



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

Proyecto de Investigación previo la  
obtención del título Ingeniero  
Forestal

**TEMA:**

Encapsulamiento *in vitro* de yemas axilares de *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken  
(laurel) como alternativa de manejo, provincia de Los Ríos

**AUTOR:**

Bryan Patricio Calderón Gómez

**DIRECTOR:**

Ing. For. Jaime Morante Carriel, PhD.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2020

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS**

Yo, **Calderón Gómez Bryan Patricio**, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que éste 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, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

---

**Calderón Gómez Bryan Patricio**

**C.C. # 172336724-7**

## **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

El suscrito, **Dr. Jaime Morante Carriel**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el alumno **Calderón Gómez Bryan Patricios**, realizó el Proyecto de Investigación “**Encapsulamiento *in vitro* de yemas axilares de *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (laurel) como alternativa de manejo, provincia de Los Ríos**”, previo a la obtención del título de **Ingeniero Forestal**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

f. \_\_\_\_\_

**Dr. Jaime Morante Carriel**

**DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

## CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

El suscrito, **JAIME MORANTE CARRIEL, Ph. D**, docente de la Facultad de Ciencias Ambientales, en calidad de director del Proyecto de Investigación designado, me es grato comunicar que, una vez cumplida la revisión y verificación de las correcciones pertinentes, declaro que el aspirante a Ingeniero Forestal, Sr. **BRYAN PATRICIO CALDERÓN GÓMEZ**, ha cumplido con las observaciones y correcciones del proyecto de investigación: **“ENCAPSULAMIENTO *IN VITRO* DE YEMAS AXILARES DE *CORDIA ALLIODORA* (RUIZ & PAV.) OKEN (*LAUREL*) COMO ALTERNATIVA DE MANEJO, PROVINCIA DE LOS RÍOS”**. Cumpliendo lo dispuesto en el Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la UTEQ, el proyecto cumple con las disposiciones reglamentarias pertinentes y, por lo tanto, el aspirante está apto para continuar con el proceso de titulación.



**URKUND**

**Document Information**

Analyzed document	TESIS BC 19.7.2020 URKUND.docx (D76581313)
Submitted	7/20/2020 12:54:00 AM
Submitted by	
Submitter email	jmorante@uteq.edu.ec
Similarity	4%
Analysis address	jmorante.uteq@analysis.arkund.com

**Sources included in the report**

<b>SA</b>	<b>UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO / INTRODUCCIÓN.docx</b> Document INTRODUCCIÓN.docx (D43130368) Submitted by: ejimenez@uteq.edu.ec Receiver: ejimenez.uteq@analysis.arkund.com	 3
-----------	--	---

---

**Jaime Morante Carriel, Ph. D**  
**DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**



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

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Encapsulamiento *in vitro* de yemas axilares de *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken  
(laurel) como alternativa de manejo, provincia de Los Ríos**

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

**APROBADO POR:**

---

Dr. José Nieto Rodríguez

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

---

Dr. Nicolás Cruz Rosero

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

---

Ing. For. Oscar Prieto Benavides

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

**QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR  
2020**

## AGRADECIMIENTO

Ante todo, quiero agradecer a Dios ya que ha estado en constante vigilia hacia mi persona, incluso me atrevo a decir que sin su presencia en mi vida yo no estuviera aquí y no hubiese llegado a alcanzar esta etapa muy importante en mi vida, gracias a él puedo disfrutar de este gran logro y de muchas cosas más que me provee.

Quiero agradecer a mis padres por su constancia y apoyo incondicional en todo momento, ya que ustedes fueron los que me alentaron cuando pasaba por un mal momento y me animaron a elegir esta carrera, que cinco años después la estoy culminando gracias a sus esfuerzos.

Un agradecimiento muy especial a mi tutor de tesis **Dr. Jaime Morante Carriel**, por darme la oportunidad de ser su tesista, gracias por brindarme la oportunidad de aprender de sus conocimientos y por el apoyo que me brindó durante este tiempo de elaboración de la investigación, de ante mano hacerle conocer que escogí realizar mi investigación en el área de laboratorio debido a que la vida es un ciclo de inspiración y guía y pues con el pasar de los años quiero y “voy” a llegar a ser un excelente profesional como lo es Ud. También agradecer al **Dr. Nicolás Cruz Rosero** ya que me dio soporte con su conocimiento y su experiencia para llevar a cabo esta investigación.

Por último, pero no menos importante a las personas que también me guiaron y ayudaron a realizar esta investigación, Torres J, Eduardo y al resto de personas involucradas en el desarrollo de esta investigación.

## **DEDICATORIA**

La presente investigación se la dedico:

A mis padres **Calderón Patricio y Gómez Carmen e Hijo Calderón Ezequiel**, quienes son mi fuente de mi inspiración para conseguir grandes éxitos y a pesar de que la vida conlleva situaciones difíciles, ustedes me han enseñado a ser fuerte y a no rendirme nunca.

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo de reproducción *in vitro* y desinfección de la especie *C. alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (laurel) debido a que es una de las especies con mayor demanda en la industria forestal, por sus características de calidad, dureza de la madera y crecimiento rápido. El objetivo general fue desarrollar una metodología para el encapsulamiento *in vitro* de yemas axilares de *C. alliodora* (laurel) con fines de manejo de la especie. En este sentido, se seleccionaron plantas de laurel con características morfológicas sobresalientes. Tras la selección de las plantas se recolectaron yemas axilares que fueron inmediatamente trasladadas hasta el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Una vez en el laboratorio se procedió a establecer los tratamientos de desinfección y asepsia de los explantes. Para ello, se evaluaron 5 tratamientos de desinfección, manipulados en cámaras de flujo laminar para ser colocados en frascos de 250 ml conteniendo medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). En el encapsulamiento se empleó 25 g.L<sup>-1</sup> alginato de sodio disuelto en las sales MS complementadas con y 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, el pH se ajustó a 5,6 antes de disolver el alginato, las yemas se mezclaron con la disolución de alginato de sodio estéril en una cristalizadora previamente esterilizada, se realizó un goteo utilizando una pipeta cortada en la punta para el goteo de una disolución de CaCl<sub>2</sub> (Cloruro de calcio) 2,94 g.mol. L<sup>-1</sup> en 200 ml para obtener la dureza. Este procedimiento *in vitro* nos dio resultados satisfactorios en tres de los cinco tratamientos de desinfección utilizados siendo así el T2 con mayor número de explantes útiles para el establecimiento con un 58,3% , seguido de los T3 y T4 con un 33,3% y 8% respectivamente, en cuanto a la fase de encapsulamiento o producción de perlas se obtuvo que a mayor exposición del explante en la solución de CaCl<sub>2</sub> (Cloruro de calcio) mayor probabilidad de germinación de los explantes, obteniendo así un 70% de explantes germinados en el T2. Cabe destacar que para obtener resultados satisfactorios se debe emplear un protocolo de desinfección adecuado y específico para cada especie ya que de este dependerá el éxito del establecimiento y posterior encapsulamiento, otro punto clave es la selección de la planta madre o donadora de los explantes, debido a que esta deberá poseer características sobresalientes para así obtener ejemplares con similares características y ser plantas jóvenes entre 2 a 6 meses de edad ya que al ser tejido joven tiene la capacidad de regeneración o multiplicación más alta que una planta madura, lo que permite realizar el establecimiento con más facilidad.

**Palabras clave:** explante, cloruro de calcio, alginato de sodio, cultivo Ms, desinfección.

## ABSTRACT

The objective of this research was to develop a protocol for *in vitro* reproduction and disinfection of the *C. alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (laurel) species because it is one of the species with the highest demand in the forestry industry, due to its quality characteristics, hardness of the wood and fast growth. In agroforestry systems, it reduces high temperatures, minimizes wind speed, favors the development of trees or associated crops. The general objective was to develop a methodology for the *in vitro* encapsulation of axillary buds of *C. alliodora* (laurel) for the purpose of managing the species. In this sense, laurel plants with outstanding morphological characteristics were selected. After the selection of the plants, axillary buds were collected that were immediately transferred to the tissue culture laboratory of the State Technical University of Quevedo. Once in the laboratory, the disinfection and asepsis treatments of the explants were established. For this, 5 disinfection treatments were evaluated, manipulated in laminar flow chambers to be placed in 250 ml flasks containing Murashige and Skoog (MS) culture medium. In encapsulation, 25 gL<sup>-1</sup> sodium alginate was used dissolved in the MS salts supplemented with and 30 gL<sup>-1</sup> of sucrose, the pH was adjusted to 5.6 before dissolving the alginate, the buds were mixed with the alginate solution of sterile sodium in a previously sterilized crystallizer, a drip was made using a pipette cut at the tip to drip a CaCl<sub>2</sub> (Calcium Chloride) 2.94 g.mol solution. L<sup>-1</sup> in 200 ml to obtain the hardness. This *in vitro* procedure gave us satisfactory results in three of the five disinfection treatments used, thus achieving the T2 with the highest number of explants useful for the establishment with 58.3%, followed by T3 and T4 with 33.3% and 8% respectively, regarding the encapsulation or pearl production phase, it was obtained that the greater the exposure of the explant in the CaCl<sub>2</sub> solution (calcium chloride), the greater the probability of germination of the explants, thus obtaining 70% of germinated explants. in T2. It should be noted that to obtain satisfactory results, an adequate and specific disinfection protocol must be used for each species since the success of the establishment and subsequent encapsulation will depend on this, another key point is the selection of the mother or donor plant of the explants, due to This must have outstanding characteristics in order to obtain specimens with similar characteristics and be young plants between 2 to 6 months of age, since being young tissue has the capacity for regeneration or multiplication higher than a mature plant, which allows the establishment more easily.

**Key words:** explant, calcium chloride, sodium alginate, Ms culture, disinfection.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS.

	Pág.
PORTADA .....	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	iii
CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	vi
DEDICATORIA .....	vii
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
ÍNDICE DE CONTENIDOS. ....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
CAPITULO I.....	2
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	2
1.1.  Problematización de la investigación. ....	3
1.1.1. Planteamiento del problema. ....	3
Diagnóstico.....	3
Pronóstico.....	3
1.1.2. Formulación del problema. ....	4
1.1.3. Sistematización del problema .....	4
1.2.  Objetivos .....	5
1.2.1. General.....	5
1.2.2 Específicos.....	5
1.3.  Hipótesis.....	5
1.4.  Justificación.....	6
CAPÍTULO II.....	7
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN .....	7
2.1. Marco Conceptual .....	8
2.1.1. <i>C. alliodora</i> .....	8
2.1.2. Yemas axilares.....	9
2.2. Marco referencial .....	9
2.2.1. Encapsulación <i>in vitro</i> .....	9
2.2.2. Conservación <i>in vitro</i> .....	10

2.2.3. Métodos de Conservación <i>in vitro</i> .....	12
<b>CAPÍTULO III</b> .....	13
<b>METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	13
<b>3.1. Materiales y métodos</b> .....	14
3.1.1. Localización del área de estudio. ....	14
3.1.2. Materiales y reactivos .....	14
<b>3.3. Metodología</b> .....	16
3.3.1 Tipo de investigación.....	16
3.3.2. Fases de la investigación .....	16
3.3.2.1. Fase 1: Selección y preparación de las yemas axilares .....	17
3.3.2.2. Fase 2: Desinfección de las yemas axilares .....	17
3.3.2.3. Fase 3: Introducción del material <i>in vitro</i> . ....	18
3.3.2.4. Fase 4: Encapsulamiento <i>in vitro</i> .....	19
3.3.3. Análisis estadístico.....	19
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	20
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	20
<b>4.1. Resultados</b> .....	21
4.1.2. Establecimiento de yemas axilares de <i>C. alliodora</i> en condiciones <i>in vitro</i> .....	22
4.1.3. Evaluación del encapsulamiento <i>in vitro</i> de yemas axilares <i>C. alliodora</i> ....	25
<b>4.1. Discusión</b> .....	26
<b>CAPÍTULO V</b> .....	28
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	28
<b>5.1. Conclusiones</b> .....	29
<b>5.2. Recomendaciones</b> .....	30
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	31
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	31
<b>6.1. Literatura Citada</b> .....	32
<b>CAPÍTULO VII</b> .....	35
<b>ANEXOS</b> .....	35
<b>Anexo 1.</b> Actividades realizadas en el laboratorio. ....	36
<b>Anexo 2.</b> Tratamientos de desinfección y plantas utiles.....	38
<b>Anexo 3.</b> Analisis de varianza por cada variable evaluada. ....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Promedio de explantes útiles a los cuatro días de desinfección, según cada tratamiento utilizado. ....	21
<b>Figura 2.</b> Promedio de explantes contaminados por hongos por cada tratamiento utilizado, las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). ....	22
<b>Figura 3.</b> Promedio de individuos fenolizados por cada tratamiento, las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).....	23
<b>Figura 4.</b> Promedios de explantes sanos por cada tratamiento utilizado, las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).....	24

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Tratamientos utilizados para el proceso de desinfección de los explantes.....	17
Tabla 2. Elementos que constituyen el medio de cultivo - MS .....	18
Tabla 3. Tratamientos y repeticiones para el establecimiento in vitro. ....	18
Tabla 4. Esquema del análisis de varianza .....	19
Tabla 5. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes. ....	25

## |CÓDIGO DUBLÍN

<b>Título:</b>	Encapsulamiento <i>in vitro</i> de yemas axilares de <i>Cordia alliodora</i> (Ruiz & Pav.) Oken (laurel) como alternativa de manejo, provincia de Los Ríos
<b>Autor:</b>	Calderón Gómez Bryan Patricio
<b>Palabras claves:</b>	explante, encapsulación, <i>in vitro</i> , alginato de sodio, cultivo Ms.
<b>Fecha de publicación:</b>	
<b>Editorial:</b>	UTEQ; FCAMB; Carrera de Ingeniería Forestal, 2020
<b>Resumen: (hasta 300 palabras)</b>	<p>La presente investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo de reproducción <i>in vitro</i> y desinfección de la especie <i>Cordia alliodora</i> (Ruiz &amp; Pav.) Oken (laurel) debido a que es una de las especies con mayor demanda en la industria forestal. El objetivo general fue desarrollar una metodología para el encapsulamiento <i>in vitro</i> de yemas axilares de <i>C. alliodora</i> (laurel) con fines de manejo de la especie. Tras la selección de las plantas se recolectaron yemas axilares que fueron inmediatamente trasladadas hasta el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Una vez en el laboratorio se procedió a establecer los tratamientos de desinfección y asepsia de los explantes. Para ello, se evaluaron 5 tratamientos de desinfección, manipulados en cámaras de flujo laminar para ser colocados en frascos de 250 ml conteniendo medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). En el encapsulamiento se empleó 25 g.L<sup>-1</sup> alginato de sodio disuelto en las sales MS complementadas con y 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, el pH se ajustó a 5,6 antes de disolver el alginato, las yemas se mezclaron con la disolución de alginato de sodio estéril en una cristalizadora previamente esterilizada, se realizó un goteo utilizando una pipeta cortada en la punta para el goteo de una disolución de CaCl<sub>2</sub> (Cloruro de calcio) 2,94 g.mol. L<sup>-1</sup> en 200 ml para obtener la dureza. Este procedimiento <i>in vitro</i> nos dio resultados satisfactorios en tres de los cinco tratamientos de desinfección utilizados siendo así el T2 con mayor número de explantes útiles para el establecimiento con un 58,3% , seguido de los T3 y T4 con un 33,3% y 8% respectivamente, en cuanto a la fase de encapsulamiento o producción de perlas se obtuvo que a mayor exposición del explante en la solución de CaCl<sub>2</sub> (Cloruro de calcio) mayor probabilidad de germinación de los explantes, obteniendo así un 70% de explantes germinados en el T2. Cabe destacar que para obtener resultados satisfactorios se debe emplear un protocolo de desinfección adecuado y específico para cada especie ya que de este dependerá el éxito del establecimiento y posterior encapsulamiento, otro punto clave es la selección de la planta madre o donadora de los explantes, debido a que esta deberá poseer características sobresalientes para así obtener ejemplares con similares características y ser plantas jóvenes entre 2 a 6 meses de edad ya que al ser tejido joven tiene la capacidad de regeneración o multiplicación más alta que una planta madura, lo que permite realizar el establecimiento con más facilidad.</p>
<b>Descripción:</b>	
<b>URL:</b>	

## I. INTRODUCCIÓN

La micropropagación asexual es un proceso de división mitótico de las células vegetales donde permite a partir de un fragmento (explante) de una planta donadora o madre obtener una descendencia uniforme con características genéticas similares a la planta madre, los explantes más usados son yemas axilares, yemas terminales. Este proceso *in vitro* es realizado bajo parámetros claves como: la asepsia (ausencia de contaminación de cualquier tipo) y factores controlados (temperatura, luz, etc.).

*C. alliodora* (laurel) es una especie forestal de gran interés debido a su alta calidad, a la dureza de su madera y a su rápido crecimiento, teniendo una demanda creciente para la industria, la ebanistería y la agroforestería. Además, es una especie apta para plantaciones forestales de escala industrial, ya que su madera posee varias características de trabajabilidad belleza y brillo teniendo una demanda sostenida con altas posibilidades de incrementarse (Ecuador Forestal, 2010). Sin embargo, en los últimos años, su potencial forestal se ha visto afectado por la destrucción de su hábitad y las limitadas condiciones de reproducción natural de la especie por efectos antropogénicos. En este sentido, la micropropagación, unido al encapsulamiento son alternativas novedosas que favorecen enormemente la producción asexual de la especie.

El encapsulamiento se realiza encerrando un explante vegetativo *in vitro* en un medio artificial con componentes nutritivos y protectores de alginato el cual forma una perla. La encapsulación preserva la viabilidad, el potencial de rebrote y la capacidad de enraizamiento que permite el traslado del material a cualquier parte (Micheli *et al.*, 2007). Conocido universalmente como semilla artificial, esta semilla al sembrarla es capaz de producir una plántula (un proceso conocido como conversión) y es denominada cápsula, cuando se emplea para la siembra *in vitro* antes de producir plántulas (Cansiong, 2019). La investigación se centra en desarrollar un método de encapsulamiento *in vitro* de *C. alliodora* a partir de yemas axilares, con la finalidad de crear especímenes con características genotípicas y fenotípicas sobresalientes, con las cuales se pueda establecer plantaciones forestales de calidad y obtener buenos resultados de producción.

## **CAPITULO I**

# **CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. Problematización de la investigación.**

### **1.1.1. Planteamiento del problema.**

El laurel es una de las especies forestales con mayor demanda comercial en el mercado ya que posee características de calidad, dureza de la madera y lo más principal crecimiento rápido, lo que lo hace un centro de atención para las industrias que comercializan madera. Debido a esta alta demanda de la especie laurel, se está provocando una reducción en la presencia de la especie y se está alterando el hábitat donde se desarrolla, esto provoca que la especie sea difícil encontrar especímenes con características sobresalientes para la repoblación de la especie y para satisfacer la demanda comercial. Debido a esto se ha planteado desarrollar un protocolo de encapsulamiento *in vitro* con el objetivo principal de mejorar la especie, saber con exactitud la procedencia del material genético, promover la viabilidad para obtener plántulas de calidad y sobre todo preservar la especie.

#### **Diagnóstico.**

Existen productores de madera que realizan sus plantaciones forestales con plántulas o semillas, los mismos que desconocen la procedencia específica del material genético a utilizar y por ende no garantizan a futuro la calidad, resistencia, rentabilidad de producción de sus plantaciones.

#### **Pronóstico.**

Mediante el proceso de encapsulamiento *in vitro*, método de reproducción asexual mediante la manipulación de yemas axilares, se garantizará la procedencia, calidad, resistencia del material genético a utilizar y con estas características se asegurará a futuro buenos resultados de producción.

### **1.1.2. Formulación del problema.**

¿Cuánta efectividad ofrece el proceso de encapsulamiento *in vitro* de yemas axilares, como alternativa de manejo de la especie *C. alliodora*, en el proceso de producción de madera?

### **1.1.3. Sistematización del problema**

¿Cuáles son los parámetros para la selección de yemas axilares de la especie *C. alliodora*?

¿Qué características se debe seleccionar para la obtención del material genético óptimo para la producción de madera de *C. alliodora*?

¿Qué metodología de encapsulamiento se debe establecer para el desarrollo de yemas axilares de *C. alliodora*?

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. General.**

Desarrollar una metodología para el encapsulamiento *in vitro* de yemas axilares de *C. alliodora* (laurel) con fines de manejo de la especie.

### **1.2.2 Específicos.**

- Desarrollar un método eficaz para la desinfección de yemas axilares de *C. alliodora* con características fenotípicas sobresalientes.
- Establecer yemas axilares de *C. alliodora* en condiciones *in vitro*.
- Evaluar el encapsulamiento *in vitro* de yemas axilares *C. alliodora*

## **1.3. Hipótesis.**

H<sub>1</sub>: Las yemas axilares de *C. alliodora* (laurel), logran ser encapsuladas de forma *in vitro*.

H<sub>0</sub>: Las yemas axilares de *C. alliodora* (laurel), no logran ser encapsuladas de forma *in vitro*.

#### **1.4. Justificación.**

La especie *C. alliodora* (laurel) es una de las especies con mayor demanda en la industria forestal, debida sus características de calidad, dureza de la madera y sobre todo por su proceso de crecimiento rápido, apetecido en las industrias que se dedican a la ebanistería fina entre otras industrias, también es muy atractivo en los sistemas agroforestales ya que este reduce las temperaturas altas, reduce la velocidad de los vientos, favorece al desarrollo de árboles o cultivos asociados. Debido a la gran importancia y utilidad que posee esta especie forestal, la presente investigación pretende desarrollar un protocolo de encapsulamiento *in vitro* con el objetivo principal de mejorar la especie, saber con exactitud la procedencia del material genético, promover la viabilidad para obtener plántulas de calidad con la cual se establecen las plantaciones forestales.

## **CAPÍTULO II**

# **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## **2.1. Marco Conceptual**

### **2.1.1. *C. alliodora***

El laurel es una especie nativa de los bosques primarios y secundarios de la Costa y Amazonia ecuatorianas. Se distribuye de México a Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil. Árbol que crece hasta 40m de altura, 20m de fuste y 100cm de diámetro. Base del tronco con aletones medianos laminares. Entre las varias características de mayor interés de este árbol es la capacidad de auto poda incluso en condiciones abiertas, donde los árboles adultos son deciduos incluso en climas no estacionales, durante uno o dos meses después de la producción de la semilla (Vinueza, 2012).

#### **2.1.1.1. Características climáticas**

Según Vinueza (2012) los requerimientos climáticos de la especie son:

Requerimientos climáticos.

Altitud:	50 – 1000 msnm
Precipitación:	2000 – 4000 mm
Temperatura:	20 – 27 °C

#### **2.1.1.2. Requerimientos edáficos.**

La especie *C. alliodora* se desarrolla de manera óptima en suelos profundos, franco arenoso y franco arcilloso, bien drenados, de preferencia aluvial con ceniza volcánica reciente, sin la presencia de capas endurecidas ni agua freática permanente a poca profundidad y rico en materia orgánica. Soporta suelos alcalinos, neutros y ligeramente ácidos, su mejor desarrollo se presenta en suelos que fluctúen entre valores de 4.5 a 6.5 pH (Vinueza, 2012).

#### **2.1.1.4. Clasificación taxonómica**

Según Oken (1843) la clasificación taxonómica del laurel es la siguiente:

Phyllum: Plantae

Subphyllum: Spermatophyta

Clase: Magnoliophytina

Subclase: Magnoliopsida

Orden: Asteridas

Familia: Polemoniales

Subfamilia: Borraginaceas

Género: *Cordia*

Especie: *Alliodora*

#### **2.1.2. Yemas axilares.**

Las yemas axilares son un conjunto de células que forman un meristemo y unas pequeñas hojas rudimentarias también conocidas primordios foliares protegiendo cuya función es proteger al meristemo, este conjunto se encuentra ubicado en los nudos, zona donde se produce la inserción del peciolo de la hoja y el tallo, el resultado de esta intersección genera la aparición de ramas laterales o las flores, las ramas del tallo se forman a partir de las yemas axilares (Megías, Molist y Pombal, 2018).

## **2.2. Marco referencial**

### **2.2.1. Encapsulación *in vitro***

La propagación vía asexual sin duda es una de las alternativas excelentes para muchas especies tanto de importancia comestible, ornamental, maderable o simplemente con la finalidad de conservar el material genético de algún tipo de especie en peligro de extinción, los métodos más utilizados para realizar este tipo de propagación son: por estacas, esquejes o acodos; los cuales han sido muy útiles para muchas especies vegetales, no obstante el número de individuos generados es directamente proporcional al material vegetal requerido. El cultivo o encapsulamiento *in vitro* ha sido de interés en los últimos años debido a que otorga ventajas sobre otros métodos convencionales, principalmente la obtención de

organismos completamente sanos además de tener la capacidad de generar cultivos en masa a partir incluso de una sola célula, una de las características de los métodos de propagación asexual radica en la poca variabilidad genética que se genera en los cultivos, por ende al aplicar este tipo de métodos se reproduce especies resistentes a los factores ambientales y a ser menos vulnerables a plagas y enfermedades (Nuñez, Mora y Santacruz, 2008).

Benelli (2016) señala que la técnica de encapsulación para crear semillas sintéticas es una aplicación importante para el cultivo *in vitro*, otra manera de realizar este método es con la manipulación de yemas axilares o segmentos nodales para desarrollar las semillas sintéticas, esta técnica de encapsulación se utiliza hoy en día en procedimientos avanzados de crioconservación, como métodos de encapsulación-deshidratación y encapsulación vitrificación, obteniendo resultados excelentes y prometedores para una correcta y eficaz conservación a largo plazo del material genético (Cansiong, 2019).

### **2.2.2. Conservación *in vitro***

La utilización de procedimientos *in vitro* en especies leñosas, plantas nativas y vulnerables se ha convertido en un objetivo principal de investigación, ya que estos procesos *in vitro* permiten generar una gran variabilidad genética obteniendo como resultados ejemplares con material genético elite y libre de patógenos (Jadán, Romero y Orquera, 2013). La conservación *in vitro* nos brinda la capacidad de almacenar, transportar por un considerable tiempo un banco de genes útiles a los Fito mejoradores, con un sin número de beneficios tanto prácticos como biológicos, en la micropropagación acelerada como para la conservación *in vitro* de variedades y especies, el fenómeno de la regeneración de órganos o plantas completas es determinante (Mesa, Lajonchere y Toral, 1995).

El proceso de conservación *in vitro* presenta variedad de ventajas, como la obtención de material libre de patógenos, tasas de multiplicación altas, suministro constante de plantas a los productores, bajo costo en la producción, mantenimiento de la confianza genética del material. A pesar de estas enormes ventajas también presenta sus desventajas las cuales pueden ser la pérdida de material genético por contaminaciones, dependencia de profesionales calificados para realizar el proceso y que el material puede destruirse en caso de un siniestro (Jain, 2011).

### **2.2.2.1. Métodos desarrollados a partir propagación *in vitro***

A partir de la propagación *in vitro* se han desarrollado varios métodos como son la formación acelerada de yemas axilares y la producción de yemas adventicias, tienen amplio uso y un tercer método llamado embriogénesis somática, está presentando un potencial excepcional para la propagación *in vitro* (Schilde-Rentschler y Schmiediche, 1984). Geroge y Debergh (2008) señalan que “la micropropagación es la manipulación destacada de material genético en el cultivo de tejido, donde a partir del cultivo de meristemos es posible obtener plantas genéticamente idénticas a la planta madre y propagar a gran escala especies élite, amenazadas, en peligro de extinción, nuevas variedades o las que tienen baja tasa de reproducción de manera natural” (Rangel, Hernández y Hernández, 2016).

Se conoce que la aplicación de yemas axilares posee un porcentaje mínimo para el uso en gramíneas a causa de su morfología, esto hace que sea más aplicada en leguminosas y otras plantas pratenses y forrajeras (Goyal y Arya, 1984). La diferenciación de brotes adventicios otorga la regeneración de una mayor cantidad de brotes frente el sistema de yemas axilares, pero la estabilidad genética no es alta fundamentalmente en la formación de ápices a partir de callos originados del explante (Santana, 1994). El Procedimiento de micropropagación de plantas se realiza mediante la obtención de explantes primarios ápices caulinares, atravesando fases como: establecimiento *in vitro*, proliferación de micro tallos, en el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de micro tallos y macollas se induce aplicando auxinas y/o carbón activado y para producir el desarrollo de raíces es necesario utilizar un sustrato enriquecido con materia orgánica, el proceso de endurecimiento de la plántula se realiza de manera simultánea con el proceso de desarrollo radical (Rache y Pacheco, 2010).

### **2.2.3. Métodos de Conservación *in vitro***

Existen dos métodos de conservación *in vitro*, su utilización varía en dependencia de la duración que requiera el almacenamiento del material genético. Para corto o mediano plazo el objetivo es reducir la velocidad de crecimiento del material vegetal, puede ser empleado el método de crecimiento mínimo, por su parte la crioconservación garantiza la conservación *in vitro* por períodos prolongados de tiempo (García, De Feria, Acosta, 2007).

#### **2.2.3.2. Método de crioconservación**

En el proceso de conservación a largo plazo es necesario emplear la crioconservación (almacenamiento en nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), en donde este proceso produce que los procesos metabólicos y la división celular se detengan, con lo cual brinda la ventaja de que el material vegetal crioconservado se puede preservar en espacios reducidos, en condiciones seguras, sin variabilidad genética y sin grandes costos de mantenimiento (Fukai, 2017).

Abdelnour (1999) señala que en la crioconservación se recomienda el almacenamiento de estructuras organizadas como meristemos, ápices, semillas, embriones cigóticos, polen y embriones somáticos para asegurar la estabilidad genética de los materiales, mediante este sistema de conservación es posible almacenar desde células hasta órganos, hasta materiales generados en el laboratorio como los producidos por ingeniería genética, la clave principal para poner en marcha el programa de crioconservación de la especie de interés es contar con el protocolo de micropropagación, previo bien evaluado y permitir altos porcentajes de regeneración de las plantas (Rivera *et al.*, 2008).

**CAPÍTULO III**  
**METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **3.1. Materiales y métodos**

#### **3.1.1. Localización del área de estudio.**

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo UTEQ km 1 ½ vía Quevedo-Santo Domingo.

#### **Características del área experimental.**

Las características ecológicas y meteorológicas de la zona de estudio son:

Temperatura.....	25°C
Humedad relativa.....	81 a 85 %
Precipitación media anual.....	1253 mm
Altitud.....	73 msnm
Heliofanía.....	640 horas luz
Zona ecológica.....	bh-T
Topografía.....	Irregular

#### **3.1.2. Materiales y reactivos**

##### **3.1.2.1. Materiales de oficina**

- Libreta
- Computadora
- Software
- Mandil
- Esferos

### **3.1.2.2. Materiales de laboratorio**

- Tubo de ensayo
- pH metro
- Algodón
- Papel aluminio
- Micropipeta
- Puntas plásticas
- Frascos de vidrios
- Cajas Petri
- Balanza
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de crecimiento climatizada
- Bisturí
- Pinzas
- Matraz
- Tijeras
- Autoclave
- Coladero

### **3.1.2.3 Material experimental**

- Yemas axilares de *C. alliodora*

#### **3.1.2.4 Reactivos**

- Cloro
- Alcohol
- Macronutrientes
- Micronutrientes
- Fuentes de hierro
- Cloruro de calcio
- Vitaminas MS
- Agua destilada estéril
- Alginato de sodio
- Agar noble
- Gentamicina
- Tween
- Ácido ascórbico

### **3.3. Metodología**

#### **3.3.1 Tipo de investigación**

El trabajo se ajustó al tipo de investigación experimental y analítico. El tipo experimental depende de los tratamientos, repeticiones, unidades experimentales y variables. El tipo analítico se sujetó a la interpretación de los resultados por paquetes estadísticos.

#### **3.3.2. Fases de la investigación**

El proceso de micropropagación o encapsulamiento *in vitro* consta de varias fases, dónde los explantes fueron analizados de forma periódica.

1. Selección y preparación de las yemas axilares
2. Desinfección de las yemas axilares
3. Introducción del material seleccionado *in vitro*
4. Encapsulamiento *in vitro*

### 3.3.2.1. Fase 1: Selección y preparación de las yemas axilares

El establecimiento del cultivo desarrolló en condiciones de asepsia, se obtuvieron los explantes (yemas axilares) con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. En el proceso de obtención de los explantes es recomendable considerar los parámetros fenotípicos sobresalientes de la planta madre, es decir la planta donadora de yemas. Las plantas seleccionadas como donadoras fueron fumigadas dos veces por semana con un fungicida sistemático para reducir la presencia de contaminantes fúngicos y otro tipo de agente dañino (Indacochea, 2013).

### 3.3.2.2. Fase 2: Desinfección de las yemas axilares

Una vez elegida la planta donadora, se extrajeron los fragmentos a partir de los cuales se obtuvieron los explantes, en esta investigación son yemas axilares, los mismos que fueron sometidos a un proceso de desinfección para eliminar los contaminantes externos más comunes como hongos, bacterias que habitan en forma natural en el ambiente y hongos endógenos en caso de estar presentes, antes de realizar los tratamientos de desinfección se hizo un pre lavado de los explantes que consistió en aplicar detergente comercial, NaClO 1% en 1000 ml de agua destilada estéril incluyendo agitación constante durante 5 min, posterior a esto se realizaron cinco tratamientos de desinfección (López *et al.*, 2010).

**Tabla 1. Tratamientos utilizados para el proceso de desinfección de los explantes.**

Tratamientos	NaClO %	Tiempo Min	Ca (ClO)	Tiempo	Et O H %	Tiempo	Gentamicina mg/L <sup>-1</sup>	Povidyn %	Tiempo	Ácido ascórbico mg/L <sup>-1</sup>	Tiempo	NaHCO <sub>3</sub> g/L <sup>-1</sup>	Tiempo
<b>T 1</b>	10	30					160	30	5				
<b>T 2</b>	20	20			75	1	160	50	10	1	10	1	20
<b>T 3</b>	30-40	5-10			75	1	160	50	10	1	10	1	20
<b>T 4</b>	50	10					160	50	5				
<b>T 5</b>	2,5	15	2.5	1	75	1	160			1	10		

### 3.3.2.3. Fase 3: Introducción del material *in vitro*.

Después de la desinfección superficial, el material vegetal se colocó en frascos de 250 ml conteniendo 20 ml del medio MS semisólido y 10 ml.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico que fue añadido al medio para evitar la fenolización de los explantes. Este medio de cultivo es estéril, durante el periodo 7 o 15 días comenzó el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro* (Cansiong, 2019).

La composición del medio de cultivo consta de varios elementos como:

**Tabla 2. Elementos que constituyen el medio de cultivo - MS**

<b>Elementos</b>	<b>Cantidades</b>
Sulfato de magnesio y fosfato de potasio	25 ml.L <sup>-1</sup>
Nitrato de amonio y nitrato de potasio	25 ml.L <sup>-1</sup>
Cloruro de calcio	25 ml.L <sup>-1</sup>
Vitaminas MS	5 ml.L <sup>-1</sup>
Fuentes de Hierro	5 ml.L <sup>-1</sup>
Micronutrientes	5 ml.L <sup>-1</sup>
Sacarosa	30 g. L <sup>-1</sup>
pH	5.7

**Tabla 3. Tratamientos y repeticiones para el establecimiento *in vitro*.**

<b>Tratamientos</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>
R1	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
R2	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
R3	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

### 3.3.2.4. Fase 4: Encapsulamiento *in vitro*

En el encapsulamiento se empleó 25 g.L<sup>-1</sup> alginato de sodio disuelto en las sales MS complementadas con y 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, el pH se ajustará a 5.7 antes de disolver el alginato. En el momento de la encapsulación, las yemas se mezclarán con la disolución de alginato se sodio estéril en una cristalizadora previamente esterilizada, se realizará un goteo utilizando una pipeta cortada en la punta para el goteo de una disolución de CaCl<sub>2</sub> (Cloruro de calcio) 2,94 g. mol. L<sup>-1</sup> en 200 ml para obtener la dureza. Se colocarán a razón de cuatro capsulas en frascos que contengan 20 ml de medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento y se encubarán en cámaras de luz solar, con una intensidad luminosa de 54 μmol/m<sup>2</sup>s, 25 ± 2 ° C de temperatura y humedad relativa de 80 a 90% durante cuatro semanas (Cansiong, 2019).

### 3.3.3. Análisis estadístico

Para cada variable analizada, se aplicó un Diseño Completo al Azar (DCA). Con cinco tratamientos, con arreglo de un solo factor, los cuales tuvieron 3 repeticiones, 10 observaciones cada una. Para determinar diferencias entre medias se empleó la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). A continuación, se presenta el esquema de análisis de varianza (Tabla 4) y el modelo matemático aplicado para validar la significancia estadística.

**Tabla 4.** Esquema del análisis de varianza

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Tratamiento	(t-1)
Repetición	(r-1)
Error	(t-1) (r-1)
Total	(t*r)-1

Fuente: Carmona *et al.* (2002).

Modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Siendo:

$Y_{ij}$ : Valor de la observación.

$\tau_i$ : efecto del tratamiento i

$\epsilon_{ij}$ : Error experimental.

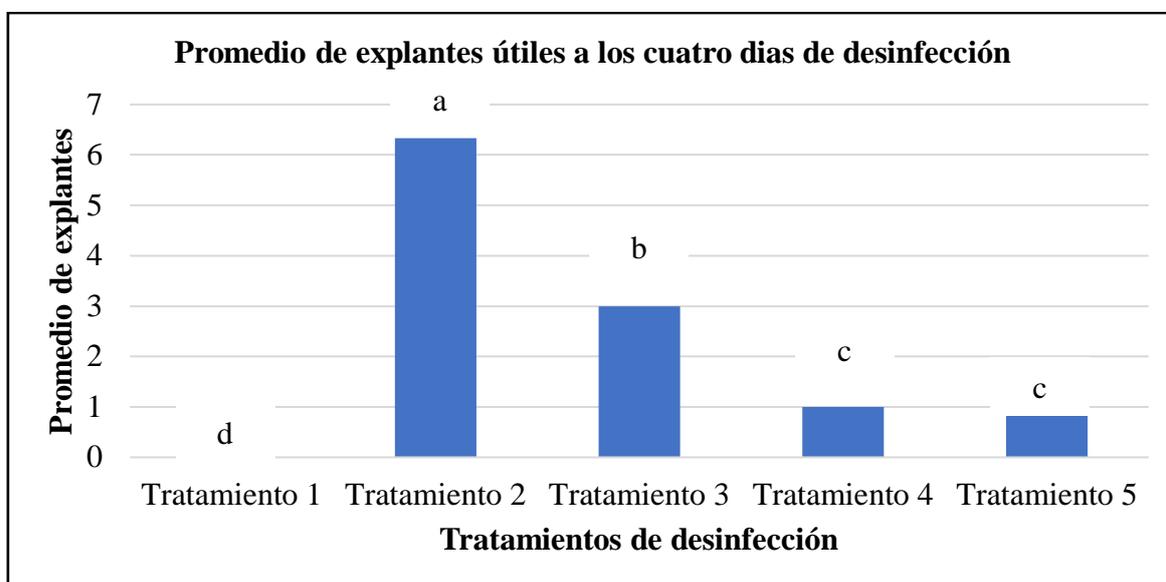
$\mu$ : El valor medio de todos los tratamientos.

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSION**

## 4.1. Resultados

### 4.1.1. Desarrollo de un método eficaz para la desinfección de yemas axilares de *C. alliodora*.

De todos los tratamientos de desinfección de los explantes (yemas axilares) de *C. alliodora*, el más importante desde el punto de vista experimental fue el tratamiento número dos, que en promedio permitió conseguir 6,33 yemas libres de contaminación a los cuatro días de desinfección por cada repetición (Figura 1), a este le sigue el tratamiento número tres, con el cual se consiguieron en promedio tres yemas libres de contaminación por cada una de sus repeticiones. Contrario a los tratamientos ya mencionados (tratamiento 2 y 3) se encuentra el tratamiento uno, con el cual no se consiguieron explantes útiles, mientras los tratamientos cuatro y cinco no tuvieron resultados relevantes, pues apenas consiguieron un explante útil por repetición en cada uno.

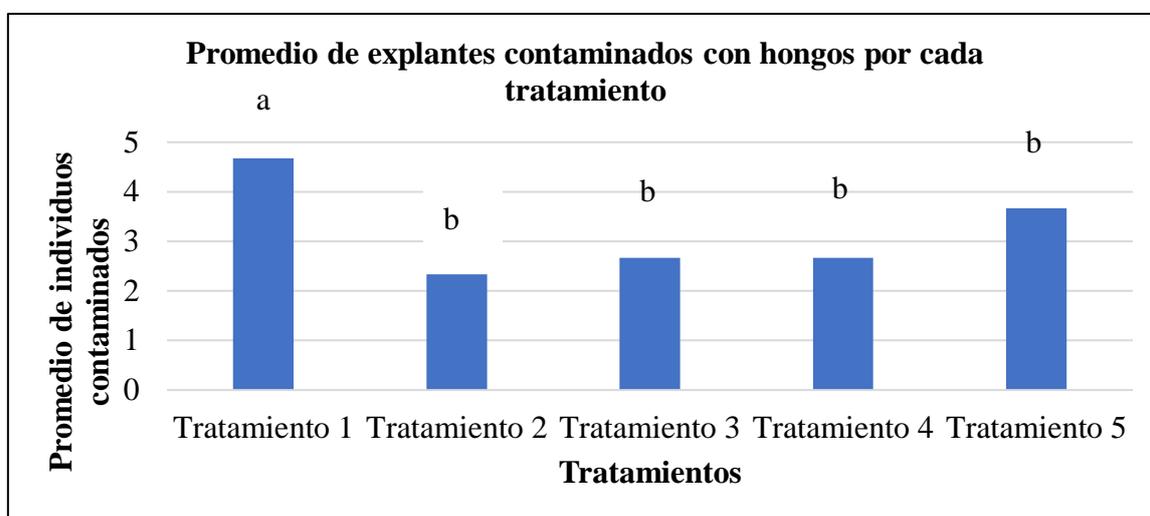


**Figura 1.** Promedio de explantes útiles a los cuatro días de desinfección, según cada tratamiento utilizado.

#### 4.1.2. Establecimiento de yemas axilares de *C. alliodora* en condiciones *in vitro*

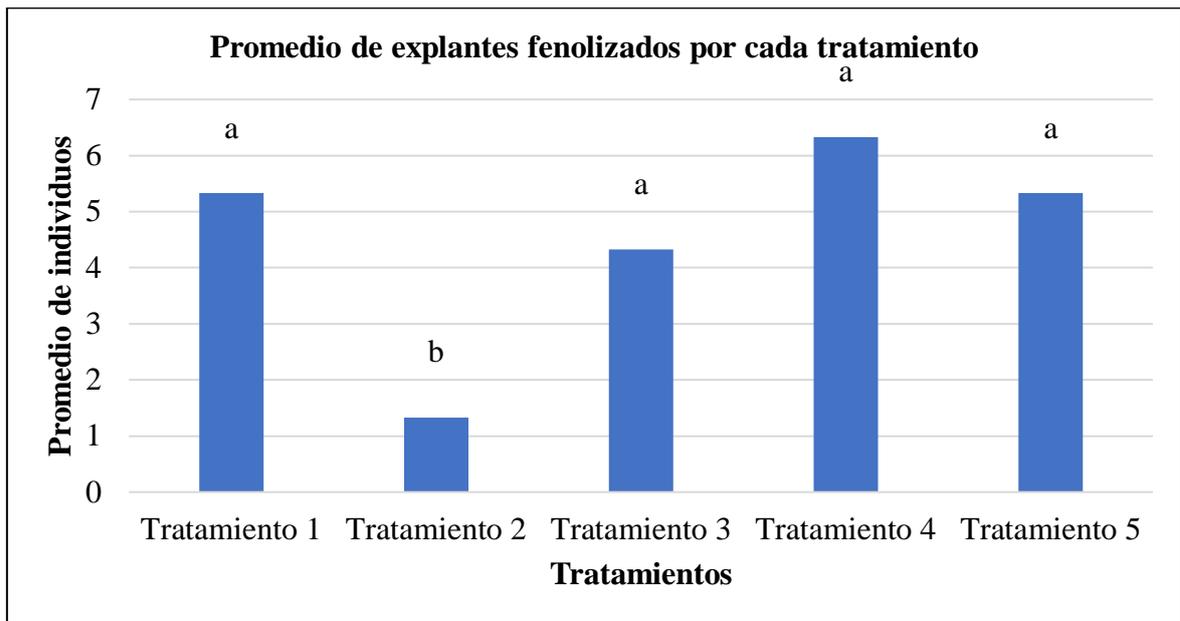
Una vez establecidas las yemas axilares de *C. alliodora* en el medio de cultivo se puede observar que el tratamiento dos demostró mejor respuesta en condiciones *in vitro* para esta especie, debido a la baja incidencia de individuos contaminados por hongos (2,33), individuos fenolizados (1,33) y a la inexistente contaminación por bacterias (Figura 2).

De igual forma, cabe señalar que otros tratamientos presentaron respuestas inferiores a las del tratamiento dos, siendo el tratamiento uno el de resultados menos favorecedores, pues además de no conseguir ningún explante sano, su promedio de individuos contaminados por hongos fue el más alto con 4,67. Hay que destacar que el tratamiento cinco obtuvo resultados similares con 3,67 individuos contaminados por hongos, mientras que en el mismo caso pero con solo 2,67 individuos contaminados se encuentran los tratamientos 3 y 4. Lo antes mencionado se demuestra en la figura 2, a continuación.



**Figura 2.** Promedio de explantes contaminados por hongos por cada tratamiento utilizado, las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

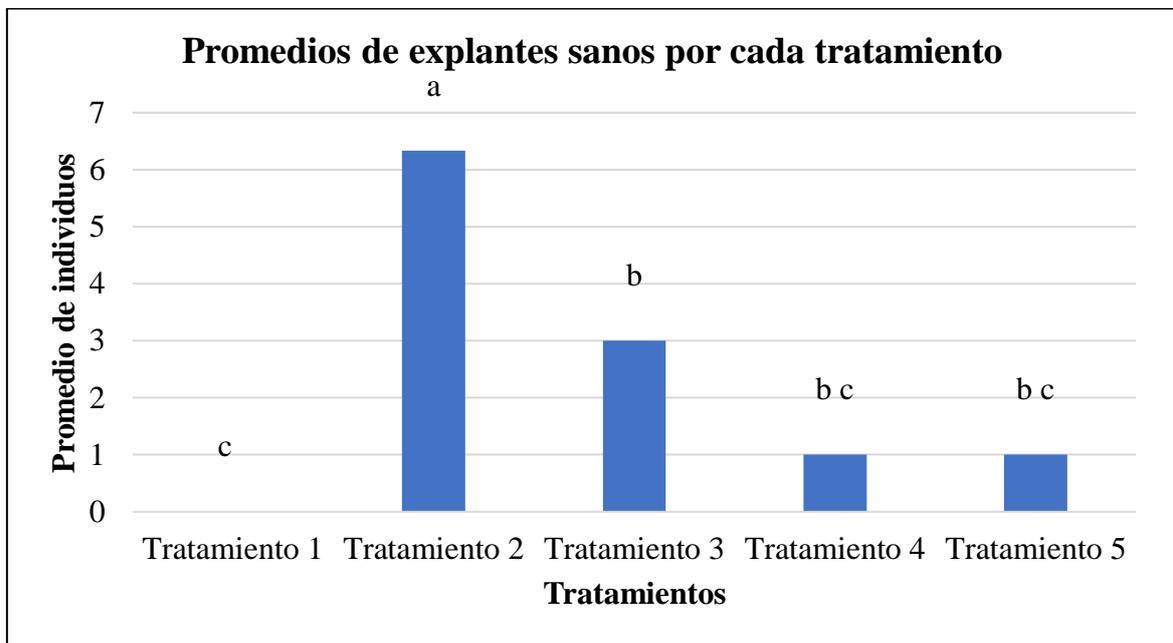
Respecto al promedio de explantes fenolizados, el tratamiento 4 obtuvo los resultados menos esperanzadores, al conseguir un promedio de 6,33 individuos afectados por esta condición, a este le siguen los tratamientos uno y cinco que obtuvieron en promedio 5,33 yemas fenolizadas, mientras el tratamiento 3 está en penúltimo lugar con 4,33 yemas. Por último y con los mejores resultados se encuentra el tratamiento dos con apenas 1,33 yemas en promedio, todo esto lo demuestra la figura 3, que se muestra a continuación.



**Figura 3.** Promedio de individuos fenolizados por cada tratamiento, las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

El tratamiento tres mostró resultados ligeramente mejores con un promedio de tres explantes sanos, una vez más los mejores resultados los tiene el tratamiento dos, que consiguió un promedio de 6,33 individuos sanos, en el promedio de explantes sanos se observa que el tratamiento uno presentó los resultados más bajos, donde no se consiguió ningún explante, a este le siguen los tratamientos cuatro y cinco, con los que apenas se logró obtener un explante sano en promedio.

En relación con lo anterior, considerando el diseño estadístico, se puede afirmar que el tratamiento 2 presentó una alta significancia estadística en comparación con los otros tratamientos, (Figura 4).



**Figura 4.** Promedios de explantes sanos por cada tratamiento utilizado, las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

### 4.1.3. Evaluación del encapsulamiento *in vitro* de yemas axilares *C. alliodora*.

Para este resultado se utilizó la prueba de Wilcoxon (Mann-Whitney U) que sirve para analizar dos muestras asociadas con la finalidad de descartar la hipótesis nula, se aplicó esta prueba debido a que los datos no se distribuyen de manera normal, por lo que realizó esta prueba no paramétrica. Finalizado el encapsulamiento se demostró que el tratamiento dos obtuvo los mejores resultados, con un promedio de siete yemas encapsuladas, mientras el tratamiento uno mostró apenas 2,67 yemas encapsuladas en promedio, demostrándose así que el mejor tratamiento a simple vista es el número dos.

**Tabla 5. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes.**

<b>Trat. 1</b>	<b>Medias</b>	<b>DE (1)</b>	<b>W</b>	<b>P</b>
1	2,67	2,75	6,0	0,100
2	7,0	2,75	6,0	0,100

Dónde:

**n<sub>1</sub>** y **n<sub>2</sub>**: Número de observaciones correspondientes a cada media.

**DE**: Desviación típica (x-MEDIA)

**W**: Estadístico de prueba del Wilcoxon.

**P**: Probabilidad

**Fuente:** (Ruiz, 2017)

## 4.1. Discusión

El proceso de encapsulamiento *in vitro* en laurel no fue totalmente exitoso como lo demuestran los datos estadísticos en el capítulo resultados, el número de explantes fueron sometidos a cinco protocolos de desinfección cada uno con sus respectivas dosis y tiempos de exposición, el tratamiento 2 fue el mejor tratamiento arrojando excelentes resultados de desinfección con 58,3 % de explantes útiles en la especie concuerda con López *et al.*, (2010), quienes obtuvieron también porcentajes mínimos de explantes infectados por hongos y explantes fenolizados, seguido del tratamiento 2 están los tratamientos 3 y 4 los cuales mostraron buenos resultados con un promedio de 33,3% y 8,33% explantes útiles respectivamente para la fase de germinación, mientras que los tratamientos 1 y 5 no lograron tener efectividad en la desinfección donde no produjeron explantes útiles para la fase de germinación de los explantes.

La clave para realizar un procedimiento *in vitro* exitoso en la especie *C. alliodora* es el proceso de desinfección López *et al.*, (2010), debido a las características que posee esta especie y a la presencia de contaminantes superficiales y endógenos, hongos o bacterias presentes en los espacios intercelulares los cuales aparecen bajo las condiciones favorables que presenta el cultivo *in vitro* Lovato *et al.*, (1998).

Otro punto significativo en la investigación que permitió la obtención de resultados positivos fue la selección de plantas jóvenes, ya que poseen mayor capacidad de regeneración y, bajo condiciones controladas son más viables para la reproducción *in vitro* (Beraud y Ulloa, 2015; Cain y Shelton, 2000). La composición del medio de cultivo fue fundamental ya que es el área donde se desarrollaron los explantes extraídos de las plantas donadoras seleccionadas, este medio de cultivo se lo formó con todos los macro y micro nutrientes además de otros elementos como vitaminas, fuentes de hierro y algún tipo de controlador bacteriológico y fúngico, cada elemento constituyente se agregó en cantidades exactas para que el medio de cultivo cumpla su función (tabla 2), se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog), el cual es el más utilizado y adaptable para la mayoría de especies perennes y no perennes como lo afirma Lee-Espinosa *et al.*, (2009).

En cuanto al proceso de encapsulación, en la preparación del hidrogel se utilizó componentes que concuerdan con (Cruz, 2008), como son el medio MS más alginato de sodio. Los mejores resultados se obtuvieron en el tratamiento 2 donde las yemas reposaron por 20 minutos en la solución de  $\text{CaCl}_2$ , la dureza de las perlas depende principalmente de la cantidad de iones de sodio intercambiados con iones de calcio, y el tiempo de complicación debería optimizarse para formar perlas uniformemente esféricas y firmes (Cansiong, 2019). En cuanto al tiempo de inmersión de las yemas en cloruro de calcio fue óptima ya que se obtuvo un alto porcentaje (70%) de germinación, lo cual concuerda con otros autores como (Cansiong, 2019), quien expresa que la inmersión de las yemas durante 20 minutos en el cloruro de calcio es una forma eficiente de encapsulación.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1. Conclusiones

- El mejor tratamiento de desinfección fue el número dos, que consistió en la aplicación de hipoclorito de sodio al 20% durante 20 minutos, etanol al 75% durante un minuto, gentamicina en una concentración de 160 mg/L y povidyn al 50% durante 10 minutos, ácido ascórbico a 1 mg/L durante un minuto y 1 g/L de bicarbonato de sodio durante 20 minutos, logrando obtener un promedio de 6.33 explantes sanos en promedio, además, se determinó que, para establecer las yemas axilares de *C. alliodora* (laurel) se debe utilizar un correcto protocolo de desinfección ya que es el paso principal para lograr una correcta desinfección y una futura germinación de los explantes, previa la correcta selección de la planta donadora. Es importante mencionar que ninguno de los tratamientos utilizados demostró en ningún caso contaminación por bacterias de ningún tipo.
- Para obtener resultados con éxito en cuanto al establecimiento *in vitro*, lo fundamental es seleccionar correctamente el material genético con el que se va a trabajar, los más ideal es utilizar plantas jóvenes, con características sobresalientes, en esta investigación fueron de dos meses, la inmadurez de los tejidos y su mejor capacidad adaptativa hace de dichas plantas los mejores prospectos al momento de su propagación.
- Las yemas axilares de *C. alliodora* (laurel) respondieron de manera favorable en el tratamiento 2 (20 minutos de exposición de las capsulas de alginato de sodio en cloruro de calcio), logrando germinar a diferencia del tratamiento 1 (10 minutos de exposición de las capsulas de alginato de sodio en cloruro de calcio) no logró obtener germinación.

## 5.2. Recomendaciones

- Se recomienda utilizar este tipo de metodología de propagación *in vitro* de especies forestales, en aquellas que sean altamente comerciales y sobre todo las cuales se encuentren en peligro de extinción.
- Es crucial continuar con investigaciones acerca del correcto y específico protocolo de selección y desinfección del material genético de *C. alliodora* para una excelente propagación, que lleve a obtener resultados óptimos, que logren ser económicamente viables y que faciliten la reproducción de la especie en cuestión, mediante métodos no tradicionales, se recomienda además, realizar esta metodología de propagación *in vitro* en laboratorios o áreas extremadamente libres de contaminación, exclusivos para la manipulación del material a propagar para obtener resultados con éxito.
- Hay que prestar especial atención a la edad de las plantas donadoras, debido a que los tejidos de plantas jóvenes han demostrado tener mejores efectos en cuanto a su propagación que árboles maduros, en su defecto es prudente usar ramas y hojas jóvenes de árboles desarrollados.

**CAPÍTULO VI**  
**BIBLIOGRAFÍA**

## 6.1. Literatura Citada

- Cain, M., y Shelton, M. (2000). Revisiting the relationship between common weather variables and loblolly-shortleaf pine seed crops in. *Kluwer Academic Publishers*. 19(1), 187-204.
- Carmona, M., Lemus, C., Rubio, C. (2002). *Estadística aplicada a la investigación* (p. 59). p. 59. Tepic: Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic, Mexico. 59 p.
- Cansiong, L. (2019). “*Desarrollo de un protocolo de encapsulamiento in vitro de Ochroma*”. Tesis inédita. Ingeniería Forestal. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Los Ríos, Ecuador 64 p.
- Cruz, N. (2008). “*Algunos avances en callogénesis y encapsulamiento in vitro de yemas de teca (Tectona grandis L.)*”.
- Vinueza, M. (2010). Ficha Técnica Laurel. Ecuador Forestal.
- Espinoza, R. (2014). El fomento de plantaciones forestales comerciales en el Ecuador en el período 2006 – 2012: propuesta de un nuevo sistema de cofinanciamiento a las plantaciones forestales. Tesis Inédita. Economía. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. 129 p.
- Fukai, S. (2017). Development of cryopreservation techniques. ISHS, 49-54.
- García, L., De Fera, M., Acosta, K. (2007). Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal*, 7(2), 67-79.
- Goyal, Y Arya, H. (1984). Tissue Culture of Desert Trees: I. Clonal Multiplication of *Prosopis cineraria* by Bud Culture. *Journal of Plant Physiology*. 115(3), 183 - 189.
- Indacochea, B. (2013). “*Conservación y Propagación de árboles superiores de Cordia Alliodora (Ruiz & Pav). Oken, en la microrregión sur de Manabí* “. Tesis inédita. Universidad de Pinar del Río. Cuba.

- Jadán, M., Romero, P y Orquera, G. (2013). Establishment of an in vitro culture protocol of Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui* J.F. Gmel.) from apical and axillary buds. *Romanian Biotechnological Letters*. 19(6), 9984 – 9991.
- Jain, S. (2011). Prospects of in vitro conservation of date palm genetic diversity for sustainable production. *Emir. J. Food Agric*. 23(2), 110-119.
- Beraud, M. y Ulloa, D. (2015). Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo sobre la multiplicación in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedades Brigitta y Legacy. *Scientia Agropecuaria*. 6(1), 31 – 40.
- Lee-Espinosa, H. E., Murguía-González, J., Laguna-Cerda, A., García-Rosas, B., Gámez-Pastrana, M. R., Galindo-Tovar, M. E., Landero-Tórres, I., Iglesias-Andreu, L., & Santana-Buzzy, N.. (2009). Encapsulación de embriones somáticos de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* para la producción de semilla sintética. *Chapingo*. Serie horticultura, 15(spe), 33-40.
- Lovato, P., Gianinazzi, A., Trouvelot, T., Gianinazzi, S. (1998). The state of art mycorrhizas and micropropagación. *Adv.Hort. Sci.*, 10, 46-52.
- López, R., Murcia, C., López, P., Valencia, J. (2010). Estandarización del protocolo de desinfección de disco de hoja en la inducción de callogenesis de *Cordia alliodora* (Ruiz y Pav) Oken en condiciones in vitro. *Rev. Invest. Univ. Quindío*, 20, 120-125.
- Mesa, A., Lajonchere, G y Toral, O. (1995). El cultivo in vitro en el mejoramiento de pastos y forrajes. II. micropropagación y conservación de germoplasma. *Pastos y Forrajes*. 18(1), 1 – 9.
- Núñez, N., Mora, A y Santacruz, F. (2008). Aplicación de técnicas de micropropagación en la especie *Cordia elaeagnoides* A. DC. (Boraginaceae). *Cucba*. 3(5), 63-64.
- Oken, L. (1843). *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.). *Allgemeine Naturgeschichte*. 2(2), 1098 – 1841.

- Rache, L y Pacheco, M. (2010). Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Acta bot. Bras.* 24(4), 1086 – 1095.
- Rangel, S., Hernández, E y Hernández, M. (2016). Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México. *Rev. Fitotec. Mex.* 39(3), 225 – 231.
- Rivera, A., Valbuena, R., Hidalgo, R. y Moreno, J. (2008). Crioconservación de yemas de microtubérculos de papa *Solanum tuberosum* ssp. andigena mediante desecado de tejidos. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 9(2), 37 – 44.
- Ruíz, F. (2017). Estadística no paramétrica. Editor: Instituto Tecnológico de Chetumal. México; pág. 14.
- Santana, I. (1994). Estudio de la variabilidad en poblaciones de caña de azúcar obtenidas por cultivo de tejidos. *Cultivo de tejidos en la agricultura.* 25(1), 544 – 558.
- Schilde-Rentschler, L. y Schmiediche, P. (1984). El cultivo de tejidos: su pasado, presente y futuro. *CIP Circular.* 11(1), 1 – 6.
- Vinueza, I. M. (2012). Ecuador Forestal.

**CAPÍTULO VII**  
**ANEXOS**

## 7.1. Anexos

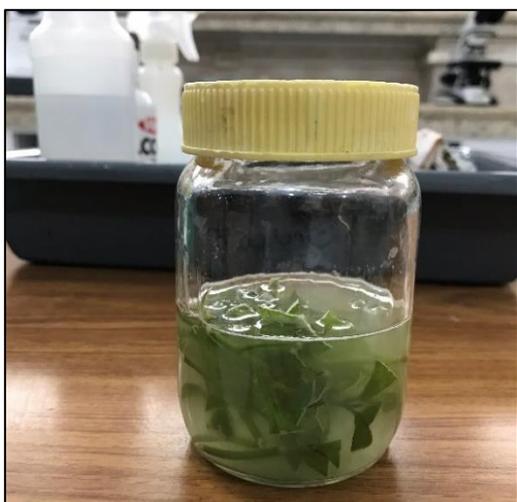
### Anexo 1. Actividades realizadas en el laboratorio.



**Fotografía 1.** Selección de planta donadora.



**Fotografía 2.** Preparación medio de cultivo



**Fotografía 3.** Extracción y desinfección de yemas axilares.



**Fotografía 4.** Establecimiento *in vitro*.



**Fotografía 5.** Explantes establecidos.



**Fotografía 6.** Encapsulación explantes.



**Fotografía 7.** Germinación explantes Establecidos.



**Fotografía 7.1.** Germinación explantes Establecidos.

**Anexo 2.** Tratamientos de desinfección y plantas utiles.

Tratamiento 1	Repetición	VARIABLES		
		NaClO 10 % - 30 min	Gentamicina mg/L - 10 min	Povidyn % - 5 min
	R1	10	0	10
	R2	10	10	0
	R3	10	10	10
<b>SUMA</b>		<b>30</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
<b>PROMEDIO</b>		<b>10</b>	<b>6,67</b>	<b>6,67</b>

Tratamiento 2	Repetición	VARIABLES					
		NaClO 20 % - 30 min	Gentamicina mg/L - 10 min	Povidyn % - 5 min	Ácido ascórbico mg/L - 10 min	NaHCO3 g/L - 20 min	EtO H %- 1 min
	R1	10	10	10	10	10	10
	R2	5	0	5	0	5	5
	R3	5	5	5	0	5	
<b>SUMA</b>		<b>20</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>15</b>
<b>PROMEDIO</b>		<b>6,67</b>	<b>5</b>	<b>6,67</b>	<b>3,33</b>	<b>6,67</b>	<b>7,5</b>

Tratamiento 3	Repetición	VARIABLES					
		NaClO 30-40 % - 5-10 min	Gentamicina mg/L - 10 min	Povidyn % - 5 min	Ácido ascórbico mg/L - 10 min	NaHCO3 g/L - 20 min	EtO H %- 1 min
	R1	5	5	5	0	0	0
	R2	10	10	0	0	0	10
	R3	5	0	0	0	0	5
<b>SUMA</b>		<b>20</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>15</b>
<b>PROMEDIO</b>		<b>6,67</b>	<b>5</b>	<b>1,67</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>

Tratamiento 4	Repetición	VARIABLES		
		NaClO 50 % - 10 min	Gentamicina mg/L - 10 min	Povidyn % - 5 min
	R1	10	5	5
	R2	10	5	0
	R3	10	0	0
<b>SUMA</b>		<b>30</b>	<b>10</b>	<b>5</b>
<b>PROMEDIO</b>		<b>10,00</b>	<b>3,33</b>	<b>1,67</b>

Tratamiento 5	Repetición	VARIABLES			
		NaClO 2,5 % - 15 min	Ca (ClO) 2,5% - 1 min	Gentamicina mg/L - 10 min	Ácido ascórbico mg/L - 10 min
	R1	5	5	5	5
	R2	5	0	5	5
	R3	0	10	0	0
<b>SUMA</b>		<b>10</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>PROMEDIO</b>		<b>3,33</b>	<b>5,00</b>	<b>3,33</b>	<b>3,33</b>

### Anexo 3. Analisis de varianza por cada variable evaluada.

#### Análisis de la varianza

##### Hongo dia 4

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Hongo dia 4	15	0,49	0,29	33,27	

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	11,07	4	2,77	2,44	0,1151
Tratamiento	11,07	4	2,77	2,44	0,1151
Error	11,33	10	1,13		
Total	22,40	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,86070

Error: 1,1333 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
1,00	4,67	3	0,61 A
5,00	3,67	3	0,61 A
4,00	2,67	3	0,61 A
3,00	2,67	3	0,61 A
2,00	2,33	3	0,61 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

##### Bacteria dia 4

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Bacteria dia 4	15	sd	sd	sd	sd

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,00	4	0,00	sd	sd
Tratamiento	0,00	4	0,00	sd	sd
Error	0,00	10	0,00		
Total	0,00	14			

### Fenolizados

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Fenolizados	15	0,80	0,72	23,48

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	44,40	4	11,10	9,79	0,0017
Tratamiento	44,40	4	11,10	9,79	0,0017
Error	11,33	10	1,13		
Total	55,73	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,86070

Error: 1,1333 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
4,00	6,33	3	0,61 A
5,00	5,33	3	0,61 A
1,00	5,33	3	0,61 A
3,00	4,33	3	0,61 A
2,00	1,33	3	0,61 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

### Sanos

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Sanos	15	0,92	0,89	36,02

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	76,27	4	19,07	28,60	<0,0001
Tratamiento	76,27	4	19,07	28,60	<0,0001
Error	6,67	10	0,67		
Total	82,93	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,19405

Error: 0,6667 gl: 10

Tratamiento	Medias	n	E.E.
2,00	6,33	3	0,47 A
3,00	3,00	3	0,47 B
5,00	1,00	3	0,47 B C
4,00	1,00	3	0,47 B C
1,00	0,00	3	0,47 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)