva tropical, chiapas, México.

Se determinó la proporción de semillas viables y la pérdida de viabilidad debido al periodo de almacenamiento, así como el efecto de tratamientos pregerminativos que favorecen la germinación en semillas de *Cordia alliodora*, *Terminalia amazonia* y *Bursera bipinnata*, árboles nativos de la selva tropical, Chiapas, México. Se encontró que las semillas recién colectadas presentaron más del 90% de viabilidad, la cual fue disminuyendo hasta mostrar un 15% en *B. bipinnata*, 34% en *C. alliodora* y 18% en *T. amazonia* después de 12 meses de almacenamiento. De acuerdo con la germinación acumulada se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.0001$), se observó que las semillas de las tres especies pueden acelerar su tiempo de emergencia con la aplicación de ácido giberélico y escarificación. Al aplicar los tratamientos pregerminativos se obtuvo más del 90% de germinación final. Los tratamientos pregerminativos favorecen la germinación ya que sin ellos el porcentaje de germinación disminuye (*B. bipinnata* 63%, *C. alliodora* 62% y *T. amazonia* 54%). (Orantes *et al.*, 2013).

2. 2. 2 Inducción y enraizamiento de brotes epicórmicos de *Cordia alliodora* (Ruiz Et Pavon), Oken

Se enraizaron brotes epicórmicos de árboles de laurel utilizando reguladores de crecimiento vegetal. Las concentraciones de citoquininas empleadas para la inducción de brotes a partir de árboles adultos fueron de: 0, 3000, 6000, 9000 mg L⁻¹ de BAP sola y combinadas con 1000, 2000, 3000 mg L⁻¹ de AIA. Las concentraciones de auxinas para el enraizamiento de los brotes fueron de 0, 1000, y 1500 mg kg⁻¹ de ANA y AIB, mediante un DCA con arreglo factorial 3 x 3 (hormona ANA x hormona AIB). Donde determinaron que el uso de citoquininas y auxinas fue efectivo para provocar la diferenciación celular tanto en la inducción y rizogénesis de brotes epicórmicos de laurel (Moreira y Perez, 2012).

2. 2. 3 Rompimiento de la dormancia en semillas y propagación in vitro de *Cordia elaeagnoides* A. DC.

Cordia elaeagnoides es una especie maderable de selvas bajas caducifolias, que por la dificultad de sus semillas para germinar, la especie tiene limitaciones para reproducirse. Se evaluó la presencia de embriones sanos en 1 100 semillas de 11 lotes (100 semillas por lote); se constató que 39.45 % del total corresponden a esta condición. Se probaron 260 ppm de ácido giberélico con inmersión durante 24, 48 y 72 h; la primera alcanzó 96 % de germinación, se obtuvo un promedio de 3.03 brotes por explante tanto en cinetina como benciladenina. Para la rizogénesis *in vitro* se utilizó ácido 3-indolbutírico a dosis de 2.5 y 5 mgL⁻¹, más adenina en oscuridad o fotoperiodo; los datos revelaron que cualquier dosis del ácido 3-indolbutírico induce la rizogénesis. Se concluye que para la germinación de semillas de *Cordia elaeagnoides* es conveniente aplicar ácido giberélico para eliminar la dormancia y para la propagación asexual *in vitro*, cinetina y benciladenina en las proporciones indicadas (Santacruz et al., 2014).

2. 2. 4 Germinación y crecimiento de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. en Ecuador

Se evaluó la germinación y crecimiento de semillas de balsa aplicando siete tratamientos pre-germinativos: inmersión en HSO⁴ por 32 minutos, inmersión en agua a 80 °C durante tres minutos, testigo, remojo en agua a 100 °C por 15 minutos, remojo en agua de coco 12 horas, lijado de las semillas hasta que pierdan su brillo natural, calor seco 96 °C durante 5 minutos. Sembradas en siete sustratos utilizando tierra negra sola y combinada con: tamo de arroz, arcilla más arena, humus UTEQ, zeolita, arcilla más ceniza, humus nacaro (humus de Lombriz). Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) en un arreglo factorial 7 (sustratos) x 7 (tratamientos pre-germinativos) con tres repeticiones y 10 unidades de observación. A los 28 días el factor (sustrato) que más influyó en el porcentaje de germinación fue tierra negra más zeolita 7 g^k con 17,75%. El tratamiento pre-germinativo (lijado de las semillas) 20,85%. Tierra negra + humus UTEQ 0,70 g k⁻¹ x remojo en agua de coco por 12 horas, mostró 133,11 mm de altura de plántula. Tierra negra + humus UTEQ 0,70 g/k con 3,27 mm de espesor del vástago. El mayor número de hojas (cinco) se obtuvo en el tratamiento tierra negra + inmersión en HSO⁴ (Jiménez et al., 2017).

2. 2. 5 Evaluación de la variabilidad genética y dasométrica de nueve procedencias de *Cordia alliodora* (Ruiz Et Pavon) Oken (laurel) en la estación experimental central de la amazonia (eeca), parroquia san carlos, cantón la joya de los sachas, provincia de Orellana.

Se evaluó la variabilidad genética y dasométrica de nueve procedencias de *C. alliodora* en la Estación Experimental Central de la Amazonia (EECA). Se utilizó un (DCA) con 9 tratamientos y tres repeticiones, donde los tratamientos fueron las nueve procedencias (MSL, OJSMVL, NTCBVL, 489, NTCEL, NTCGPL, OJS3NLQL, 490 y 590), se evaluaron variables dasométricas diámetro a la altura del cuello (DAC), diámetro a la altura del pecho (DAP), altura total (HT) y factor de forma (FF). Se concluye que las mejores procedencias que mostraron buenos comportamiento y desarrollo en las condiciones ambientales que presenta en el ensayo de la EECA del INIAP son: NTCBVL, 490, OJS3NLQL y 489, ya que las evaluaciones a los 19 meses determinaron que estas son las mejores procedencias que presentaron mejores desarrollos (Quinatoa 2018).

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3. 1 Método

3.1.1. Tipo de investigación

El estudio posee las cualidades de una investigación de tipo experimental científica, puesto que se realizó la manipulación directa de las variables en estudio: porcentaje de germinación, manipulación de los parámetros ambientales, número de hojas, peso foliar, peso radicular, peso del tallo para cada uno de los tratamientos a través del análisis en laboratorio se procedió a la identificación de los genes relacionados con la producción de ABA y ABS, empleando todos los estándares nacionales e internacionales que rigen la microbiología del suelo y del medio ambiente.

3.1.2. Localización del experimento

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el campo universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1.5 vía Quevedo – Santo Domingo.

3.1.3. Materiales

- ✓ Balanza.
- ✓ Tijera.
- ✓ Cubetas de germinación.
- ✓ Medidor de temperatura y humedad.
- ✓ Computador
- ✓ Libreta de apuntes.
- ✓ Esferográficos.
- ✓ Impresora.

3. 1. 4 Sustratos a evaluar

- ✓ Arena más Tierra
- ✓ Turba más Tierra negra
- ✓ Arena más Tierra y Turba
- ✓ Arena más Turba

✓ Testigo (tierra convencional)

3. 1. 5 Tratamientos

Para determinar el porcentaje de germinación de semillas de laurel se empleó cuatro tratamientos el cual corresponde a los cuatro sustratos evaluados en invernadero más un testigo. Las variables fueron evaluadas a los 30 días después de la siembra.

Para evaluar las características morfométricas se comparó el efecto del crecimiento de las plántulas de laurel blanco a los 60 días después de la siembra.

Los genes ABA y ABS fueron determinados para cada uno de los tratamientos en estudio.

3. 2 Diseño de investigación

3. 2. 1 Diseño para la determinación del porcentaje de germinación de semillas de *Cordia alliodora*.

Para la determinación de los efectos en la germinación producida por cada uno de los sustratos a evaluar se estableció un diseño completamente al azar (DCA) el cual está constituido por 5 tratamientos (cuatro sustratos en invernadero más un testigo *in vitro*), organizadas en 5 repeticiones por tratamiento.

Todas las variables fueron sometidas a la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos.

Esquema del análisis de varianza para la determinación del porcentaje de germinación y de los efectos en el crecimiento de plántulas de *Cordia alliodora*.

Tabla 1 Esquema del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	20
Tratamientos	4
Total	24

Elaborado: Autor

3. 2. 2 Diseño para la determinación de los efectos en el crecimiento de plántulas de *Cordia alliodora*.

Para la determinación de los efectos en el crecimiento producida por cada uno de los sustratos a evaluar se estableció un diseño completamente al azar (DCA) el cual estará constituido por 5 tratamientos en 5 repeticiones.

Todas las variables fueron sometidas a la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos.

3. 2. 3 Determinación de crecimiento de *Cordia alliodora*

Las semillas son procedentes de la provincia de Manabí, fueron sumergidas en agua por el lapso de 24 horas, para luego agregarlas a los diferentes sustratos.

El registro de los datos de crecimiento de las plantas evaluadas sobre cada uno de los sustratos en estudio se determinó 60 días después de la siembra. Los datos se registraron con una balanza analítica (g) y una regla (cm).

3. 2. 4 Determinación de crecimiento de *Cordia alliodora in vitro*.

Las semillas de laurel fueron lavadas con una solución de etanol al 70% por un minuto. Se esterilizaron por 5 minutos en una solución de hipoclorito de Sodio al 2.5 %, adicionando una gota de detergente Tween 20® por 100 ml. Transcurridos los 5 minutos, se retiró la solución de cloro, haciendo cuatro lavados con abundante agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas fueron sumergidas en alcohol al 70 % por 30 segundos. Para la elaboración del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), se combinaron los siguientes reactivos:

- Sulfato de magnesio y fosfato de potasio: 25ml L⁻¹
- Nitrato de amonio y nitrato de potasio: 25ml L⁻¹
- Cloruro de calcio: 25ml L⁻¹
- Vitaminas MS (Murashige y Skoog): 5ml L⁻¹
- Fuentes de hierro: 5ml L⁻¹

- Micronutrientes: 5ml L⁻¹
- Sacarosa: 30gramos L⁻¹
- Agua destilada estéril

Una vez que se combinaron todos los reactivos, se regulo el pH a 5.7 del medio de cultivo. En la base de los frascos de vidrio se colocó una cantidad moderada de algodón y se vertió 20 ml de medio de cultivo, los frascos fueron colocados dentro de la autoclave para su desinfección, se mantuvo la autoclave durante 15 minutos en 250°F.

El medio de cultivo se lo dejo reposar durante 5 días, después de este tiempo se llevó todos los materiales a la cámara de flujo laminar, donde se sometieron a la luz ultravioleta (UV), durante 20 minutos para eliminar cualquier agente infeccioso. Pasado los 20 minutos se llevó a la cámara de flujo laminar las semillas de balsa, que se encontraban en refrigeración y en influencia del fungicida. La desinfección de las semillas se la realizó con alcohol al 70% por un minuto y enjuagando 3 veces con agua destilada estéril, después se las dejó durante 10 minutos en cloro al 2% en 100 ml de agua destilada estéril. Finalmente se sembraron 5 semillas en cada frasco de vidrio con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). Una vez sembradas las semillas, se las colocó por 24 horas en total oscuridad, luego se las ubicó en el área de crecimiento del laboratorio de tejido vegetal.

3. 2. 5 Identificación molecular de ABA y ABS mediante primers específicos

✓ Extracción de ADN

Se recolectó con ayuda de una tijera el tejido foliar fresco procedente de cada uno de los tratamientos, se seleccionó un aproximado de 10 gramos de tejido foliar y se procedió la extracción de ADN genómico mediante el kit QIAGEN-Start protocol. Las muestras obtenidas fueron almacenadas en congelador a -20⁰ Celsius.

✓ **Determinación molecular de la presencia de ABA y ABS.**

Se determinó la presencia de los genes que codifican para la producción del ABA y ABS, el cual ayuda a combatir el estrés por factores abióticos, por ejemplo, cuando la planta se encuentra en condiciones ambientales desfavorables en específico el estrés hídrico, la producción de ABA y ABS se incrementa considerablemente a tal punto que se induce al cierre estomático para evitar las pérdidas por transpiración. Para la amplificación de los genes productores de ABA y ABS se realizaron dos PCR con el ADN obtenido mediante el kit QIAGEN – Start Protocol, empleando cebadores ABA1 y ABA2, y para ABS, ABS1 y ABS2 específicos para cada uno de los genes de interés.

La PCR se realizó en tubos de 0.5 ml con un volumen final de mix de 20ul que contiene: Agua 10.7 ul Ultra pura, Partidores: (Forward y reverse para cada uno de los genes de interés), 5 ul de Buffer 10x, 1ul de DNTPs, 0.3 ul de Taq polimerasa y 2 ul de ADN.

Las muestras fueron puestas en un termociclador con las siguientes condiciones: un ciclo inicial a 95° C por 5 minutos (desnaturalización); 35 ciclos a 95° C por un minuto (segunda desnaturalización), para el alineamiento del primer 60 ° C por 1 minuto, para la extensión del ADN 72 ° C por 1 minuto.

Las muestras fueron observadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidas con 2 ul bromuro de etidio donde se obtuvo los productos de la amplificación.

3.3 Datos a registrar

En el ensayo de germinación de la semilla se evaluó el número de semillas germinadas y dichos datos fueron transformados a porcentaje.

Para evaluar el crecimiento de Laurel sobre cada uno de los sustratos se registraron los siguientes datos:

✓ **Porcentaje de germinación**

Se tomó como referencia las plantas germinadas durante los 60 días después de la siembra.

✓ **Altura de la planta**

Se cortó el punto de inserción de la radícula y el cotiledón y se tomó lectura hasta el meristemo apical, con la ayuda de una regla (cm).

✓ **Peso Fresco de la planta**

Se lo realizó mediante el uso de una balanza electrónica.

✓ **Números de hojas**

Para el efecto, se contó el número de hojas funcionales de cada planta a los 60 días punto de inserción de la radícula y el cotiledón, y se utilizará una regla (cm).

✓ **Grosor**

Se procedió a medir cada planta con un calibrador en la base del tallo.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1 RESULTADOS

4. 1. 1 Determinación del porcentaje de germinación de semillas de *Cordia alliodora*

Germinación

Para la determinación de la variable porcentaje de germinación, las semillas fueron colocadas en los cuatro sustratos descritos en la metodología, para comprobar la influencia sobre la germinación de la semilla. El tratamiento 3 conformado por (Arena+Tierra) al igual que el tratamiento 4 presentaron los más altos porcentajes de germinación con promedios de 20.5 y 22% respectivamente, siendo estadísticamente superior a los demás tratamientos evaluados cuyos promedios oscilaron entre 18 y 11.20% respectivamente (Figura1).

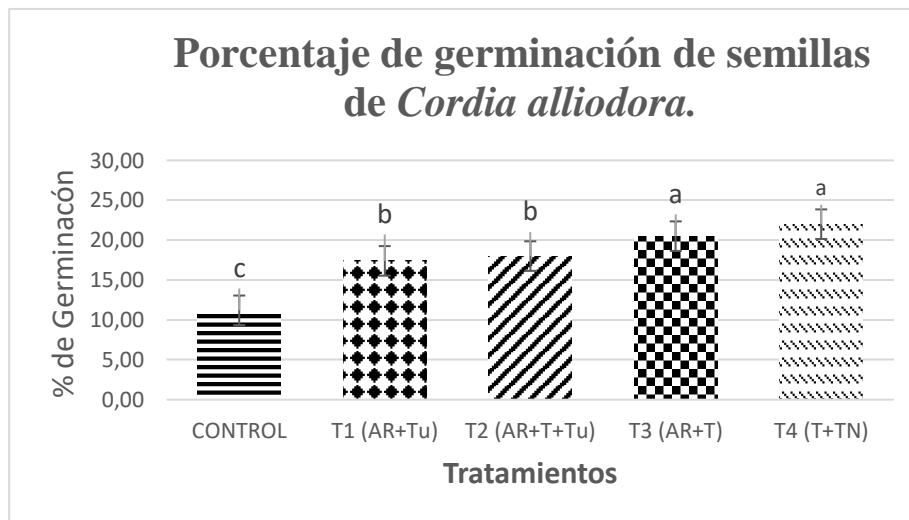


Figura 1. Efecto de germinación de semillas *Cordia alliodora* en diferentes sustratos a los 30 días después de la siembra. Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Tukey).

4. 1. 2 Evaluación del desarrollo de semillas de *Cordia alliodora* en diferentes sustratos convencionales

Altura

La altura de plántulas de laurel fue tomada en centímetros, donde se evidencia una diferencia superior en el T3 (arena + tierra) y T4 (tierra + tierra negra), con promedios de (25.4 cm) y (25.86 cm), estadísticamente superiores a los demás tratamientos con medias de T1 (24.8), T2 (23.66) y control (20.12 cm) (Figura2).

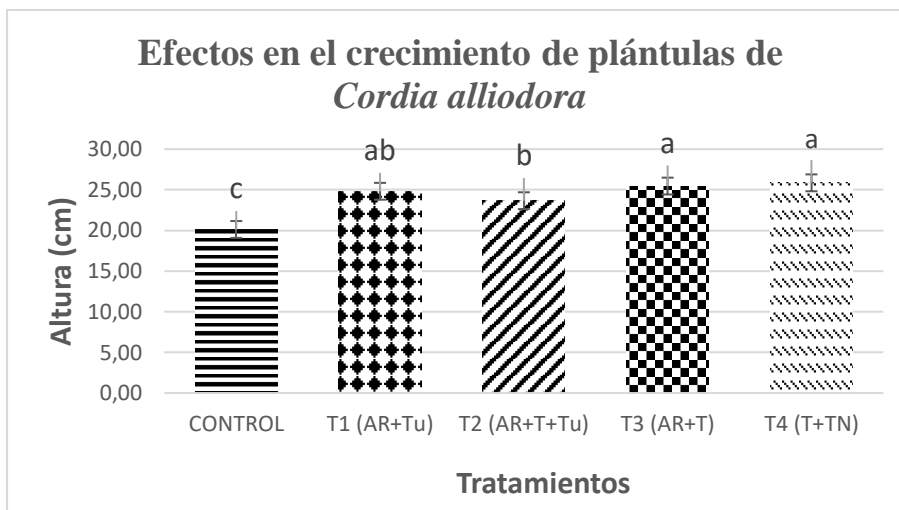


Gráfico 2. Efecto de sustratos en la altura de plántulas de *Cordia alliodora* a los 60 días después de la siembra. Las barras de error indican $\pm ES$; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Tukey).

Número de hojas

El número de hojas de las plántulas sometidas a los diferentes sustratos, mostraron que los T3 (arena + tierra) y T4 (tierra + tierra negra) con promedios de (8.8) y (9.4), son estadísticamente superiores a los demás tratamientos con medios de T1 (6.2), T2 (6.6) y el control con un promedio inferior con un número de hojas de (5.20) (Figura3).

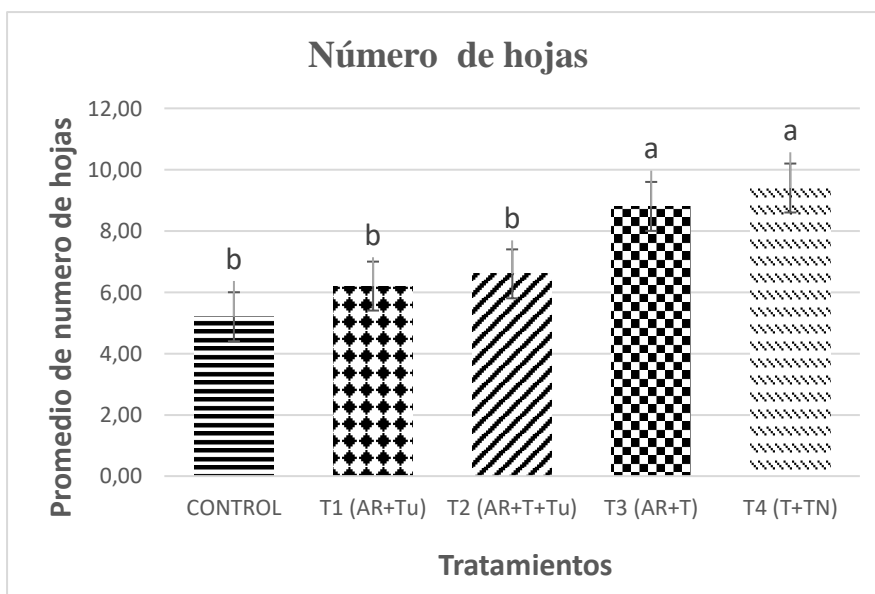


Figura 3. Efecto de los sustratos T1 (arena + turba), T2 (arena + tierra+ turba), T3 (arena + tierra), T4 (tierra + tierra negra) y más un testigo, en el número de hojas de plantas de *Cordia alliodora* a los 60 días después de la siembra (ddp). Las barras de error indican $\pm ES$; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Tukey).

Grosor

Las plántulas sometidas a los diferentes sustratos, mostraron diferencia estadística con los T3 (arena + tierra) y T4 (tierra + tierra negra) en el grosor con medias superiores de 6.18 cm y 7.02 cm a los demás con promedios T1 (4.36 cm), T2 (4.54 cm) y el control estuvo muy por debajo de todos los tratamientos con una media de (4.36 cm) (Figura4).

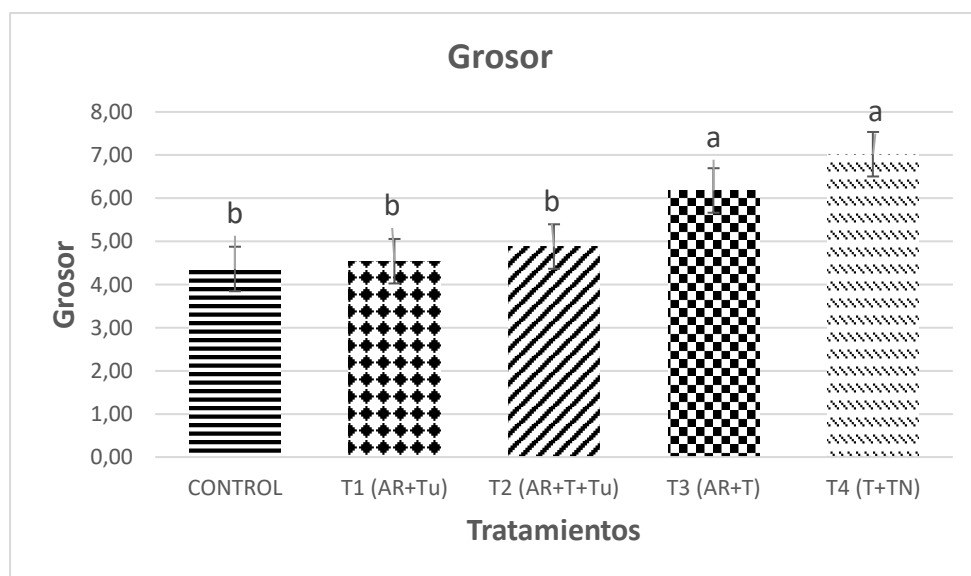


Figura 4. Resultado de los sustratos T1 (arena + turba), T2 (arena + tierra+ turba), T3 (arena + tierra), T4 (tierra + tierra negra) y más un testigo, en la medición de plantas de *Cordia alliodora* a los 60 días después de la siembra (ddp). Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Tukey).

Peso fresco

El peso foliar de las plántulas de laurel en los diferentes sustratos, el tratamiento T2 (arena+ tierra + turba) fue estadísticamente superior con una media de 7.54g en referencia a los tratamientos T3 (arena + tierra), T4 (tierra + tierra negra) con (6.34g, 6.46g) respectivamente, los tratamientos control con el T1, fueron estadísticamente inferior a los demás tratamientos con promedios de (5.64g, 5.32g) respectivamente (Figura5).

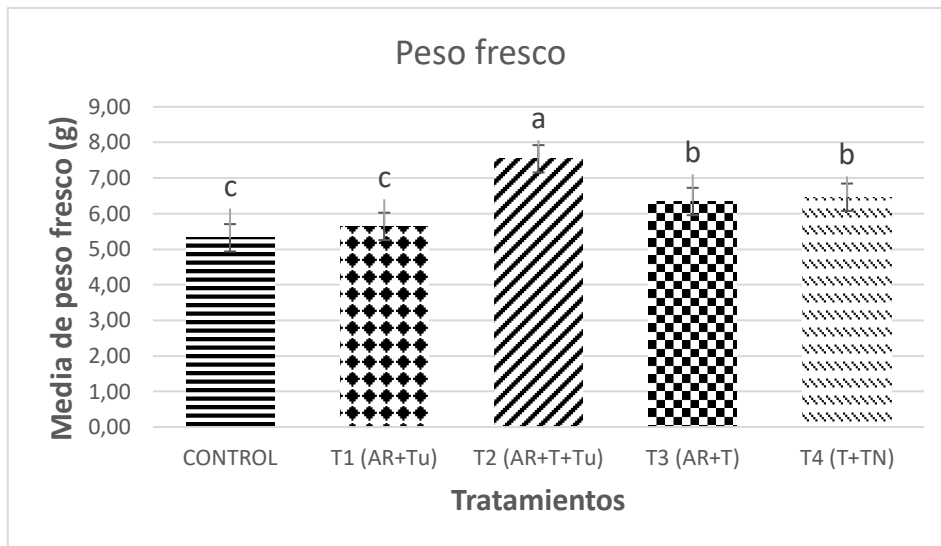


Figura 5. Resultado de los sustratos y más un testigo, en el peso fresco de plántulas de *Cordia alliodora* a los 60 días después de la siembra (ddp). Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (Prueba de Tukey).

Germinación de semillas de laurel bajo condiciones *in vitro*

Debido a la baja incidencia de germinación de semillas posiblemente a la capacidad de tolerancia de estas a las concentraciones de hipoclorito de sodio, en los ensayos en este trabajo. No se logró conseguir el número suficiente de semillas germinadas bajo condiciones *in vitro*. Las diferencias de resultados aparentemente se deben a los tejidos usados en estas dos investigaciones mientras (Cansiong 2018) usó yemas terminales, en esta investigación se usaron semillas de *Cordia alliodora*, es probable que las yemas terminales tengan mayor resistencia a dichos compuestos que las semillas de *Cordia alliodora* de modo que la tasa de mortalidad en el estudio *Ochroma pyramidale* fue menor.

4. 1. 3 Determinación molecular de la presencia de genes ABA y ABS

Extracción de ADN

El protocolo de extracción de ADN usado fue eficiente para *C. alliodora*, en la figura 6 se observa las bandas correspondientes al ADN genómico.

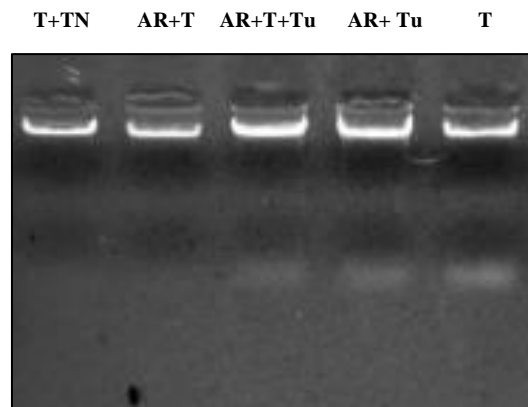


Figura 6. Electroforesis con presencia de ADN en plántulas de laurel (*Cordia alliodora*) en los diferentes sustratos convencionales. **T+TN** (tierra+ tierra negra); **AR+T** (arena+ tierra); **AR+T+Tu** (arena+ tierra+ turba); **AR+Tu** (arena + turba); **T** (tierra convencional).

Prueba molecular

Mediante PCR se logró obtener varios productos de amplificación, los mismos que corresponden a genes ABA. En las plantas seleccionadas de los tratamientos se identificó la presencia de ABA para el T1, T3, y T4 se muestran los patrones de banda específico en la Figura 7.

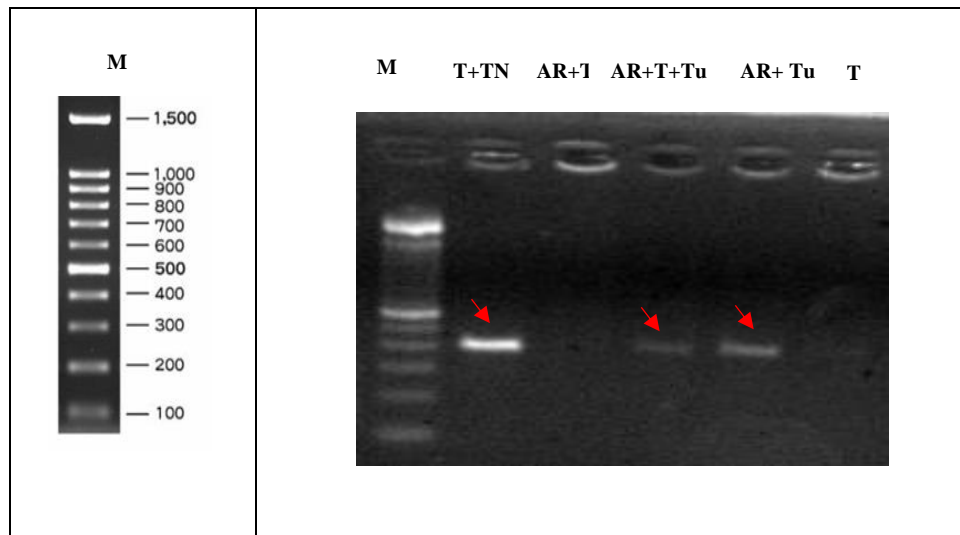


Figura 7. Identificación Molecular de *Cordia alliodora* mediante PCR con presencia del gen ABA. **M** (Ladder de peso molecular de 100pb); **T+TN** (tierra+ tierra negra); **AR+T** (arena+ tierra); **AR+T+Tu** (arena+ tierra+ turba); **AR+Tu** (arena + turba); **T** (tierra convencional).

Mediante PCR se logró obtener varios productos de amplificación, los mismos que corresponden a genes ABS. En las plantas seleccionadas de los tratamientos se identificó la presencia de ABS para el T2, T4, y T5 se muestran los patrones de banda específico en la Figura 8.

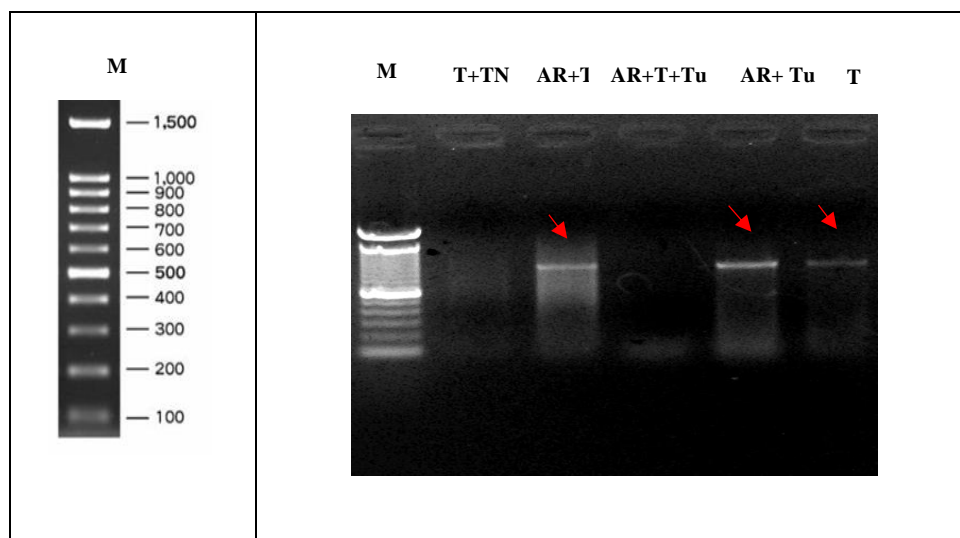


Figura 8. Identificación Molecular de *Cordia alliodora* mediante PCR con presencia del gen ABS. **M** (Ladder de peso molecular de 100pb); **T+TN** (tierra+ tierra negra); **AR+T** (arena+ tierra); **AR+T+Tu** (arena+ tierra+ turba); **AR+Tu** (arena + turba); **T** (tierra convencional).

4. 2 DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos para la germinación y el crecimiento de los individuos de *Cordia alliodora* los tratamientos T3 (arena + tierra) y T4 (tierra + tierra negra), mostrando una mejor respuesta a la plántula estos resultados concuerdan con (Mosquera, 2010) que menciona que tierra negra, absorbe más radiación solar, el suelo adquiere más temperatura lo que le permite absorber con mayor facilidad los nutrientes. También permite mejorar la permeabilidad del suelo ya que influye en el drenaje y aireación de éste. Aumenta la retención de agua en el suelo cuando llueve y contribuye a amenorar el uso de agua para riego por la mayor absorción del terreno. De esta manera facilita la germinación de la semilla y en el crecimiento de las plantas, promocionándole una mayor altura.

Además, la arena según (Fernández et al., 1998) este es uno de los sustratos que se utiliza mayormente por su fácil manera de uso, granulometría y porque presta un buen drenaje general al homogeneizarse bien con el resto de componentes del sustrato. Poseen una capacidad de retención de agua media. Coincidiendo con los resultados obtenidos.

En lo que concierne al peso fresco de la planta en mejor resultado fue el T2 (arena+ tierra + tierra negra) siendo superior con una media de 7.54g a los demás tratamientos. La combinación de este tratamiento permitió un aumento en el peso de la hoja, concordando con (Interempresas, 2017), que indica que la turba es una fuente enriquecida para plántulas de diferentes tipos de cultivo. Domínguez et al. (2017) cumplen la función de sostener la planta a través de su sistema radicular, permitir el suministro de nutrientes, agua y oxígeno para el desarrollo y crecimiento de estos.

Los resultados presentados en esta investigación demuestran que los reactivos que utilizaron otros autores tanto para la preparación del medio de cultivo y el proceso de desinfección fueron favorables en dichos trabajos, sin embargo para la semilla de *Cordia alliodora* no fueron favorables ya que no hubo la germinación *in vitro* y hubo presencia de hongos antes de que hubiera un desarrollo del embrión, esto debido a que requiere ser tratada bajo otras concentraciones o reactivos de menor toxicidad, lo que vuelve recalcitrante a la semilla e impide que el embrión pueda ser liberado. Otro efecto, pudo

estar relacionada con las inadecuadas condiciones en el laboratorio para que esta especie pueda ser germinada de la manera correcta.

En la extracción de ADN de *C. alliodora* se demostró que el kit QIAGEN fue altamente eficiente para esta investigación, ya que se pudo obtener ADN genómico de alta pureza coincidiendo con (Nieto R, 2005) investigación en la cual se extrajo ADN genómico de *Tectona grandis* L. en altas concentraciones.

Dentro de la presencia de genes de resistencia a la sequía, existen escasa fuentes bibliográficas. Pero según los resultados se muestra que estos genes o proteínas se encuentran en las plántulas de laurel (*Cordia alliodora*) coincidiendo con (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997) asegura que los genes que son inducibles por deshidratación y que son dependientes de ABA, contienen elementos de respuesta a ABA, conocidos como ABREs (ABA responsive element). Estos elementos de ADN tienen una secuencia conservada de al menos 8 nucleótidos (PyACGTGGC) y se encuentran en la región de los promotores. Un ABRE funciona como un elemento de ADN cis actuante involucrado en la expresión de un gen regulado por ABA.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Los sustratos convencionales del T3 (arena + tierra) y T4 (tierra + tierra negra), respondieron de una manera positiva dando los mejores resultados, tanto en la semilla y planta de laurel, en su crecimiento y desarrollo.
- La combinación de sustratos influye en el desarrollo de la planta de laurel (*Cordia alliodora*).
- Debido al tiempo que demora en germinar la semilla de forma *in vitro*, se incrementó el riesgo de contaminación respecto a la producción de laurel.
- La respuesta de la germinación de semillas *in vitro* no fue favorable en esta investigación ya que los resultados fueron inferiores a los métodos convencionales.
- El método de extracción de ADN empleado en este trabajo fue de suficiente pureza y de alto rendimiento para los ensayos de amplificación por PCR.
- En el tratamiento T4 (tierra + tierra negra), T2 (arena + tierra + tierra negra) y en el T1 (arena + tierra negra) los genes ABA y ABS están presentes, los mismos que están directamente relacionadas con diferentes tipos de estrés en plantas superiores

5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar nuevos ensayos para observar si los sustratos convencionales influyen en la expansión radicular de la planta.
- Realizar una estratificación en las semillas para mejorar la germinación de las semillas.
- Utilizar nuevas técnicas para la propagación *in vitro* de *Cordia alliodora*, para acelerar su desarrollo, de esta manera aumentaría la tasa de reproducción de la planta.

CAPITULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6. 1 Bibliografía

- AgroMeat. (18 de Diciembre de 2009). *Importancia de la producción forestal*. Obtenido de Importancia de la producción forestal: <https://www.agomeat.com/4269/importancia-de-la-produccion-forestal>
- Aguirre , & Kvist. (2006). Especies leñosas y formaciones vegetales en los bosques estacionalmente secos de Ecuador y Perú. *Arnaldoa*, 324-350.
- Aguirre, Cueva, Marino, Quizhpe, & Valverde. (2001). *Evaluación ecológica rápida de la vegetación en los bosques secos de La Ceiba y Cordillera Arañitas, provincia de Loja, Ecuador*. Quito.
- BIRF-Minambiente-Acofore. 1999. Boletín SITEP. Año 3 (5). Bogotá D. C.: Minambiente. 41 p.
- Canhoto, Lopes, & Cruz. (1999). *Somatic embryogenesis induction in bay laurel (Laurus nobilis L.)*. In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants Vol. 4*. Springer Netherlands.
- Carolina Garcia, Miguel Perez, Tamara Mila, Eduardo Garrido. (2013). SEED VIABILITY AND GERMINATION OF THREE NATIVE SPECIES FROM THE RAINFOREST, CHIAPAS, MÉXICO. *Polibotánica*, 12.
- Cañadas, L. (1983). El mapa bioclimático y ecológico del Ecuador. Quito – Ecuador: MAG-PRONAREG. p. 210
- Carvalho, P. E. R. (2007). Louro-freijó-Cordia alliodora. *Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- CATIE. (1994). Laurel Cordia alliodora. En C. A. Enseñanza, especie de árbol de uso múltiple en América Central (pág. 41). Turrialba: C R.
- Chamorro Alejandra, V. A. (2003). EFECTO DEL ACIDO ABSCÍSICO SOBRE EL DESARROLLO DEL MUSGO TOLERANTE A. 8.

- Domínguez, E., Mc Leod, C., Águila, K., Ojeda, A., & Ivelic, J. (Noviembre de 2017). *Cómo utilizar la turba rubia de Sphagnum en horticultura*. Obtenido de *Cómo utilizar la turba rubia de Sphagnum en horticultura*: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR40969.pdf>
- Ecuador forestal. (2010). <http://ecuadorforestal.org>. Obtenido de Ficha técnica N.- 8 Laurel.: <http://ecuadorforestal.org/wp-content/uploads/2010/08/LAUREL.pdf>
- EcuadorForestal. (2 de Agosto de 2012). *Ficha Técnica N° 4: LAUREL*. Obtenido de Ficha Técnica N° 4: LAUREL: <https://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-4-laurel/>
- FAO. (Noviembre de 1999). www.fao.org. Obtenido de EDUCACIÓN AMBIENTAL PARA EL TROPICO DE COCHABAMBA: <http://www.fao.org/3/ah647s/AH647S04.htm>
- Fernández, Aguilar, Carrique, Tortosa, García, López, & Pérez. (1998). *Suelo y medio ambiente en invernaderos. Conserjería de Agricultura y Pesca*. . Sevilla.
- Grossnickle, & Sutton. (1999). Applications of biotechnology for forest regeneration. *New Forests*, 213-226.
- Interempresas. (2017). *Sustratos para semillero Pinstrub*. Obtenido de Sustratos para semillero Pinstrub: <https://www.interempresas.net/Agricola/FeriaVirtual/Producto-Sustratos-para-semillero-Pinstrub-44078.html>
- ITTO. (2020). *LAUREL (Cordia alliodora)*. Obtenido de LAUREL (Cordia alliodora): <http://www.tropicaltimber.info/es/specie/laurel-cordia-alliodora/>
- Izquierdo, M. (1995). *Biología Molecular Del Cáncer*. Madrid.
- Jiménez Romero, E., García Franco, L., Carranza Patiño, M., Carranza Patiño, H. M., Morante Carriel, J., Martínez Chévez, M., & Cuásquer Fuel, J. (2017). Germinación y crecimiento de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. en Ecuador. *Scientia Agropecuaria*, 8(3), 243-250.

Johnson , Morales, & Whitmore . (1972). Variaciones y características botánicas. Sinaloa, Mexico.

Landis, Tinus, McDonald, & Barnett. (1990). *Containers and growing media. En The Container Tree Nursery Manual*. Washington : Department of Agriculture, Forest Service.

Mosquera, B. (2010). *Abonos orgánicos. Protegen el suelo y garantizan alimentación humana*.

Miller, J. S. (2013). A revision of *Cordia* section *Gerascanthus* (Boraginales: Cordiaceae). *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 55-83.

Murillo, R. D. (2015). “*REGENERACIÓN NATURAL DE LAS ESPECIES FORESTALES. JIPIJAPA*.”

Nieto, J., Ramos, L., Motte, E. (2005) Extracción y purificación de ADN de *Tectona grandis* L. para su empleo en la técnica RAPD. *Foresta Veracruzana* 7(2): 1-6.

Orantes, C., Rioja, T., Perez, M., & Garrido, E. (2013). Seed viability and germination of three native species from the rainforest . *Polibotanica*, (August 2017), 36. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/317441605_Seed_viability_and_germination_of_three_native_species_from_the_rainforest_Chiapas_Mexico/figures?lo=1

Ospina, C., Hernández, R., Sánchez, F., Rincón, E., Ramírez, C., Godoy, J., . . . Obando, D. (2010). *Guías silviculturales para el manejo de especies forestales con miras a la producción de madera en la zona andina colombiana* . Obtenido de *Guías silviculturales para el manejo de especies forestales con miras a la producción de madera en la zona andina colombiana* : <https://www.cenicafe.org/es/publications/nogal.pdf>

Pinstrub. (2017). *Pinstrub peat moss*. Obtenido de *Pinstrub peat moss*: <http://www.pindstrup.es/profesional/product-details/pindstruppeat-moss>.

Poel, P. v. (1988). *Cordia alliodora (Ruiz & Pavon) Oken; EXPERIENCIAS EN COLOMBIA*. Bogota: Gaudalupe Ltda.

Quinatoa, M. (2018). Evaluación de la variabilidad genética y dasométrica de nueve procedencias de *Cordia alliodora* R&P (Laurel) en la Estación Experimental Central de la Amazonía.

Santacruz Ruvalcaba, F., Castañeda Nava, J. J., Peralta, G., María, A., Núñez Sandoval, N., & Mora Santacruz, A. (2014). Rompimiento de la dormancia en semillas y propagación in vitro de *Cordia elaeagnoides* A. DC. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 5(25), 84-97.

Shinozaki, & Yamaguchi-Shinozaki. (1997). Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiology*, 115(2): 327–334.

Srivastava, L. M. 2002. *Crecimiento y desarrollo de las Plantas: hormonas y ambiente natural*. Amsterdam: Academic Press. Page 140.

Trujillo, E., Martínez, V., & Flores, N. S. (2008). Ajuste del Equilibrio Químico del Agua Potable con Tendencia Corrosiva por Dióxido de Carbono. *Información tecnológica*, 19(6), 89–101. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642008000600010>

Tutin, T. G., & Alli, V. H. (11 de Abril de 2010). *Flora Europea, 1976*. Cambridge University Press,, Heywood, Estados Unidos.

Valle, Dávila, De la Rosa, Perez, & Morales. (2013). ropagación in vitro del laurel silvestre (*Litsea glaucescens* Kunth) y análisis de la diversidad genética de poblaciones del centro de México. *Investigación y Ciencia*, 19-26.

CAPITULO VII

ANEXOS

7.1. ANEXOS



Anexo 2. Ubicación del terreno para la prueba de germinación



Anexo 1. Germinación de semillas de laurel (*Cordia alliodora*).



Anexo 4. Preparación de sustratos convencionales.



Anexo 3. Aplicación de semillas.



Anexo 6. Plantas de laurel.



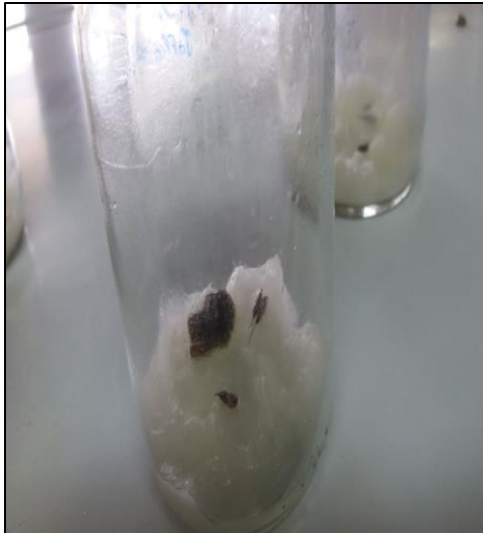
Anexo 5. Distribución de plantas de laurel para los tratamientos.



Anexo 7. Recolección de muestra de laurel (*Cordia alliodora*).



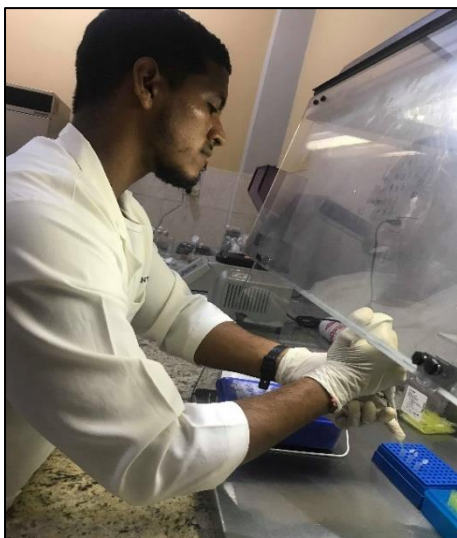
Anexo 8. Semillas de laurel (*Cordia alliodora*).



Anexo 9. Germinación de semillas de laurel para la propagación *in vitro*.



Anexo 10. Proceso de extracción de ADN de laurel (*Cordia alliodora*).



Anexo 12. Preparación de muestras de laurel para la prueba de PCR.



Anexo 11. Aplicación de muestras de laurel en electroforesis.